

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO R72P DO GENE TP53 EM PACIENTES COM
CARCINOMA DE MAMA DUCTAL INVASOR**

Márcia Portela de Melo

Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas
Para a obtenção do título de Mestre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2008

M528a Melo, Márcia Portela de

Análise do polimorfismo R72P do gene TP53 em pacientes com carcinoma de mama ductal invasor / Márcia Portela de Melo; orient. Sandra Leistner-Segal. – 2008.
113 f. : il.color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias mamárias 2. Polimorfismo genético 3. Mulher I. Leistner-Segal, Sandra II. Título.

NLM: WP 870

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Sandra Leistner-Segal pela sua orientação, apoio, paciência e dedicação. Seus ensinamentos despertaram em mim interesse e prazer em buscar entender este universo ainda tão complexo da Biologia Molecular.

À Dra. Ana Cristina Bittelbrunn pela proposta, incentivo, orientação e generosidade.

Ao Dr. Diego Uchoa pela sua disponibilidade e colaboração para o êxito deste trabalho.

À Bióloga Crisle Vignol Dillenburg pela sua competência e disposição de ensinar-me as técnicas envolvidas neste estudo no laboratório.

À Luciana Rossato e ao Gustavo Lucena que, em fases diferentes do estudo, participaram dos procedimentos no laboratório, sempre buscando a qualidade e precisão em seu trabalho.

Aos professores e contratados do Serviço de Mastologia pelo aprendizado constante, carinho, respeito e amizade.

Ao Prof. Carlos Henrique Menke pelo exemplo como professor, por sua dedicação à Mastologia e seu desenvolvimento e pelo incentivo e apoio estrutural para a realização deste estudo.

Ao GPPG e ao FIPE por oferecerem condições e suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

Ao PPG-Ciências Médicas por oferecer oportunidade e condições para seguir minha formação acadêmica.

Ao Prof. Jorge Biazús pelo exemplo, pelos seus ensinamentos, pela oportunidade de constante aprendizado no bloco cirúrgico, nas discussões de casos e no cuidado e respeito à paciente, em especial, pela amizade sincera, confiança e incentivo.

À Dra. Ângela Zucatto pela amizade, parceria, conforto e conselhos objetivos na dificuldade.

Um agradecimento especial à minha família pelo amor, amizade, dedicação, compreensão e por sempre incentivarem os estudos.

“... a genética tem aplicações práticas e imediatas que dizem respeito a todos. Não se tem escapatória e acabou-se o tempo no qual a genética era vista como um ramo secundário da medicina. A forma como a medicina é praticada hoje mudará radicalmente na próxima década. A aplicação da tecnologia genética tornará a medicina muito mais personalizada, fazendo-se necessário que cada médico, independente de sua especialidade, torne-se um geneticista.”

*Solange Farah
Prof. Adjunta do Departamento de Genética Médica, UNICAMP
Autora do livro: DNA Segredos e Mistérios, Sarvier, 2.ed., 2007*

Lista de abreviaturas

AccII	Enzima de restrição
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Arg	Arginina
Arg72	Alelo Arginina no códon 72
ATM	Ataxia telangiectasia mutated (proteinoquinase)
ATR	Proteína telangiectasia ataxia associada
BAX	Proteína envolvida com indução da apoptose
Bcl-2	Proteína antiapoptótica
BRCA 1	Gene supressor tumoral (câncer de mama)
BRCA2	Gene supressor tumoral (câncer de mama)
BstUI	Enzima de restrição
CCC	Códon prolina
CDI	Carcinoma Ductal Invasor
CDIS	Carcinoma Ductal “in situ”
CDKs	Quinases ciclino-dependentes
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CGC	Códon arginina
CIM	Carcinoma invasor mínimo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E6	proteína E6 do vírus HPV
E2F	Fator de transcrição
EGFR	Receptor para o fator de crescimento epitelial
Go	Fase do ciclo celular
G1	Fase do ciclo celular
G2	Fase do ciclo celular

GADD45	Growth arrest DNA damage
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDA	Hiperplasia ductal atípica
HDM2	Gene murine double minute 2 protein (mdm2)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor –Type 2
HPV	Papilomavírus humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalo de confiança
IGF-1	Fator de crescimento insulina-like I
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4a/ARF	Wild –type p53 activated fragment
IPN	Índice Prognóstico de Nottingham
LOH	Loss of heterozygosity – Perda de heterozigidade
M	Mitose
Myc	Proto-oncogene
P	Representação alelo prolina
p21	proteína p21
p53	proteína p53
p63	proteína p63
p73	proteína p73
P14 ^{ARF}	Proteína P14 ^{ARF}
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro	Prolina
Pro72	Alelo prolina no códon 72
R	Representação do alelo Arginina
Ras	Proteína ligadora de guanosina 5'-trifosfato (GTP)

RB	Proteína supressora tumoral do retinoblastoma
R72P	Representação polimorfismo no códon 72
RR	Risco relativo
S	Fase do ciclo celular
SEER	Survillance, Epidemiology and Results Program of the National Cancer Institute
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOE	Sem outra especificação (referenre ao CDI)
SV40	Vírus “simian 40”
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase - Estadiamento
TP53	Gene supressor tumoral TP53
UDLT	Unidade ducto-lobular terminal
UICC	International Union Against Cancer
UV-B	Radiação ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1.

Fatores de risco associados ao carcinoma de mama 14

Tabela 2.

Estimativas para o ano 2008 das taxas brutas de incidências por 100.000 e de números de casos novos por câncer de mama feminina 21

Tabela 3.

Estimativa para o ano 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres 22

Tabela 4.

Comparação das atividades biológicas dos dois alelos polimórficos no códon 72 do TP53 39

Lista de Figuras

Figura 1.

Taxa de incidência anual de câncer de mama por 100.000 mulheres (estimativas para 2002) GLOBOCAN 2002, IARC22

Figura 2.

Representação das taxas brutas de incidência do câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras estimadas para 2008. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA) 23

Figura 3.

Eventos patológicos envolvidos no processo de transformação do tecido mamário normal a lesões pré-invasoras até o carcinoma de mama invasor26

Figura 4.

Ativação das vias relacionadas ao controle do ciclo celular, apoptose e inibição da angiogênese mediadas pela p53 33

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	13
1 CARCINOMA DE MAMA	13
1.1 HISTÓRIA NATURAL DO CARCINOMA DE MAMA	13
1.2 PATOLOGIA DO CARCINOMA DE MAMA INVASOR	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DE MAMA	19
1.4 EVOLUÇÃO DO CARCINOMA DE MAMA	23
2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS	27
2.1 GENE SUPRESSOR TUMORAL TP53	27
2.2 CARCINOMA DE MAMA E O GENE TP53	34
2.3 POLIMORFISMO NO GENE TP53 E O CARCINOMA DE MAMA	37
2.4 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE	46
OBJETIVOS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ARTIGO (versão em português)	60
ARTIGO (versão em inglês)	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	104
ANEXOS	
Anexo I – Termo de Consentimento	107
Anexo II – Ficha de coleta de dados	109
Anexo III – Instruções aos autores do periódico <i>Oncology Reports</i>	111

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente e também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. O gene TP53 é polimórfico no códon 72 da proteína que ele codifica, podendo conter arginina (CGC) ou prolina (CCC) nesta posição. Este polimorfismo pode estar envolvido na suscetibilidade e predisposição ao câncer e apresenta uma distribuição étnica e geográfica bastante variável. O genótipo homozigoto para arginina parece ser um fator de risco e prognóstico significativo para o câncer de mama. **Métodos:** Extraído DNA a partir do sangue periférico de 76 pacientes consecutivas com carcinoma ductal invasor (CDI), tratadas no Serviço de Mastologia do HCPA, em qualquer estágio da doença. 80 amostras de DNA do grupo controle de doadores saudáveis do Banco de Sangue do HCPA foram incluídas de forma aleatória. Foram coletados dados demográficos e dados das características clínicas e histopatológicas e realizada a amplificação do éxon 4 do gene TP53 através da PCR, seguida da identificação do polimorfismo R72P do éxon 4 pela digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Bst*UI, a qual reconhece o sítio de clivagem CG↓CG. Os objetivos foram determinar as freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo R72P nas pacientes com carcinoma de mama ductal invasor, comparando-as com as freqüências no grupo controle e relacionar a presença deste polimorfismo com características clínico-patológicas. **Resultados:** A distribuição dos genótipos no códon 72 do gene TP53, tanto em pacientes como em controles, encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A freqüência encontrada para o polimorfismo R72P foi similar entre as pacientes com CDI e os controles, não sendo encontrada diferença significativa na freqüência do genótipo ($P = 0,707$) e na freqüência alélica ($P = 0,469$). **Conclusões:** O polimorfismo R72P no gene TP53 não se associou a maior risco de desenvolvimento de CDI na população estudada. Este achado pode estar relacionado à grande variação inter-racial e étnica em nossa população, decorrente de freqüentes miscigenações e exposição a diferentes fatores ambientais, importantes na evolução do carcinoma de mama. Não houve associação com características clínico-patológicas.

Palavras-chave: gene TP53, polimorfismo R72P, PCR, carcinoma de mama

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most frequent neoplasia as well as the main cause of death from cancer among women. The TP53 gene is polymorphic in codon 72 of the protein it encodes, and may contain either arginine (CGC) or proline (CCC) in that position. Such polymorphism may be involved in the susceptibility and predisposition for cancer presenting with a widely variable ethnic and geographic distribution. The arginine homozygous genotype seems to be a significant risk factor and prognostic for breast cancer. Methods: DNA was extracted from peripheral blood of 76 patients suffering from invasive ductal carcinoma (IDC) treated at the HCPA Mastology Service at any stage of the disease. Eighty healthy controls from the Blood Bank Donors of HCPA were included randomly. Demographic data were collected as well as data from the clinic and histopathological characteristics. Amplification of exon 4 from the TP53 gene was performed through PCR, followed by digestion of the PCR product with the restriction enzyme *Bst*UI, which recognizes the CG↓CG cleavage site, for identification of the R72P polymorphism of exon 4. The objectives were to determine the allele and genotype frequencies of R72P polymorphism in patients suffering from invasive ductal breast carcinoma, comparing with the control group and to correlate the presence of that polymorphism with clinical pathological characteristics. Results: The distribution of genotypes in codon 72 of gene TP53, both for patients and controls was in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency found for R72P polymorphism was similar between IDC patients and controls, with no significant difference being found in the genotype frequency ($P = 0.707$) and allele frequency ($P = 0.469$). Conclusions: R72P polymorphism in the TP53 gene was not associated to an increased risk of developing IDC in the population studied. This finding may be related to the great interracial and ethnic variation in our population deriving from frequent miscigenations and exposure to different environmental factors that are important in the evolution of breast cancer. There was also no association with clinical pathological characteristics.

Key words: gene TP53, R72P polymorphism, PCR, breast carcinoma

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres. (1, 2) O Rio Grande do Sul é o estado que apresenta o segundo maior coeficiente de mortalidade do país. (3) A alta incidência do câncer de mama e sua ocorrência comum em mulheres com menos de 60 anos (40% dos casos) transformaram-no em um tópico de grande interesse, dando ensejo a intensivos esforços de pesquisa clínica, intermediária e básica. Embora muitos avanços tenham sido feitos para detecção precoce e tratamento do câncer de mama, pouco se sabe sobre sua etiologia, biologia e eventos moleculares associados ao seu desenvolvimento. (4)

O carcinoma de mama é caracterizado por uma desregulação da proliferação e apoptose celulares, desaparecimento de células mioepiteliais, transformação epitélio-mesênquima e instabilidade genômica (mutações, deleções, ampliações, rearranjos cromossômicos). Neste processo, várias moléculas, dentre elas os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor como TP53, parecem estar envolvidas. Ainda permanece pouco definida a ordem em que os eventos ocorrem para o surgimento e progressão do carcinoma de mama. (5)

Os genes supressores tumorais estão envolvidos no controle de pontos estratégicos da cadeia de eventos que controla a proliferação e a diferenciação celular. O mecanismo de inativação desses genes é recessivo, isto é, sua função só é afetada quando os dois alelos do supressor estão inativados. A alteração de um dos alelos do gene decorre, geralmente, de uma mutação germinativa, enquanto a segunda cópia é alterada por mutação somática do outro alelo, o que se denomina perda de heterozigidade. O indivíduo heterozigoto para um gene supressor tumoral não apresenta neoplasia, mas apresenta um risco maior de desenvolver um tumor. (6)

O envolvimento do gene supressor tumoral TP53 no desenvolvimento do câncer de mama surgiu pela primeira vez quando uma mutação germinativa, neste gene, foi encontrada como responsável pela Síndrome de Li-Fraumeni, uma rara síndrome familiar de predisposição ao câncer, de herança autossômica dominante com expressão variável e penetrância incompleta. (7,8,9) Indivíduos com SLF apresentam um risco aumentado para alguns carcinomas (carcinoma de mama, sarcomas, tumores cerebrais e carcinoma adrenocortical) com uma frequência muito

superior àquela observada entre a população não afetada. (9) 50% dos indivíduos com SLF apresentarão diagnóstico de algum carcinoma em idade próxima aos 30 anos, aumentando para 90% aos 65 anos. Isto implica um importante papel para a inativação do gene TP53 no desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que aproximadamente 70% das famílias com SLF apresentam mutações germinativas em TP53. (9)

O TP53 codifica uma proteína envolvida em muitas vias celulares que controlam a proliferação e a estabilidade celular, como o ciclo celular, reparo ao DNA e apoptose. A proteína p53 é um fator de transcrição expresso em muitos tipos celulares e ativado em resposta a vários sinais estressores. (9) A perda de função da p53 suprime um mecanismo de proteção contra o acúmulo de alterações genéticas. Mutações somáticas em TP53, em sua maioria (90%) do tipo missense, são encontradas em uma variedade de cânceres humanos esporádicos, com frequência variando entre 10% a 60%, dependendo do tipo tumoral e da população envolvida. (9,10)

Além das mutações que inativam as funções de TP53, os polimorfismos têm sido sugeridos como fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma de mama. (11) É o que tem sido observado em relação ao polimorfismo R72P do gene TP53, descoberto em 1986, associado à expressão de duas diferentes proteínas p53, com a presença de Arginina (R) ou de Prolina (P) no códon 72. A distribuição deste polimorfismo é extremamente heterogênea de acordo com a população em estudo, variando sua frequência de 16% a 63%, com muitos resultados contraditórios. (10)

Ambas as formas polimórficas do gene TP53 podem aumentar a carcinogênese, mas a forma Arg72 TP53 é considerada a mais oncogênica e associada a uma maior frequência de mutações em TP53. (4,12,13) Um dos principais interesses em estudar este polimorfismo é avaliar sua associação com outros fatores prognósticos e seus efeitos sobre a sobrevida e resposta à terapêutica do câncer de mama. Muitos destes estudos demonstraram associações significativas. (12,13,14,15)

REVISÃO DA LITERATURA

1 CARCINOMA DE MAMA

1.1 HISTÓRIA NATURAL DO CARCINOMA DE MAMA

O carcinoma de mama invasor apresenta uma longa história natural e faz parte de um grupo heterogêneo de lesões que diferem de acordo com sua apresentação clínica, características radiográficas, características patológicas e potencial biológico. Apesar dessas diferenças, entretanto, o tumor tem em comum a infiltração de células neoplásicas no estroma mamário e o potencial para a invasão de estruturas circundantes e metástases distantes. (16)

Os carcinomas de mama são derivados das células epiteliais que formam a unidade ducto-lobular terminal (UDLT), independente do tipo histológico, com disseminação das células para além da membrana basal da UDLT, o que o diferencia do carcinoma *in situ*, invadindo o tecido normal adjacente. (16) O tipo histológico mais freqüente de carcinoma de mama infiltrativo (ou invasor) é o carcinoma ductal invasor (CDI), correspondendo a 70-80% dos carcinomas de mama. (17,18) Na verdade, o diagnóstico de carcinoma ductal invasor é um diagnóstico de exclusão, porque esse tipo de tumor é definido como um carcinoma “não classificado em nenhuma outra categoria de carcinoma mamário invasor” ou carcinoma ductal invasor “sem outra especificação” (SOE). (17,18)

Em geral, os carcinomas de tipo especial (lobular invasor, tubular, mucinoso, medular e outros tipos raros) compreendem 20% a 30% dos carcinomas invasores, e pelo menos 90% do tumor deve demonstrar as características histológicas definidas de um carcinoma de tipo especial para ser designado como tal. (18)

Ao definirmos fatores de risco envolvidos com o desenvolvimento do carcinoma de mama, devemos considerar a contribuição da predisposição genética e fatores ambientais. Identificar mulheres com elevado risco pode possibilitar a adoção de melhores estratégias para prevenir ou detectar a doença em seus estágios mais precoces (Tabela 1). (1,19)

Tabela 1
Fatores de risco associados ao carcinoma de mama

Fatores que aumentam o risco de carcinoma de mama	
Associações bem confirmadas	
Aumento da idade	++
Região geográfica (Estados Unidos da América e países ocidentais)	++
História familiar de câncer de mama	++
Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2	++
Mutações em outros genes de alta penetrância (TP53)	++
Exposição a radiação ionizante (na infância)	++
História de doença benigna da mama	++
Menopausa tardia (> 54 anos)	++
Menarca precoce (< 12 anos)	+
Nuliparidade e idade do 1º RN a termo > 30 anos	++
Mamografia com elevada densidade	++
Terapia hormonal (“reposição”)	+
Obesidade na pós-menopausa	+
Consumo de álcool (1 ou + drinques/dia)	+
Associações prováveis	
Uso recente de contraceptivos orais	+
Consumo elevado de gordura saturada e carne	+
Polimorfismos em genes de baixa penetrância	+ ou -
Níveis elevados de fator de crescimento insulina-like 1 (IGF-1)	++
Níveis elevados de prolactina	++
Fatores que diminuem o risco de carcinoma de mama	
Região geográfica (África e Ásia)	--
Idade do 1º RN a termo jovem	--
Elevada paridade	--
Amamentação	--
Obesidade em mulheres na pré-menopausa	-
Consumo de frutas e verduras	-
Atividade física	-
Uso de drogas antiinflamatórias não-esteróides	-
Quimioprevenção (tamoxifeno, inibidores da aromatase)	-
Polimorfismo em genes de baixa penetrância	+ ou -

++ (aumento de risco moderado a elevado); + (aumento de risco baixo a moderado);

-- (decrécimo de risco moderado a alto); - (decrécimo de risco baixo a moderado)

Adaptada de Hankinson et al. 2004 e Dumitrescu and Cotarla, 2006.

As mulheres com hiperplasia ductal atípica (HDA) apresentam um risco 4 a 5 vezes maior de desenvolver um carcinoma de mama. Este risco praticamente duplica quando a presença da HDA está associada com história familiar de carcinoma de mama (parente de primeiro grau, em especial), apresentando um risco 9 vezes maior. (19,20,21)

Apesar do longo debate existente sobre o potencial pré-neoplásico das lesões benignas proliferativas da mama (hiperplasia ductal florida na doença fibrocística, por exemplo), um modelo de progressão definitivo (similar ao descrito para o adenocarcinoma de cólon) não foi ainda determinado. O conhecimento completo das displasias mamárias permanece ainda longe de ser totalmente compreendido e embora as mudanças displásicas citológicas e arquiteturais tenham sido observadas em várias doenças não-malignas da mama, como nas hiperplasias ductais florida e colunar, na adenose e nos papilomas, seu real potencial pré-maligno permanece indefinido. (1)

As características morfológicas da hiperplasia ductal atípica (HDA), as quais são intermediárias entre as encontradas nos tecidos normais e malignos, associadas ao significativo aumento do risco para o desenvolvimento de carcinoma nas mulheres afetadas, leva a acreditar na sua natureza pré-maligna. (1,22) Entretanto, as alterações genéticas na HDA são idênticas às alterações encontradas no carcinoma ductal *in situ* (CDIS), o que leva a questionar seu reconhecimento como uma entidade distinta do CDIS de baixo grau. (22) O conhecimento atual considera que a HDA é mais bem qualificada como um CDIS de baixo grau muito pequeno (< 1 – 2 mm em seu maior diâmetro) e, como tal, não pode ser considerada uma lesão “precursora” para o carcinoma de mama distinta do CDIS. (22)

O prognóstico das pacientes com carcinoma de mama tem sido bem documentado quanto ao tamanho do tumor, a presença e a extensão do envolvimento dos linfonodos axilares (17,23,24,25), além de outros fatores prognósticos bem estabelecidos, como grau histológico, idade, invasão angiolinfática e receptores hormonais (receptor de estrogênio e receptor de progesterona). (25) As pacientes diagnosticadas com carcinoma de mama, entretando, correm o risco de apresentar metástases durante um extenso período de tempo, e sua definição de cura é problemática. Embora os CDIs tenham o pior prognóstico de todos os carcinomas de mama invasivos, mesmo dentro desse grupo, subgrupos de prognóstico mais favorável podem ser identificados. (26)

O envolvimento dos linfonodos regionais por metástases é um dos mais importantes fatores prognósticos no carcinoma de mama (24,27), sendo os linfonodos axilares, da mama interna e os supraclaviculares os locais mais comuns de envolvimento regional do carcinoma de mama. Aproximadamente 50% das pacientes com carcinoma de mama perceptível ao exame físico apresentam evidência histológica de envolvimento de linfonodos axilares. A probabilidade de envolvimento dos linfonodos axilares está diretamente relacionada com o tamanho do tumor primário. (24,27)

As pacientes com linfonodos axilares histologicamente negativos têm uma taxa de sobrevida, em 10 anos, de 75%, a qual é reduzida para 25 – 30% naquelas com metástases para linfonodos axilares. (27,28) Também as pacientes com um a três linfonodos com metástases obtêm melhores resultados do que as com quatro linfonodos positivos ou mais. (24,28) Aproximadamente 20 a 30% das pacientes com nódulos axilares negativos desenvolvem metástases distantes em um período de dez anos. (24) Essa observação tem importantes implicações em relação à história natural da doença. Isto sugere que, eventualmente, as metástases podem evoluir diretamente do tumor primário, na mama, para locais distantes pelos vasos sanguíneos, sem primeiro envolver os linfáticos regionais. (29)

O tamanho do tumor primário tem relação direta com o prognóstico, é um fator prognóstico tempo-dependente e está relacionado à sobrevida. (18) Tanto a virulência quanto a capacidade de metastatizar aumentam de acordo com o tamanho do tumor e envolvimento dos linfonodos axilares. (23) O termo carcinoma invasor mínimo (CIM) tem sido utilizado para identificar tumores com diâmetro < 10 mm de acordo com o *American College of Surgeons* com excelente prognóstico. Na maioria dos estudos, a freqüência de metástases para linfonodos axilares, no CIM, é de 10 – 20% (24,27), comparado com mais de 40% em tumores medindo 15 mm ou mais. (27) A sobrevida livre de doença, em 20 anos, nos tumores < 10 mm, após o tratamento inicial, é de 88%; enquanto, nos tumores entre 14 – 16 mm, a sobrevida é de 65%. (28)

Carter et al. analisando 24740 casos registrados no *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute*, observou que as taxas de sobrevida, em 5 anos, variaram de 45,5% para tumores iguais ou maiores que 5 cm com comprometimento de linfonodos axilares até 96,3% para tumores menores que 2 cm sem linfonodos comprometidos. O diâmetro tumoral

e o estado dos linfonodos se mostram independentes, mas aditivos como fatores prognósticos. (30)

Muitos estudos avaliam a influência da idade sobre o prognóstico do carcinoma de mama no momento do diagnóstico. Nixon et al. acompanhando 107 pacientes com menos de 35 anos, por um período médio de 99 meses, observaram que estas pacientes apresentaram um risco de recorrência global e a distância aumentado em relação às mais velhas. Fatores associados a um pior prognóstico foram mais freqüentes nas pacientes mais jovens. Mesmo após considerar as variações terapêuticas e fatores de risco relacionados à agressividade tumoral, a idade permaneceu como um fator significativo para recorrência local (RR, 1.70), recorrência à distância (RR, 1.60) e mortalidade (RR, 1.50). (31,32)

A etnia é outro fator que, assim como a idade, pode ser considerado junto a outros fatores prognósticos bem estabelecidos, como tamanho tumoral. Americanas de origem africana e hispânica apresentam pior prognóstico em relação às caucasianas, provavelmente por razões multifatoriais, como menor acesso ao atendimento e cuidados. Alguns estudos confirmam menor sobrevida entre as americanas de origem africana, mesmo após ajuste pelo estágio da doença. (32)

A expressão dos receptores de estrogênio e progesterona é usada para prever a resposta individual das pacientes ao tratamento com tamoxifeno. Pacientes com ambos receptores esteróides positivos apresentam uma resposta de 78% ao tamoxifeno, enquanto, esta cai para 10% quando ambos receptores são negativos. (27)

1.2. PATOLOGIA DO CARCINOMA DE MAMA INVASOR

Um parâmetro importante a ser analisado é a presença de invasão vascular peritumoral, a qual é forte preditora de envolvimento de linfonodos regionais, desta forma, também preditora da presença de metástases em linfonodo sentinela. (33) Em uma grande série de biópsias do linfonodo sentinela, a invasão vascular peritumoral aparece como o preditor de maior poder da presença de metástases no linfonodo sentinela, em uma análise multivariada ($P < 0,0001$). (33) Além da associação com comprometimento de linfonodos regionais, a invasão vascular peritumoral é preditora de recorrência local após cirurgia conservadora ou retalhos miocutâneos após mastectomia. (16,18,25)

Da mesma forma, a presença de carcinoma *in situ* em mais de 25% da massa tumoral, caracteriza um carcinoma com extenso componente *in situ*. Pacientes com tais tumores são mais propensos a apresentar recorrência local após o tratamento conservador. (16)

Na prática, entretanto, a graduação histológica é o método de graduação mais frequentemente utilizado, sendo esta, em análises multivariadas, fator prognóstico de maior peso que o tipo histológico. (18) Na graduação histológica, os carcinomas de mama são caracterizados com base na avaliação de três características: formação de túbulo, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. O sistema de graduação histológica mais utilizado atualmente é o descrito em detalhe por Elston e Ellis. Esse sistema é uma modificação do sistema de graduação proposto por Bloom e Richardson em 1957. O grau histológico final é calculado pela soma dos critérios isoladamente: tumores com 3 a 5 pontos são classificados como bem diferenciados (grau 1 - G1), aqueles com 6 a 7 pontos como moderadamente diferenciados (grau 2 - G2) e aqueles com 8 a 9 pontos como pouco diferenciados (grau 3 - G3). (16,28,34)

Considerado forte preditor para determinar sobrevida em pacientes com carcinoma de mama, o Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) é baseado em um estudo retrospectivo de fatores prognósticos em 387 pacientes com carcinoma de mama operável (tamanho clínico menor que 5 cm). O IPN leva em consideração o tamanho do tumor (em centímetros) multiplicado por 0,2, o grau histológico (G I, GII, G III) e o estado dos linfonodos (linfonodos negativos; ≤ 3 linfonodos positivos ou envolvimento dos linfonodos da mama interna; > 3 linfonodos axilares positivos ou envolvimento de linfonodos axilares e da mama interna). A soma dos valores classifica as pacientes em grupos de risco. (25,28,35)

Conforme o resultado da soma destes valores, os carcinomas são considerados como grupo de bom prognóstico (soma $< 3,4$), prognóstico intermediário (soma 3,4 a 5,4) e mau prognóstico (soma $> 5,4$). (25) Usando estes critérios, Galea et al., em estudo retrospectivo, com uma série de 1629 pacientes, encontraram 29% das pacientes com bom prognóstico, de acordo com o IPN, tendo uma sobrevida de 80% em 15 anos; 54% das pacientes com prognóstico moderado e sobrevida de 42% em 15 anos; 17% das pacientes com mau prognóstico e 13% de sobrevida em 15 anos. (36)

A classificação TNM (*tumor-node-metastasis system*) da UICC

(*International Union Against Cancer*)/AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), atualmente em sua sexta edição, oficialmente adotada em janeiro de 2003, agrupa os casos de acordo com dados clínicos (estadiamento clínico - cTNM) e anatomopatológicos (estadiamento patológico - pTNM) no momento do diagnóstico primário e do tratamento cirúrgico loco-regional, sendo utilizada para avaliar recomendações sobre tratamento loco-regional. (37)

A classificação patológica (pTNM) é também usada para estimar o prognóstico e fazer recomendações sobre tratamento adjuvante. (37) O estadiamento do carcinoma de mama pode ser usado, na prática clínica, como fator prognóstico quanto à sobrevivência das pacientes em 10 anos: 5 % a 12% de óbito estimado nas pacientes em estágios I/II, comparado com mais de 60%, nas pacientes em estágio III e mais de 90%, nas pacientes em estágio IV. (37)

1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DE MAMA

O carcinoma de mama tem enorme impacto na saúde da mulher, sendo o segundo câncer mais comum (1,15 milhões de novos casos foram estimados para 2002) em todo o mundo, logo atrás do câncer de pulmão. Nas mulheres, é o câncer mais freqüente (23% de todos os cânceres). (38)

Mais da metade dos casos encontra-se em países industrializados. Em torno de 361.000 casos na Europa (27,3% dos cânceres em mulheres) e 230.000 na América do Norte (31,3% dos cânceres em mulheres). As taxas de incidência são elevadas na maioria das áreas desenvolvidas (exceto no Japão, onde está em terceiro lugar, atrás dos cânceres colorretal e estômago), com a maior incidência, padronizada pela idade, na América do Norte (99,4 por 100.000). (38) Menores incidências do câncer de mama são observadas na Europa Oriental, América do Sul, sul da África e região mais ocidental da Ásia, mas permanecendo como o câncer mais comum entre as mulheres também nestas regiões. A menor incidência está na África Central, 16,5 por 100.000 (Figura 1). (38)

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (411.000 mortes anualmente, o que representa 14% das mortes por câncer entre as mulheres). Devido a sua alta incidência e relativo bom prognóstico em relação a outras neoplasias, o câncer de mama é o mais prevalente em todo o mundo; com uma estimativa de 4,4 milhões de mulheres vivas que tiveram

diagnóstico de câncer de mama nos últimos 5 anos (comparado com apenas 1,4 milhões de pessoas – homens ou mulheres – vivas que tiveram diagnóstico de câncer de pulmão). Estima-se que 1,5% da população feminina nos Estados Unidos sejam sobreviventes do câncer de mama. (38,39)

Desde estimativas de 1990, tem ocorrido um aumento na incidência em 0,5% ao ano. Esta taxa de crescimento permite estimar em torno de 1,4 milhões de novos casos em 2010. Na China, os registros de novos casos mostram um aumento de incidência de 3% a 4% ao ano, considerando este aumento, a incidência total, em 2010, poderá chegar a 1,5 milhões de casos. (38)

Na Europa, as estimativas para 2004 indicaram 371.000 casos novos de câncer de mama (27,4% de todos os casos entre as mulheres), sendo o de maior incidência entre as mulheres, seguido pelo carcinoma colorretal. (39) O câncer de mama também é a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres européias, com 129.000 mortes (17,4%). (39) Apesar disto, tem sido observada uma queda nas taxas de mortalidade na Europa Ocidental, na Austrália e nas Américas, provavelmente, em função da ampliação do rastreamento mamográfico, diagnósticos mais precisos e maior número de mulheres recebendo tratamento adequado para suas condições, como o melhor uso de terapias antiestrogênio (tamoxifeno). (1,40)

Apesar do risco de morte por outras causas, que não o carcinoma de mama, se tornar mais importante com o avanço da idade, o risco de morte por câncer de mama permaneceu substancial dentro dos primeiros 5 anos após o diagnóstico, particularmente nos estágios mais avançados, mesmo entre as 33% das pacientes brancas e as 23% das pacientes negras com diagnóstico aos 70 anos ou mais. (41)

O câncer de mama no Brasil, assim como no resto do mundo, é um problema de saúde pública, sendo o câncer mais freqüente (excluindo o câncer de pele não melanoma) entre as mulheres. A estimativa é que deverão ocorrer, no país, em 2008 e 2009, 49.400 novos casos de câncer de mama segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), permanecendo como o câncer mais comum entre as mulheres brasileiras. (3)

Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas esperadas de casos novos de câncer em geral, refletindo as heterogeneidades regionais, enquanto a região Centro-Oeste apresenta padrão intermediário. A região Norte apresenta as menores

taxas (Figura 2). Em relação ao câncer de mama, as maiores taxas de incidência serão observadas nas regiões sudeste e sul do país (Tabela 2). (3)

Entre as mulheres brasileiras, o câncer de mama constitui a primeira causa de morte, registrando-se uma variação percentual relativa de mais de 80% em pouco mais de duas décadas: a taxa de mortalidade padronizada por idade, por 100.000 mulheres, aumentou de 5,77 em 1979, para 9,74 em 2000 (Ministério da Saúde, 2002). (3)

É estimado para o ano de 2008 que as maiores taxas de incidência por 100.000 mulheres ocorrerão no estado do Rio de Janeiro, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. Para o Rio Grande do Sul é estimado 4880 novos casos, com uma taxa de incidência de 85,5 casos para cada 100.000 mulheres, ficando logo atrás do câncer de pele não-melanoma (taxa bruta de incidência por 100.000 estimada em 86,22). Na capital, Porto Alegre, a taxa bruta de incidência por 100.000 mulheres será de 119,72 (Tabela 3). (3)

Tabela 2

Estimativas para o ano 2008 das taxas brutas de incidências por 100.000 e de números de casos novos por câncer de mama feminina

<i>Regiões</i>	Casos novos	Taxas brutas
Sul	9500	67,09
Sudeste	28430	68,12
Centro-Oeste	2630	38,17
Nordeste	7630	28,38
Norte	1210	15,62

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA)/ Ministério da Saúde

Tabela 3

Estimativa para o ano 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres

<i>Estados</i>	<i>Taxa bruta</i>	<i>Capital</i>	<i>Taxa bruta</i>
Rio Grande do Sul	85,50	Porto Alegre	119,72
São Paulo	72,52	São Paulo	95,30
Rio de Janeiro	92,77	Rio de Janeiro	120,93
Distrito Federal	51,11		
Minas Gerais	42,46	Belo Horizonte	64,97
Paraná	56,16	Curitiba	76,02
Santa Catarina	52,03	Florianópolis	62,45
Bahia	24,92	Salvador	50,87
Ceará	35,65	Fortaleza	49,64
Pernambuco	44,82	Recife	87,90

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA) / Ministério da Saúde

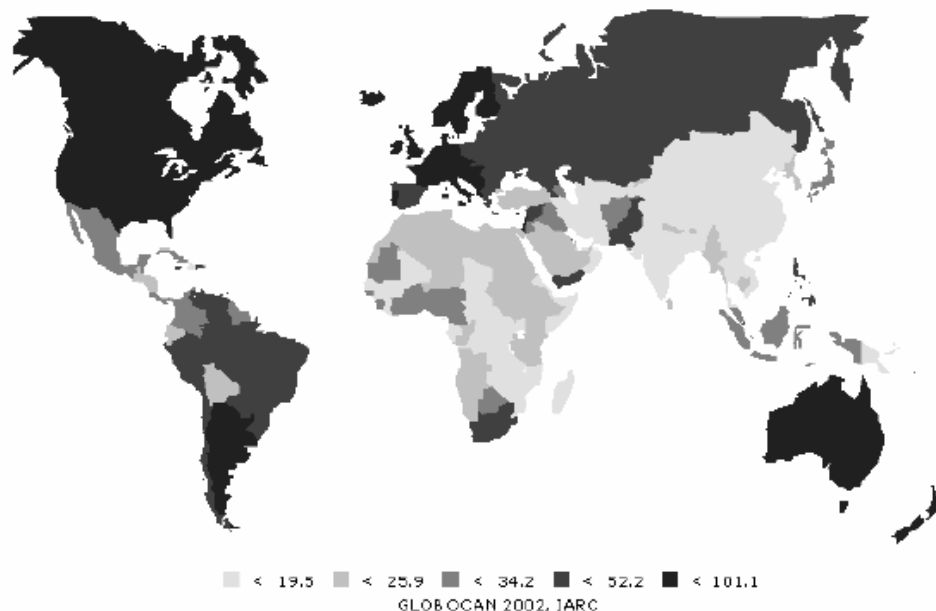


Figura 1: Taxa de incidência anual de câncer de mama por 100.000 mulheres (estimativas para 2002) GLOBOCAN 2002, IARC.

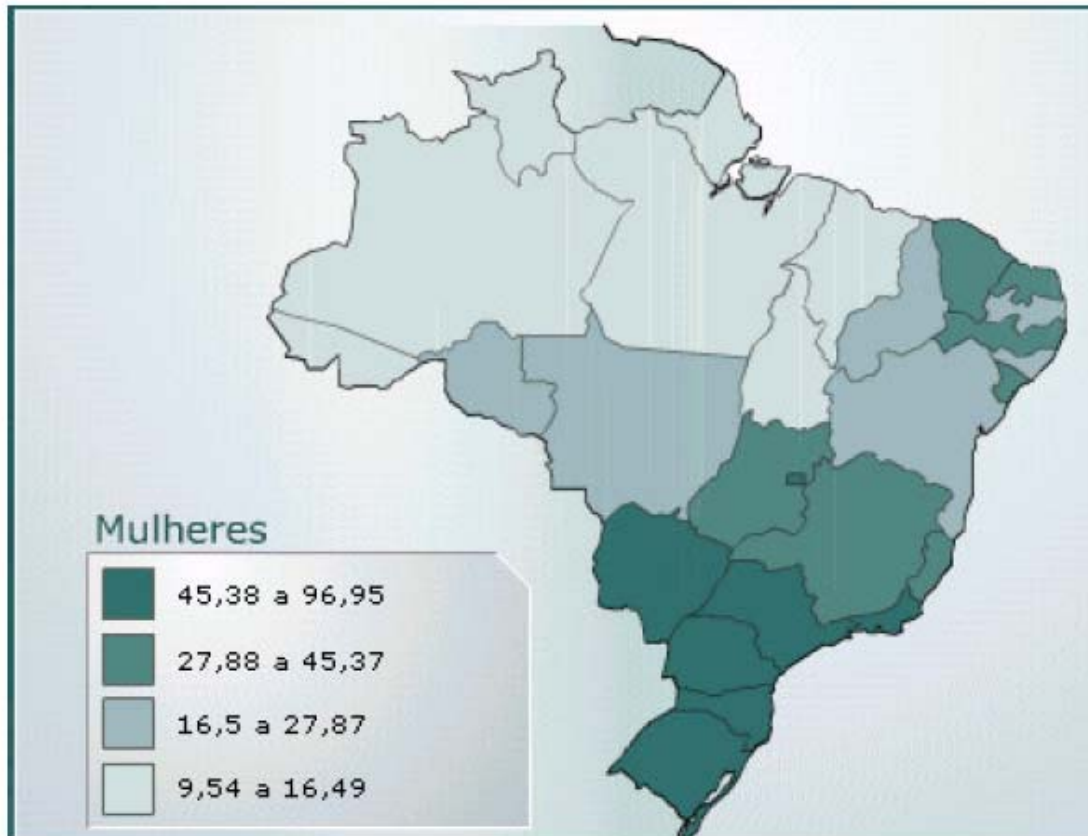


Figura 2: Representação das taxas brutas de incidência do câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras estimadas para 2008. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA)

1.4 EVOLUÇÃO DO CARCINOMA DE MAMA

A longa história do câncer de mama tem sido avaliada em termos da taxa de desenvolvimento da doença. Ao considerar um modelo de desenvolvimento exponencial do tumor e um tempo de duplicação de cem dias, muitos pesquisadores registraram resultados similares, sendo um pouco mais de oito anos o tempo necessário para que uma única célula maligna se desenvolva e se torne uma massa de 1cm detectável clinicamente. Este modelo de desenvolvimento exponencial do tumor proporcionou a primeira base teórica para o uso da quimioterapia contra o câncer. (42)

Existem deficiências na concepção do desenvolvimento exponencial do tumor. Desta forma, é necessário interpretar o tempo de duplicação somente como um indicador grosseiro da agressividade tumoral, e não-válido para estimar o tempo entre a oncogênese e a apresentação clínica. A taxa de desenvolvimento clínico do câncer de mama leva em consideração informações que envolvem a biologia

genética e molecular da doença. O carcinoma de mama resulta de uma série de mutações nos genes reguladores do desenvolvimento e do reparo do DNA. (43) A heterogeneidade do comportamento clínico da doença sugere que a base genética pode ser variável. Desconhece-se, entretanto, se essas mutações precisam ocorrer, necessariamente, em alguma ordem particular ou como vias distintas envolvendo mudanças genéticas que podem, eventualmente, levar ao fenótipo do carcinoma de mama. (43)

Estas mudanças genéticas podem estar relacionadas a um modelo de evolução clonal da neoplasia, resultante da indução de modificações em uma célula progenitora normal, gerando a célula tumoral com vantagens de crescimento sobre as células normais, permitindo o início da expansão clonal. Mudanças genéticas adicionais favorecem a sobrevivência do clone, seu desenvolvimento descontrolado e sua habilidade de mudança (instabilidade genética). A célula mutante torna-se a precursora de uma nova subpopulação celular predominante, com aumento da capacidade proliferativa, perda de diferenciação, escapando dos mecanismos normais de controle do crescimento celular, com aquisição da capacidade de invasão local e de metastatizar. (44) Apesar desse modelo de oncogênese (seleção clonal) ter sido desenvolvido na década de 1970, os detalhes estão se tornando disponíveis apenas agora. (44) No entanto, o aparecimento e desenvolvimento de um clone de células tumorais é um evento relativamente raro. Isto ocorre porque a célula necessita romper uma série de barreiras fisiológicas para se tornar cancerígena. As barreiras mais primárias são os pontos de controle do ciclo celular. (44)

Uma grande variedade de mudanças genéticas tem sido descrita nos carcinomas de mama, apesar de seu significado patogênico não ter sido completamente elucidado. Embora as etapas iniciais e as vias da carcinogênese do carcinoma de mama ainda estejam fracamente definidas, o ponto de vista que prevalece é aquele onde o carcinoma invasivo é derivado de um componente *in situ*, baseado não somente na coexistência das duas lesões, mas também nas semelhanças histológicas entre os componentes invasivos e *in situ* dentro da mesma lesão. Vários estudos têm documentado que os carcinomas invasivos de baixo grau são mais frequentemente associados a carcinomas *in situ* de baixo grau; enquanto, carcinomas invasivos de grau elevado estão associados com carcinomas *in situ* também de grau elevado. (45)

Gupta et al. descrevem um modelo de evolução onde a hiperplasia ductal atípica é a proliferação clonal que expressa os eventos genéticos iniciais, que permitem esta proliferação epitelial descontrolada, podendo coexistir vários clones dentro do mesmo tecido mamário. Eventos genéticos subseqüentes permitem a progressão de um ou mais clones até o surgimento do CDIS. Este modelo explica o achado ocasional de CDIS com diferentes graus histológicos dentro da mesma lesão. (45)

A presença de mudanças cromossômicas compartilhadas tanto no CDIS, assim como nos carcinomas invasivos sincrônicos e adjacentes a este demonstra sua relação clonal e evolutiva. (46) O gene supressor tumoral TP53 está mutado em aproximadamente 25% dos CDIS, mas está raramente mutado no tecido mamário normal ou em lesões proliferativas benignas. (46) Estudos, que utilizaram material tumoral por microdissecção, demonstraram que as mutações em TP53 podem ocorrer no CDIS antes do desenvolvimento do carcinoma de mama invasor, e a freqüência aumenta progressivamente do CDIS baixo grau até 30% a 40% no CDIS alto grau. (47,48,49) A maioria dessas mutações pode alterar a conformação, a especificidade de seqüência de ligação ao DNA e sua função como fator de transcrição. (47)

A instabilidade cromossômica ocorre, com ganho ou perda de múltiplos loci, à medida que as lesões hiperplásicas progridem de CDIS até o CDI. (50) Desta forma, perda de heterozigosidade é observada em mais de 70% dos CDIS de alto grau, quando comparada com 35% a 40% dos casos de hiperplasia atípica e zero por cento nas amostras de tecido mamário normal. (45,46,50) No CDIS, mais de 37% da perda de heterosigozidade foi observada nos loci dos cromossomos 16q, 17p e 17q, sugerindo que a inativação de genes supressores tumorais, nestas regiões, pode ser importante no desenvolvimento do carcinoma de mama não-invasivo. (50) Estes resultados apontam para um importante papel das alterações em TP53 precocemente no processo de carcinogênese da mama. (48,49)

As alterações da expressão gênica na carcinogênese da mama, desta forma, parecem ocorrer durante a transição do tecido mamário normal para CDIS. A maioria, se não todas as características biológicas e clínicas relevantes do carcinoma de mama, como o estado dos receptores hormonais, o nível da expressão de oncogenes como Her-2/neu, o grau histológico e as mutações no gene TP53 estão provavelmente determinadas no momento do desenvolvimento do CDIS.

(46) Durante sua progressão, o CDIS de alto grau, em particular, pode estar associado com a quebra da camada celular mioepitelial e da membrana basal ao redor do lúmen ductal, com a proliferação de fibroblastos, infiltração linfocítica e angiogênese no estroma tecidual (Figura 3). (46)

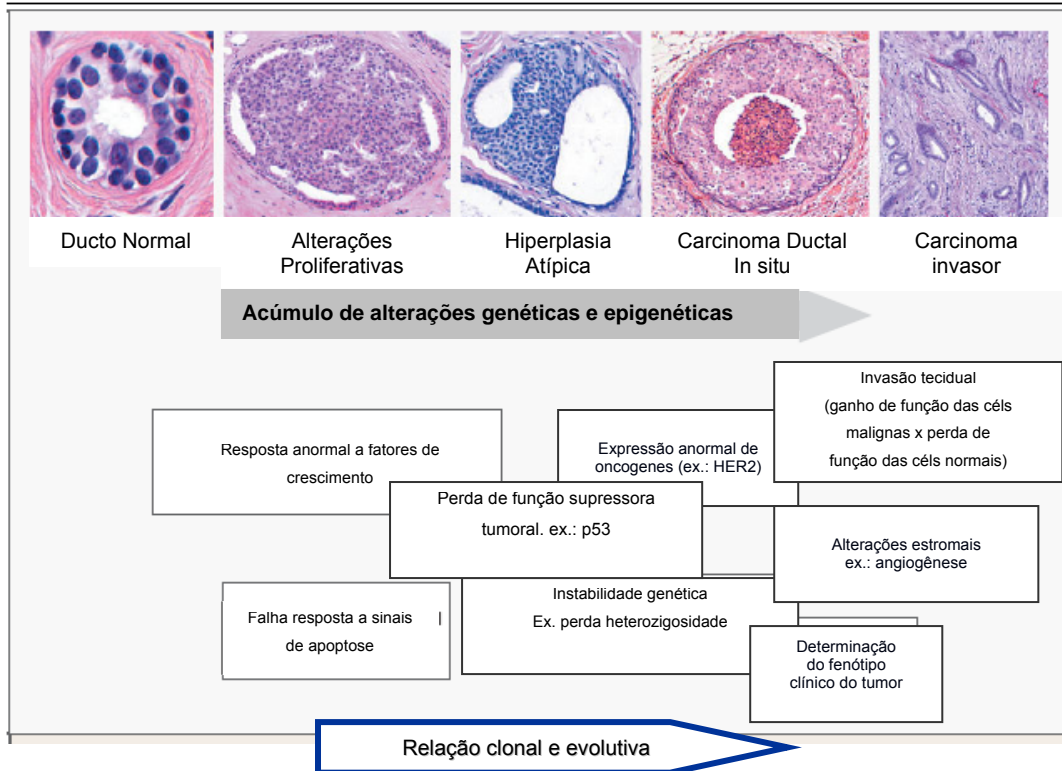


Figura 3: Eventos patológicos envolvidos no processo de transformação do tecido mamário normal a lesões pré-invasoras, como o CDIS, até o carcinoma de mama invasor: acúmulo de alterações genéticas, expressão de oncogenes e perda da regulação do ciclo celular normal. A maioria das características clínicas de um carcinoma de mama ductal invasor já se encontram determinadas no estágio de CDIS, embora eventos adicionais, incluindo invasão tecidual e alterações no estroma mamário circundante caracterizem o tumor invasor. Burstein *et al.* N Engl J Med 2004;350:1430

Ao considerar os eventos genéticos envolvidos na carcinogênese, usando a técnica de cDNA microarray, foi possível determinar que existem diferentes subtipos de câncer de mama com perfil genético distinto, com prognóstico e com implicações sobre a sobrevivência das pacientes também diferentes. Perou *et al.*, em 2000, demonstraram que é possível estratificar os tumores de mama pelo seu perfil genético em dois grupos, de acordo com a expressão de receptores hormonais (positivo/negativo) e/ou pela origem epitelial (basal/luminal), com pelo menos cinco

subgrupos. (51, 52) O grupo negativo para receptores estrogênicos apresenta três subtipos: um com superexpressão de Her-2/neu, um “normal like” e um basal [positivo para EGFR (receptor para o fator de crescimento epitelial), ausência de receptores para estrógeno e progesterona e ausência de Her-2/neu] descrito como subtipo triplo negativo. O grupo com receptores hormonais positivos apresenta dois subtipos: luminal A e luminal B. (51, 52, 53, 54)

2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS

O desenvolvimento de neoplasias é marcado por uma série de alterações genômicas que incluem mutações, ampliações, perdas e rearranjos do DNA. (55) As mutações no gene TP53 são a alteração genética mais comumente encontrada em uma vasta variedade de neoplasias malignas, incluindo o carcinoma de mama. (14) O bloqueio da transativação e a perda de seqüências específicas de ligação ao DNA do TP53 causados pelas mutações são os principais mecanismos pelos quais a função supressora tumoral é subvertida no câncer. (56) A elevada taxa de mutações encontradas sugere que o gene TP53 exerce um papel central no desenvolvimento neoplásico, particularmente no carcinoma de mama. (55)

2.1 GENE SUPRESSOR TUMORAL TP53

O gene TP53, descrito pela primeira vez em 1979, em estudo com vírus “simian 40 (SV40)” e o antígeno T, foi o primeiro gene supressor tumoral a ser identificado. (6,48,57) Inicialmente, descrito como um oncogene – acelerador do ciclo celular –, mas dados genéticos e funcionais, obtidos 10 anos após a sua descoberta (1989), demonstraram que TP53 é, na verdade, um gene supressor tumoral, (48,57,58) localizado no cromossomo 17 (17p13.1) e herdado de forma autossômica dominante, apresentando em torno de 20kb, formado por 11 éxons. (63) O gene TP53 codifica uma fosfoproteína de 53 quilodátons formada por 393 aminoácidos. A proteína p53 sofre perda ou alterações de funções na maioria dos carcinomas humanos. (56,57)

Donehover LA et al. puderam confirmar o papel do TP53 como gene supressor tumoral através de um modelo animal, envolvendo o desenvolvimento de ratos transgênicos com 2 linhagens germinativas com alelos do p53 nulos

(homozigotos) ou com um alelo nulo (heterozigoto). Foi observada uma suscetibilidade para o desenvolvimento precoce de diferentes tumores espontâneos nos homozigotos. Enquanto que naqueles heterozigotos, houve um retardo na manifestação desta característica em comparação ao homozigoto, sendo a perda do alelo normal suficiente para predispor a inúmeros tipos de tumores (59).

A grande maioria das mutações comumente encontradas no TP53, nos tumores humanos, é do tipo missense, causando a substituição de um aminoácido por outro, alterando a conformação da proteína. (14,47,48,60) Aproximadamente 80% destas mutações estão distribuídas sobre o domínio central da região codificadora do TP53, entre os éxons 5 – 8, e afetam a capacidade da proteína p53 de ligar-se a seqüências no DNA. Em torno de 30% destas mutações ocorrem em cinco códons “hotspot” (175, 245, 248, 273, 282), alterando a capacidade de ligação ao DNA da proteína p53 ou alterando a estrutura conformacional da p53 e, desta maneira, afetando indiretamente a sua capacidade de ligação ao DNA. (56,61,62,63) O gene TP53 pertence a uma família de genes da qual fazem parte mais dois outros membros, P63 e TP73. (61,63)

Das mutações em TP53, 13,6% estão localizadas fora da região entre os éxons 5 -8, apresentando um número significativo de mutações nos éxons 4, 10 e, em menor freqüência, no 9. Nestes éxons, foi encontrado um número significativo de mutações nonsense e frameshift (pequenas inserções e deleções), as quais são mutações nulas, usualmente não detectadas pela análise imunistoquímica, uma vez que nenhuma proteína é produzida. (60)

A freqüência de mutações envolvendo o gene TP53 pode variar de 5 a 50% dependendo do tipo e do estágio tumoral. (4,48,63) Carcinomas de ovário, de esôfago, colorretal, de cabeça e pescoço e pulmonar são malignidades com alta freqüência de mutações (40% - 50%). Tumores cerebrais, mamários, gástricos e hepáticos apresentam uma freqüência intermediária de mutações (20% - 35%). Em outros tumores como leucemia, sarcoma, carcinomas testiculares, melanomas e carcinomas cervicais, a p53 parece ser inativada por mecanismos alternativos, como, por exemplo, pela proteína E6 do vírus HPV que degrada a p53. (63)

A proteína p53 já foi chamada de “guardiã da integridade do DNA”. Como tal, ela é encontrada funcionalmente inativa em cerca de 70% dos carcinomas humanos e é um dos principais alvos de vírus oncogênicos. Em metade destes tumores, a p53 é inativada como resultado de mutações no gene TP53, em outros,

indiretamente, pela ligação a proteínas virais, ou como resultado de alterações em genes cujos produtos interagem com a p53 ou transmitem informações vindas do gene TP53. (58)

A expansão clonal de uma célula depende de um descontrole de sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. A ação da p53 é pleiotrópica e, embora haja uma grande superposição entre os seus diferentes mecanismos de supressão de tumores, certamente a interrupção do ciclo celular e a indução da apoptose estão entre os mais importantes. (63,64) O ciclo celular é um processo rigorosamente controlado e a progressão, nas suas diferentes fases, é dependente de um complexo “controle de qualidade”. Esta checagem acontece na passagem entre as diferentes fases do ciclo (G0/G1, S, G2 e M) e em momentos específicos do ciclo celular, chamados de “pontos de checagem” (*checkpoints*). (58,63)

A p53 desempenha seu papel através da regulação dos pontos de checagem G1/S. (55) A fase G1 é o período do ciclo celular que antecede a síntese de DNA e a mitose, durante a qual reparos no DNA podem ser realizados, reduzindo a probabilidade de mutações. (65,66,67) Caso o dano persista, a célula é eliminada da população por apoptose, ou seja, através da morte celular programada, na tentativa de conter o dano e proteger o organismo. (58) A proteína p53, desta forma, freia o desenvolvimento tumoral, explicando porque está tão freqüentemente mutada nos diversos carcinomas. (58)

A proteína p53 regula diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos no DNA causados por diferentes agentes (ex.: luz ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos químicos). (57,68) Esta fosfoproteína é uma reguladora transcricional induzida em resposta aos danos no DNA e pode levar a uma parada no ciclo celular ou induzir apoptose em resposta à depleção de metabólitos, ao choque térmico, à hipóxia, a oncoproteínas virais e a onco-genes celulares ativadas. (65,68) A proteína p53 é uma das mais importantes proteínas ativadas pelos sensores do “ponto de checagem”, verificando a passagem da fase G1 à fase S do ciclo celular. (65,66,67,68)

Nas situações de estresse, a molécula de p53 é fosforilada, modificando sua conformação, tornando-a mais estável. Graças a esta estabilidade, a p53 passa a funcionar como um fator de transcrição e induz a síntese de p21. Esta, por sua vez, inibe a atividade de ciclinas específicas e assim a célula é impedida de seguir

seu ciclo normal para que o DNA possa ser reparado. Há evidências de que p53 é capaz de induzir a proteínas BAX e outras envolvidas na gênese da apoptose. (56)

A proteína p53 consiste de 4 unidades (ou domínios): (56, 57)

- a) Domínio que ativa fatores de transcrição;
- b) Domínio que reconhece seqüências específicas de DNA (*core domain*);
- c) Domínio responsável pela tetramerização da proteína;
- d) Domínio que reconhece o dano ao DNA.

A proteína p53 apresenta meia-vida muito curta (6 – 20 min), sendo mantida em baixos níveis através de mecanismos que garantem a sua rápida degradação nos tecidos normais, os quais não sofreram nenhum dano. (65, 68) Desta forma, a p53 é ativada apenas quando ocorre algum dano celular. Isto ocorre por diferentes vias, que podem inibir a sua degradação, mantendo-a estável, em uma alta concentração, permitindo que execute sua principal função: ligar-se a seqüências específicas de DNA e ativar a expressão (transcrição) de genes adjacentes. Estes genes, direta ou indiretamente, promovem a morte celular ou a inibição da divisão celular. (56,58)

Uma vez que a proteína p53 mutante adota uma conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem (não-mutante), de meia-vida curta, é possível detectá-la por meio de ensaios de imunistoquímica em tumores. (56)

Existem pelo menos três vias independentes para a sua ativação: (48,58)

1. Via ativada pelo dano ao DNA, como o causado pela radiação ionizante. A ativação desta via é dependente de proteínas quinases reparadoras do DNA, enzimas que incorporam grupos fosfato em outras proteínas. Duas das maiores quinases em questão são chamadas ATM (para *ataxia telangiectasia mutated*, nome relacionado à doença na qual esta enzima encontra-se mutada) e Chk2. (65) A ATM é estimulada por quebras na seqüência de DNA, enquanto a Chk2 é estimulada pela própria ATM. As proteínas de “checagem”, ATM, Chk1 e Chk2, identificam e sinalizam o dano no DNA, retardando a progressão ao longo do ciclo celular até o dano ser corrigido. Estas proteínas quinases fosforilam a proteína p53 na porção aminoterminal que se encontra próxima à região de ligação ao HDM2. (58,65) Isto sugere um modelo onde há um bloqueio da interação com o HDM2, responsável por sua degradação, levando à estabilização da p53. (58,63)

2. Sinais de proliferação celular exagerada ativam uma segunda via, mesmo na ausência de dano ao DNA, envolvendo a expressão de oncogenes, como Ras ou Myc. Os oncogenes estimulam a transcrição do gene INK4 ou a estabilização da proteína p14^{ARF}, que se liga ao HDM2 e inibe sua atividade. Neste caso, a ativação da p53 depende da proteína p14^{ARF}, produto do gene INK4 e ativada pela expressão de oncogenes. (69,70)

3. Uma terceira via induzida por drogas quimioterápicas, luz ultravioleta e inibidores de proteína-quinase. Esta via distingui-se das demais por não ser dependente dos genes intactos relacionados à ATM, Chk2 e INK4 (ou p14^{ARF}), podendo ao contrário envolver quinases chamadas ATR (*ataxia telangiectasia related*) e caseína quinase II. (48,71)

Como resultado de sua ativação, a proteína p53 selvagem adquire uma seqüência específica de ligação ao DNA, sendo responsável pela ativação da transcrição de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular (Figura 4), incluindo os genes *WAF1/CIP/P21* (*wild -type p53 activated fragment*) e *GADD45* (*growth arrest DNA damage*). (48,68) O gene *WAF1* codifica uma proteína denominada p21, um inibidor universal da atividade das CDKs. (48) Quando os níveis de p21 aumentam, esta proteína liga-se aos complexos ciclina-CDK (enzimas das quais a progressão do ciclo celular depende), fazendo com que percam a capacidade de fosforilar as proteínas da família RB (família da proteína supressora tumoral do retinoblastoma). (4, 56, 69) Assim, a proteína RB, na sua forma hipofosforilada, seqüestra o fator de transcrição E2F, necessário para a síntese de DNA celular, bloqueando a progressão do ciclo celular antes da fase S (G1/S). (56,58,69)

Além de inibir a atividade do complexo ciclina-CDK, a p21 também pode interferir diretamente com a síntese de DNA através da ligação ao PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), um fator essencial para a replicação do DNA. (56) O gene *GADD45* codifica uma proteína que, da mesma forma que a p21, inibe a síntese de DNA pela ligação ao PCNA. (56) Também o equilíbrio entre as proteínas BAX e Bcl-2 pode ser alterado pela p53 de maneira a favorecer a morte celular. A p53 aumenta os níveis de expressão da proteína BAX (envolvida na indução da apoptose) e diminui o nível da expressão da Bcl-2 (proteína antiapoptótica). (56) A p53 ativa diretamente inúmeros genes envolvidos com reparo ao dano no DNA,

incluindo o gene redutase ribonucleotídeo (p53R2). (48,58) Outro alvo importante da p53 é o gene maspin, que inibe angiogênese, invasão e metástases. (48)

A proteína p53 promove a síntese de seu próprio regulador negativo, ligando-se a uma região regulatória do gene codificador do seu antagonista, o proto-oncogene HDM2 (a forma humana do gene *murine double minute 2 protein (mdm2)*) e estimulando a transcrição deste gene para RNA mensageiro, a partir do qual é feita a tradução da proteína HDM2. (56,58,61,63,66) A proteína HDM2 funciona como uma ubiquitina-ligase, liga-se à p53 e estimula a adição de grupos ubiquitina na porção carboxiterminal da p53, causando a sua degradação por um processo chamado proteólise ubiquitina-mediado. (48,58,61,72) Assim, há uma diminuição da concentração de p53, reduzindo a transcrição do gene HDM2, fechando a alça de *feedback*, permitindo que os níveis de p53 elevem-se novamente, reiniciando o ciclo. (58,66)

A proteína HDM2, como um componente-chave na regulação da estabilidade da p53, também inibe a atividade transcricional da p53 e favorece a sua expulsão do núcleo. (48) A proteína p14^{ARF}, codificada pelo INK4a/ARF, é um inibidor da ligação do gene HDM2 à p53, sendo uma das vias descritas anteriormente de ativação da p53. Desta forma, a deleção ou mutação do gene INK4a é um mecanismo alternativo de inativação da p53. (48,66,69) Por isso, em alguns tumores, onde não foram detectadas mutações no TP53, o gene HDM2 pode ser encontrado amplificado e hiperexpresso, levando à degradação prematura da p53, sendo este processo observado em torno de 30% dos sarcomas de tecidos moles. (48)

Outro mecanismo que pode comprometer a função da p53 está presente nos carcinomas associados a vírus. A atividade transcricional e a capacidade de reconhecer seqüências específicas de DNA são reduzidas na presença de oncoproteínas produzidas por certos vírus, como o HPV, desencadeando o seqüestro e o aumento da degradação da proteína p53. (48,73)

A inativação da p53 leva a um aumento na freqüência das mutações e na instabilidade do genoma, que é uma característica comum às células tumorais. Tal instabilidade genética pode contribuir para alterações em oncogenes e outros genes supressores de tumor durante a progressão tumoral. Isto se deve ao fato de que as células com o DNA danificado, que possuem um alelo do TP53 mutado, continuarão a proliferar em vez de permanecerem na fase G1 do ciclo ou serem eliminadas por

apoptose. Dessa forma, os tumores desprovidos da p53 selvagem são supostamente mais suscetíveis à ocorrência de outras mutações deletérias e têm sido associados a um comportamento clínico mais agressivo. De fato, na maioria dos estudos sobre câncer de mama, observa-se que tanto o período de pré-recidiva quanto o período de sobrevivência estão, significativamente, reduzidos naqueles que apresentam mutações em TP53. (48,67)

A proteína p53 normal estimula a expressão de genes que previnem a neo-vascularização necessária para que ocorra expansão do tamanho tumoral, como o gene maspin, que inibe angiogênese, invasão e metástases. (74) A proteína maspin, pertencente à *serpin family member de inibidores da protease*, é um inibidor de angiogênese, inibindo invasão tumoral *in vitro* e metástases *in vivo*, encontrada expressa nas células mamárias normais e células epiteliais prostáticas. (75) Nas células, onde a p53 está inativada por mutações, há recrutamento de novos vasos, conferindo uma vantagem ao desenvolvimento tumoral. (58,75)

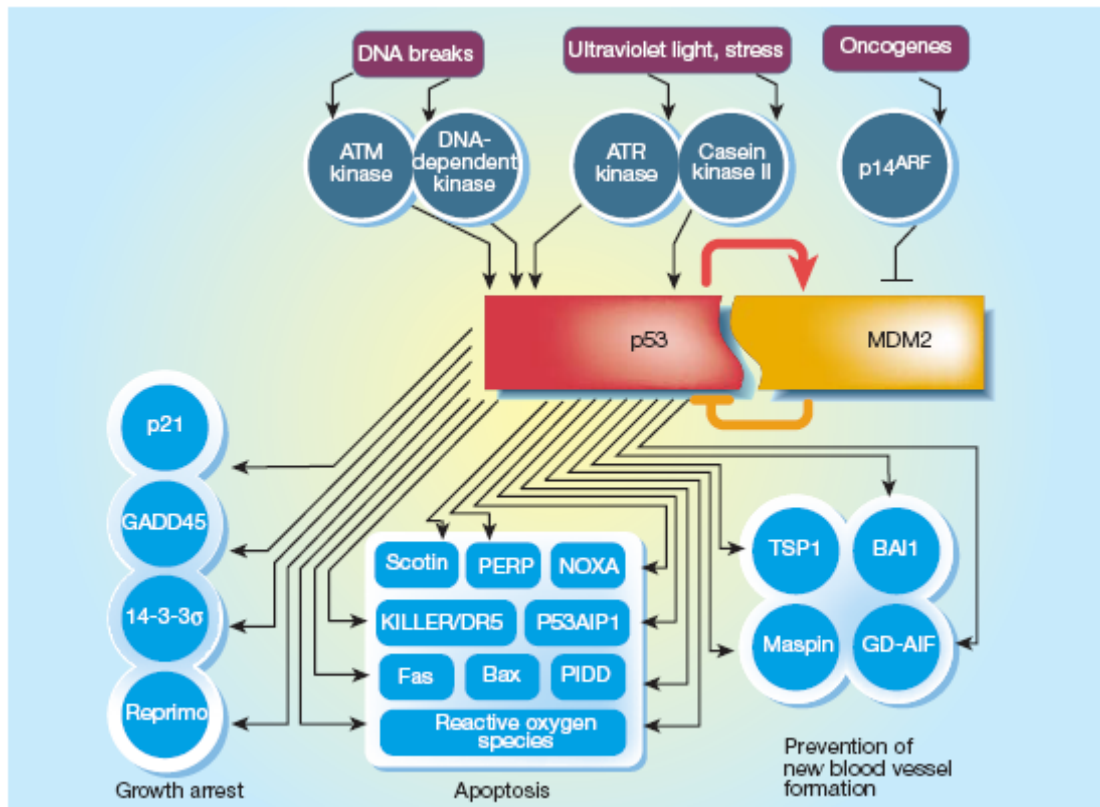


Figura 4: Ativação das vias relacionadas ao controle do ciclo celular, apoptose e inibição da angiogênese mediadas pela p53 em resposta a fatores estressantes (dano ao DNA, luz ultra-violeta e oncogenes). Vogelstein B, et al. Nature; 408:307, 2000.

2.2 CARCINOMA DE MAMA E O GENE TP53

O carcinoma de mama está associado a diferentes tipos de alterações genéticas somáticas, como mutações em oncogenes e genes supressores tumorais. (76) As mutações no gene TP53 são comuns no carcinoma de mama, sendo descritas em 20% a 50% dos carcinomas de mama esporádicos, com marcada heterogeneidade geográfica em nossa população, incluindo as lesões pré-invasivas. (14,55,77,78) 70% destes carcinomas esporádicos estão acompanhados da perda do alelo selvagem – perda de heterozigiosidade. (49,76) Além disto, 30% a 50% dos carcinomas de mama esporádicos apresentam acúmulo da proteína p53, medida pela imunohistoquímica. (55)

Dois estudos realizados no Brasil (Rio de Janeiro e São Paulo) encontraram uma frequência de mutações em TP53 de 17% e 20%. (2,78) Em um destes estudos, considerando o número pequeno de casos (120 pacientes), foi encontrada uma tendência, porém não estatisticamente significativa, entre a presença de mutação e tumores agressivos. (2) A agressividade do carcinoma de mama foi avaliada pelo grau histológico: formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. (2)

Um amplo espectro de mutações em TP53 é observado em pacientes portadores de mutações germinativas em BRCA1 e BRCA2. (48,79) Mutações em TP53 são encontradas em 100% dos carcinomas medulares de mama, o que desperta interesse, uma vez que estes carcinomas compartilham características clinicopatológicas similares aos casos de carcinomas associados a mutações em BRCA1. (48)

Os carcinomas com menores diâmetros estão mais sujeitos a terem seus mecanismos de apoptose preservados. A possibilidade de mutações em TP53 aumenta com o grau e estágio tumoral. Embora existam diferenças entre os tipos tumorais, em geral, a frequência de mutações em TP53 aumenta à medida que o tumor progride. (43)

Vários estudos têm sido realizados para avaliar o papel prognóstico e preditivo das alterações em TP53, no carcinoma de mama, com resultados conflitantes. A maioria das alterações encontradas são mutações de ponto, levando à síntese de uma proteína estável, mal-funcionante e não degradável, que se acumula nas células tumorais, podendo ser detectada pela imunohistoquímica. A

correlação entre o acúmulo da proteína p53, medida pela imunistoquímica, e a mutação em TP53, detectada pelo seqüenciamento é, entretanto, menor do que 75% nos carcinomas de mama. (80)

Sjögren et al. compararam o valor prognóstico do rastreamento de mutações em TP53 no carcinoma de mama utilizando imunistoquímica comparado ao seqüenciamento completo da região codificadora do gene TP53. Foi observado que em 33% dos carcinomas com alterações em TP53 identificadas pelo seqüenciamento, não houve correspondência com os resultados da imunistoquímica, sendo esta negativa. Enquanto que 30% dos carcinomas com imunistoquímica positiva foram negativos para mutações pelo seqüenciamento. A partir destes resultados, foi identificado que a imunistoquímica pode gerar resultados falso-positivos e falso-negativos. (81)

Outra razão para esta diferença é que nem todas as mutações produzem uma proteína estável e algumas mutações resultam em uma proteína truncada e por isso não detectada pela imunistoquímica. (64) Os primeiros estudos avaliando o papel das mutações em TP53 em relação ao prognóstico do carcinoma de mama foram baseados na análise imunistoquímica, sendo o valor preditivo e prognóstico encontrado fraco. (49) Entretanto, um forte significado prognóstico das mutações em TP53 tem sido relatado em estudos mais recentes usando seqüenciamento. A partir destes estudos, ficou confirmado que as mutações em TP53 conferem diminuição da sobrevida livre de doença e da sobrevida geral. Este achado é independente de outros fatores de risco. (49,64)

Lai et al. observaram que as mutações em TP53 estão associadas com carcinomas de mama com início mais precoce. Ao analisar os éxons 5-8 do TP53, a frequência geral de mutações, na amostra estudada de 199 mulheres com carcinoma de mama esporádico, foi de 63,8%, mais elevada do que a descrita em estudos anteriores, talvez pela inclusão de trocas de nucleotídeos que não levam à alteração em aminoácidos (mutações silenciosas). As pacientes com mutações em TP53 apresentaram um risco três vezes maior de desenvolver um carcinoma de mama com início mais precoce (OR 3,05; IC 95% 1,10 – 8,45), sendo mantida esta associação significativa quando consideradas apenas as mutações missense (OR 3,81; IC 95% 1,26 – 11,5). (77) Estas pacientes têm sete vezes mais chances de serem diagnosticadas com carcinoma de mama antes dos 41 anos (OR 7,56; IC 95% 2,22 – 25,8). (77)

As alterações em TP53 também estão associadas a outros fatores de pior prognóstico, como receptores de estrogênio e progesterona negativos, grau histológico ou nuclear elevados, aneuploidias, superexpressão de HER-2 e elevada proliferação celular. Nenhuma relação consistente foi encontrada com o tamanho tumoral. (55)

A expressão do fator endotelial de crescimento vascular (*vascular endothelial growth factor - VEGF*), uma citocina que induz proliferação e migração das células endoteliais, aumento da permeabilidade de microvasos e ativação de enzimas proteolíticas envolvidas com a capacidade de invasão tumoral, mostrou correlação com pior prognóstico e com mutações em TP53. (82) A proteína maspin, inibidora de angiogênese, tem sua transcrição diretamente induzida pelo TP53 selvagem, permitindo estabelecer uma conexão entre TP53 e a progressão dos carcinomas de mama ductais. (48) Um decréscimo ou ausência da expressão de maspin está associado à progressão do CDIS à carcinoma invasor, evoluindo a seguir para o estágio de metástases para linfonodos, demonstrando um importante papel na progressão tumoral. Este achado explica a maior suscetibilidade metastática em tumores com mutações em TP53. (75)

Potencial correlação entre mutações em TP53 e diferentes fenótipos clínicos no carcinoma de mama têm sido descritos, sendo que a maioria dos estudos associa a presença de mutações com menor sobrevida. (83) Sorlie et al. (2001), pela técnica de cDNA microarray, identificaram, em quase metade dos tumores estudados, mutações no gene TP53. Os subtipos HER-2 positivo e basal, associados a pior prognóstico, significativamente, foram aqueles com maior número de mutações, 71% e 82%, respectivamente. (52) Achado semelhante foi encontrado em outro estudo, chamando atenção para o provável papel deste gene na determinação da expressão gênica de vários subtipos tumorais. (52,84) O achado de mutações em TP53, em tumores com elevada expressão de HER2, apóia as observações prévias de interdependência entre TP53 e HER-2. (52)

Apesar das mutações em TP53 parecerem ser pobres preditoras de prognóstico, sua presença correlaciona-se a uma baixa resposta à terapia sistêmica. Mutações no gene TP53, afetando alguns domínios codificantes da proteína p53, estão associadas com resistência à terapia com doxirrubicina em pacientes com carcinoma de mama; entretanto, são necessários estudos prospectivos que possam confirmar a correlação entre estas mutações e a resistência à quimioterapia. (52,80)

Apesar de estudos intensivos, a origem do carcinoma de mama esporádico permanece ainda desconhecida. Estudos envolvendo o papel da exposição a carcinógenos específicos no carcinoma de mama têm encontrado associações fracas e inconsistentes. Uma comparação do espectro de mutações no gene TP53 em carcinomas de mama em 15 populações etnicamente e geograficamente diversas mostrou resultados significativamente distintos. (85) Esta diversidade, nos resultados da associação de mutações em TP53 com o carcinoma de mama, em diferentes populações, é consistente com uma contribuição significativa de uma diversidade de mutágenos exógenos, que ainda precisam ser identificados. Dados do banco do IARC apóiam esta hipótese de que uma fração das mutações, no carcinoma de mama, ocorre em consequência da exposição a fatores ambientais. (86)

Recentemente, a frequência de mutações em TP53 foi demonstrada diferir em carcinomas de mama de indivíduos carregando diferentes alelos do polimorfismo no códon 72 do gene TP53. Pacientes homozigotos para o alelo arginina apresentam uma frequência significativamente maior de mutações em TP53 em seus tumores quando comparadas aquelas homozigotas para o alelo prolina (28,5% versus 3,8%). Estes resultados sugerem uma vantagem seletiva de crescimento para células carregando um tipo de mutação TP53 no alelo Arginina (Arg72), o que pode aumentar o risco de transformação maligna e o desenvolvimento de câncer. (13)

Embora a incidência tenha aumentado ao longo dos últimos 20 anos, o prognóstico tem melhorado, em parte pelo diagnóstico mais precoce e como resultado do uso mais amplo da terapia sistêmica complementar. O uso da quimioterapia e da hormonioterapia adjuvantes, assim como, da radioterapia, tem aumentado a sobrevida, mas o sucesso da terapia sistêmica depende da identificação de pacientes sob risco para desenvolvimento de doença disseminada. Por isso, torna-se importante identificar marcadores que possam predizer a agressividade tumoral e a resposta à terapia adjuvante. (49)

2.3 POLIMORFISMO NO GENE TP53 E O CARCINOMA DE MAMA

Os polimorfismos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) constituem uma alteração genética que pode determinar a suscetibilidade de um indivíduo ao

desenvolvimento de tumores. Os SNPs são variações de um único nucleotídeo que ocorrem entre as seqüências de DNA de dois indivíduos. São exatamente estas variações que determinam as diferenças fenotípicas entre os indivíduos. O que diferencia um SNP de uma mutação é a freqüência com que o mesmo ocorre na população, sendo considerado um SNP toda variação de um único nucleotídeo que ocorre em mais de 1% da população. (87)

Outra diferença é o caráter deletério da alteração. Mutações geralmente estão relacionadas a um fenótipo grave, uma disfunção evidente. Já os SNPs não necessariamente estão associados a um fenótipo característico, algumas dessas alterações ocorrerão em seqüências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções. Outras ocorrerão em seqüências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. (6) Deste modo, alguns casos de polimorfismo genético podem aumentar a suscetibilidade ao câncer, que pode ser agravada por fatores externos. (57)

Testes que avaliem a presença de determinados SNPs associados ao desenvolvimento de tumores podem ajudar na prevenção da doença, principalmente nos casos em que o surgimento da mesma está estreitamente relacionado à exposição a fatores de risco. Inúmeros estudos vêm buscando demonstrar uma associação entre polimorfismos em TP53 e o risco de câncer em geral, alguns enfocando o carcinoma de mama, com resultados divergentes e inconclusivos. (49)

Além das mutações associadas ao câncer, alguns estudos têm enfatizado o polimorfismo do TP53 como um fator de risco para doenças malignas, inclusive o carcinoma de mama. (88) Pelo menos 14 polimorfismos têm sido localizados tanto em regiões codificantes quanto em não-codificantes do gene, cinco destes ocorrendo em éxons, sendo o mais comum o polimorfismo arginina (Arg) / prolina (Pro), no códon 72 (R72P). (49, 57)

Na população humana, o gene TP53 é polimórfico no códon 72 da proteína que ele codifica, ao nível do nucleotídeo 215, com um par de base variável (g.215 G>C) no éxon 4, que resulta na substituição de prolina por arginina na seqüência protéica. (4,10,62) Sendo assim, TP53 pode conter um códon arginina (CGC) ou prolina (CCC) nesta posição, que podem estar envolvidos na suscetibilidade e predisposição ao câncer, sendo possível identificá-los pelo uso de enzimas de restrição. (12,57,89) Dessa forma, os alelos dos polimórficos no códon 72, localizados no éxon 4, codificam um aminoácido arginina (CGC; Arg72) com uma

cadeia básica de carga positiva e um resíduo de prolina (CCC; Pro72) com uma cadeia alifática não-polar. (13,90,91)

O polimorfismo no códon 72 do gene TP53 parece influenciar a expressão do gene TP53, uma vez que a substituição ocorre dentro do domínio de transativação. O códon 72 está localizado na região hidrofóbica da proteína, determinando sua conformação, capacidade de ligação ao DNA e atividade de transcrição de outros genes, essencial para sua função como supressora tumoral. (4)

TP53 com alelo Pro72 é estruturalmente diferente do TP53 com alelo Arg72, e isso se reflete na sua mobilidade eletroforética alterada. TP53 com Arg72 migra mais rapidamente no gel do que o TP53 com Pro72. É também observado que tumores contendo células com Pro72 TP53 têm surgimento mais lento e são menores do que tumores com células Arg72 TP53. O alelo Arg72 é mais suscetível à degradação pela proteína E6 do papilomavírus humano (HPV) tipos 16 e 18. Além disso, Arg72 suprime efetivamente a transformação celular e é mais eficiente que o Pro72 em induzir apoptose (Tabela 4). (68,92,93)

Tabela 4

Comparação das atividades biológicas dos dois alelos polimórficos no códon 72 do gene TP53

Atividades biológicas	Arg72	Pro72
Sensibilidade a proteína E6 do HPV	Sensível	Resistente
Indução da apoptose	Elevada	Moderada
Interação com a proteína p73 (no caso de p53 mutante)	Elevada	Baixa
Associação com resposta ao tratamento	Pobre	Melhor
Atividade transcricional	Baixa	Elevada
Ligação ao DNA	Idêntica	Idêntica

Adaptada de Hainaut P and Wiman KG. *25 Years of p53 Research*. 2005. p.270, cap 12.

A presença do alelo Pro72 mostrou associação com o diagnóstico de carcinoma de mama em idade precoce entre portadoras de mutações em BRCA1 ($P = 0,005$), sugerindo que o polimorfismo R72P possa ser um modificador da penetrância de BRCA1. (62) A associação da proteína p53 mutante, contendo o

polimorfismo Arg72 com a proteína p73, interfere na atividade transcricional da p73 e, por consequência, na sua habilidade de induzir apoptose. (64,91) Como a p73 é fosforilada em resposta ao tratamento quimioterápico com cisplatina, é possível que a ligação descrita afete a sensibilidade a esta droga. (64) Ambas as formas polimórficas podem aumentar a carcinogênese, mas a forma Arg72 TP53 é considerada mais oncogênica. (4,12)

Langerod et al. observaram que pacientes homozigotas para o alelo Arg72 apresentaram significativa maior frequência de mutações no gene TP53, em seus tumores do que as homozigotas para o alelo Pro72 (28,5% vs 3,8%). Ao contrário dos casos de carcinoma de mama, nenhuma diferença na frequência de mutações entre os dois genótipos homozigotos foi encontrada nos carcinomas colorretal. (13)

A observação da ocorrência de mutações em TP53 no alelo Arg72, nos carcinomas de mama, sugere que esta combinação oferece às células epiteliais da mama uma vantagem de crescimento, a qual pode aumentar o risco de transformação maligna e desenvolvimento de câncer. (13) A coexistência de Arg72 com uma mutação pode modificar a estrutura da proteína p53 de forma a interferir tanto na habilidade desta em obter uma seqüência específica de ligação ao DNA ou com a capacidade de interação e recrutamento para transcrição, causando uma alteração no padrão de transcrição. (13) Outra possibilidade é que o Arg72 pode modificar a habilidade da proteína p53 mutante em ligar-se e interagir com outras proteínas, interferindo na apoptose induzida pelo TP53. (13) Como base para este fenômeno, foi identificado que as mutações associadas ao alelo Arg72 são capazes de inativar a apoptose dependente do p73 e, no caso dos carcinomas de cabeça e pescoço, a presença do alelo arginina mutado parece estar relacionada à diminuição da sensibilidade à terapia sistêmica. (94)

A frequência do polimorfismo R72P varia de 26% a 35%. (62) Este polimorfismo apresenta uma distribuição étnica e geográfica bastante variável (4) e tem sido estudado quanto a sua frequência e associação com a carcinogênese de vários carcinomas humanos, como cervical (95,96), de pulmão (97,98), colorretal (6), de bexiga (99), de pele (100) e também o carcinoma de mama, com resultados controversos. (4,12,14,101,102,103)

A presença do genótipo Arg/Arg tem sido descrita como fator de risco significativo no desenvolvimento dos carcinomas de bexiga e cervical associado ao

HPV. (95,99) Foram encontradas evidências de que o genótipo Pro/Pro está associado ao aumento do risco de desenvolver carcinomas de tireóide e de pulmão, neste a presença do alelo Pro72 parece ser também um marcador de pior prognóstico. (97,104) Estes resultados contrastam com outro estudo envolvendo carcinoma de pulmão, em diferentes populações, onde não foram observadas diferenças entre os genótipos do polimorfismo R72P e pacientes (98), assim como em outros estudos envolvendo carcinoma colorretal e esôfago de Barret. (6,105,106)

Foram encontradas correlações deste polimorfismo com infecção pelo HPV associada ao carcinoma cervical uterino, carcinoma de mama, ovário, esôfago, bexiga, pulmão e cólon, ainda com alguns resultados inconsistentes em relação aos carcinomas de mama e colorretal.(4,13,90,91)

Estudos *in vitro* indicam que a proteína p53 contendo arginina está mais propensa a sofrer degradação pela oncoproteína HPV E6. (96) Estudos *in vivo* também demonstraram uma diferença na suscetibilidade das duas formas polimórficas da p53 à degradação mediada pela proteína E6: E6 dos HPV-16 e HPV-18 é mais efetiva em degradar a proteína p53Arg do que p53Pro *in vivo*; E6 do HPV-11 é menos ativa com p53Arg e inativa com p53Pro. (95)

Storey et al. através de seus resultados indicam que p53Arg pode representar um fator de risco para a carcinogênese associada ao HPV. Nos carcinomas cervicais, cuja etiologia esta ligada a certos tipos de HPV, existe uma maior frequência de homozigotos para Arg comparado à frequência de heterozigotos e homozigotos para Pro. Assim, indivíduos homozigotos para Arg são sete vezes mais propensos a desenvolver um carcinoma cervical associado ao HPV. (95)

Através dos resultados de vários estudos, tem sido sugerido que o genótipo homozigose para Arg (Arg/Arg) pode representar um fator de risco potencial na carcinogênese da mama. (49) Papadakis et al. avaliaram a associação do polimorfismo R72P com carcinoma de mama. Em 56 pacientes gregas com carcinoma de mama e 61 controles, a frequência do genótipo Arg/Arg observada nas pacientes com carcinoma de mama (62%) foi significativamente maior que no grupo controle (20%), indicando que homozigose para o alelo Arg72 pode representar um possível risco para a carcinogênese da mama. (12) O genótipo heterozigoto Arg/Pro apresentou uma frequência de 18% no carcinoma, enquanto esta foi de 67% no grupo controle. (12)

Kalemi et al., a partir de um grupo de 42 pacientes com carcinoma de mama e 51 controles no norte da Grécia, demonstraram que a frequência do genótipo e dos alelos foi significativamente diferente entre casos e controles (OR 6,66; $P = 0,0001$; IC 95% 2,63 – 16,9). (91) Seus resultados indicaram que homozigose para Arg72 pode representar um possível fator de risco para o carcinoma de mama, em concordância com os resultados de Papadakis et al. (12,49,91)

Buyru et al. avaliaram um grupo de 115 pacientes turcas com carcinoma de mama e um grupo controle de 76 indivíduos saudáveis. Uma prevalência significativamente maior de homozigose para o alelo Arg72 foi observada nas pacientes com carcinoma de mama quando comparadas ao grupo controle ($P = 0,017$). (4) A análise estatística sugere forte associação entre o genótipo Arg/Arg e o carcinoma de mama (OR 3,05; $P = 0,017$; IC 95% 1,19 – 7,8). (4)

Ohayon et al. avaliaram indivíduos judeus de etnias diferentes (Ashkenazi e não-Ashkenazi) com carcinoma de mama. Encontraram uma significativa diferença na distribuição do genótipo entre controles e os dois grupos de judeus, sendo o genótipo homozigoto para Arg72 significativamente o mais freqüente associado com a ocorrência de carcinoma de mama: Ashkenazi ($P = 0,0125$) e não-Ashkenazi ($P = 0,00052$). (93)

Ohayon et al. não detectaram mutações germinativas nos éxons 4 – 9 do gene TP53 entre as mulheres judias que não apresentavam as mutações predominantes deste grupo em *BRCA1/BRCA2*. Isto indica que provavelmente as mutações germinativas em TP53 contribuem pouco para o aumento de risco para carcinoma de mama nessas famílias, a menos que façam parte de grupos com fenótipo para a Síndrome de Li-Fraumeni ou Li-Fraumeni-like, rara síndrome de câncer familiar caracterizada por elevada incidência de carcinoma de mama e outras neoplasias. (93) Pacientes com mutação em BRCA2 com um polimorfismo homozigoto para prolina ou heterozigoto, tendem a ser diagnosticados em idade mais jovens. (102)

Burbano et al. avaliaram a presença de mutações nos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene TP53 em mulheres jovens (17 – 36 anos) com história familiar de carcinoma de mama do Pará, Brasil. A partir desta análise, evidenciaram que a carcinogênese do carcinoma de mama familiar pode estar relacionada a outras etiologias genéticas ou a outras regiões em TP53 não analisadas em seu estudo, os éxons 5, 6, 7 e 8. (8)

As mutações germinativas em TP53 parecem ser causa rara de carcinoma de mama hereditário, embora estejam associadas ao carcinoma de mama com início precoce. (8)

Tommiska et al. não encontraram associação do polimorfismo R72P com aumento do risco de carcinoma de mama, nem mesmo ao estratificar os casos em esporádicos e familiares. (102) Pacientes com carcinoma de mama esporádico homozigotos para Pro72 apresentaram significativamente maior frequência de carcinomas lobular invasor e grau 1, enquanto aquelas com alelo Arg72 apresentaram maior frequência de carcinomas ductal invasor e grau 3. (102) Pacientes homozigotos para prolina parecem ter significativamente menor sobrevivência do que homozigotos para arginina independente do tipo histológico ($P = 0,003$). (102)

No mesmo estudo, análises multivariadas mostram que o diagnóstico homozigoto para Pro72 foi um fator prognóstico independente, com aumento em duas vezes no desfecho morte. (102) Este achado pode ser sustentado pelo fato da presença do alelo arginina tornar p53 selvagem uma indutora mais potente de apoptose, sugerindo que o genótipo Arg/Arg possa ter uma resposta mais favorável à radiação ou à quimioterapia. (102) Este efeito favorável do alelo arginina pode ser perdido ao ocorrer uma mutação somática neste alelo, em TP53, explicando a redução da sobrevivência, em pacientes heterozigotas com carcinoma de mama, ao ocorrer a retenção do alelo Arg72 mutado associada a perda de heterozigosidade no tecido tumoral. (102)

Siddique et al., comparando a expressão alélica entre asiáticos (chineses) e caucasianos (poloneses) saudáveis, encontraram uma maior frequência de homozigotos para arginina entre caucasianos e, entre asiáticos, uma maior frequência de homozigotos para prolina. (88) Também observaram que chineses heterozigotos expressam preferencialmente o alelo prolina, sendo que poloneses heterozigotos expressavam, em geral, o alelo arginina. Os resultados deste estudo mostraram um aumento significativo no número de alelos Arg72 expressos ($P < 0,001$) entre as mulheres chinesas com carcinoma de mama. (88) Não foi encontrada diferença significativa na frequência dos genótipos homozigotos entre casos e controles ($P = 0,096$), sugerindo a possibilidade de que o alelo Arg72 possa não estar funcionalmente envolvido, mas sua expressão possa simplesmente relacionar-se à carcinogênese. (88)

Na maior parte dos casos, o alelo Arg72 não se encontra mutado, sugerindo não haver necessidade de que ocorra uma mutação neste alelo para o desenvolvimento do carcinoma nesta população chinesa, sendo considerado o alelo em TP53 para suscetibilidade ao câncer. (88) Em outra análise, embora limitada pelo pequeno tamanho da amostra, os resultados indicam que os tumores HER-2 positivos contêm maior expressão do alelo Arg72. (88)

Em estudo realizado no sul do Brasil, envolvendo 118 pacientes com carcinomas de mamas ductal invasor, lobular invasor e carcinoma intraductal, Damin et al. identificaram associação do genótipo Arg/Arg com o risco de carcinoma de mama (OR 2,9; IC 95% 1,43 – 3,6; $P < 0,002$). A frequência relativa de cada alelo foi 0,75 para Arg72 e 0,25 para Pro72 entre as pacientes, e 0,62 para Arg72 e 0,38 para Pro72 entre os controles normais ($P < 0,001$). (107) Não houve diferença significativa entre o genótipo e características clínico-patológicas do carcinoma de mama. (107) Estes achados estão de acordo com estudos envolvendo mulheres com carcinoma de mama da Grécia e Turquia. (4, 12) Os autores avaliam que a análise de perda de heterozigossidade a partir do tecido tumoral pode aumentar a prevalência de TP53 homozigotos e potencializar esta associação entre homozigose para arginina e o desenvolvimento do carcinoma de mama. (107)

Noma et al., em estudo com 191 pacientes japonesas com carcinoma de mama, observaram que o genótipo homozigoto para Pro72 foi significativamente associado com maior risco para carcinoma de mama receptor estrogênio positivo (OR = 2,04, $P = 0,04$), não havendo esta associação com carcinoma de mama receptor estrogênio negativo. (108) Esta associação permanece significativa para mulheres na pós-menopausa (OR = 3,42; $P = 0,01$). Neste mesmo grupo, foi observada maior frequência de mutações somáticas na presença de homozigose para Arg72, quando comparada ao genótipo homozigose para Pro72. Este achado é consistente com a tese de que a função do gene TP53 quando homozigoto para Pro72 está alterada a tal modo, não sendo necessária outra alteração no gene como ocorre em TP53 homozigoto para Arg72. (108)

O polimorfismo R72P também foi associado com melhora da sobrevida em pacientes inglesas com carcinoma de mama, naqueles casos apresentando o alelo Pro72, apesar de não haver diferença significativa entre os genótipos ($P = 0,056$). (15) Ao considerar heterozigotos e homozigotos para prolina juntos comparados ao genótipo homozigoto para arginina, houve diferença significativa (HR

0,68; IC 95% 0,50 – 0,94; $P = 0,018$). A inclusão de outras variáveis prognósticas neste modelo reduziu o efeito protetor (HR 0,78; IC 95% 0,52 – 1,15). (15)

Själänder et al., em uma população da Suécia, demonstraram que o alelo Pro72 apresenta forte associação com o carcinoma de mama, sendo esta associação mais pronunciada em carcinomas histologicamente bem diferenciados - grau 1 ($P = 0,033$). (14) Esta associação se mostrou mais forte que a combinação de haplótipos neste estudo. (14)

Alguns polimorfismos têm sido analisados em associação ao polimorfismo R72P no gene TP53 (éxon 4), dois destes são os polimorfismos nos íntrons 3 e 6, sendo os mais estudados como possíveis modificadores da suscetibilidade ao câncer, apresentando resultados conflitantes. (57,103) A combinação destes três polimorfismos foi estudada por Buyru et al. em 115 pacientes turcas com carcinoma de mama esporádico e 63 controles. (103) A frequência do alelo Arg72 foi maior nas pacientes com carcinoma de mama, mas esta diferença não se mostrou significativa ($P = 0,172$). Não houve diferença significativa dos haplótipos (13 combinações possíveis de genótipos) entre pacientes e controles ($P = 0,315$); no entanto, o haplótipo íntron 3 (+16bp)/éxon 4 (Arg)/íntron 6 (G) foi mais freqüente nas pacientes do que nos controles. (103)

Mabrouk et al., em estudo envolvendo 30 pacientes com carcinoma de mama da Tunísia e 49 controles, não observaram diferença na distribuição das frequências dos genótipos entre casos e controles ($P = 0,1$), talvez pelo pequeno tamanho da amostra. (109) Entretanto, foi detectada uma discreta associação do estado homozigoto com o risco de desenvolver carcinoma de mama ($P = 0,04$). (109) Este mesmo estudo também não identificou diferença na distribuição das frequências dos genótipos entre 47 pacientes com carcinoma de bexiga e 34 controles ($P = 0,8$). (109) Da mesma forma, Susptisin et al. não encontraram diferença na distribuição das frequências dos genótipos e alelos entre 448 pacientes russas com carcinoma de mama e 249 controles. (110) Nenhum dos alelos ou genótipos estudados mostrou relação com características clínicas do carcinoma de mama. (110)

O estado dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais significativo no carcinoma de mama e qualquer fator associado com metástases para linfonodos está também associado com sobrevida. (92) Han W et al. demonstraram que o polimorfismo R72P está associado com o estado de comprometimento metastático

dos linfonodos axilares. Casos com genótipos Arg/Pro ou Pro/Pro apresentam menor comprometimento metastático dos linfonodos axilares do que aqueles Arg/Arg (OR 0,68; IC 95% 0,49 – 0,94). (92)

A freqüência dos genótipos no códon 72 do gene TP53 varia de acordo com o grupo étnico e localização geográfica. (12,14,88) A freqüência do alelo Arg aumenta à medida que os grupos populacionais afastam-se do equador. (4,68,88) Além disso, o polimorfismo R72P parece estar sujeito à seleção natural influenciada por fatores ambientais, como o grau de exposição ao componente UV-B da luz solar, da mesma forma que sua freqüência gradualmente muda com a latitude. (110)

O polimorfismo R72P do gene TP53 parece, além de estar associado ao risco de desenvolver carcinoma de mama, poder determinar sua progressão, e como resultado afetar seu fenótipo e prognóstico. (92,102) A influência deste polimorfismo sobre a evolução do carcinoma de mama depende de análises a longo prazo. (92)

A perda freqüente de ambos os alelos de um locus ou a perda de um alelo com inativação funcional de outro tem sido detectada em muitos tipos de tumores. Estas lesões, manifestadas pela perda da heterozigidade (LOH - *Loss of Heterozygosity*), têm sido descritas como um marcador na presença de genes supressores tumorais. (111,112)

2.4 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE

A perda de heterozigidade (LOH – loss of heterozygosity) é um evento comum e precoce na maioria dos cânceres. Este termo é utilizado para descrever a inativação do segundo alelo de um gene de supressão tumoral. (111) A perda de heterozigidade é uma característica de vários tumores, tanto herdáveis quanto esporádicos, e, geralmente, é considerada uma evidência da existência de um gene supressor tumoral, mesmo quando este gene é desconhecido. Localizar as regiões onde se observam inativação de alelos nos diversos tipos de cânceres esporádicos é uma das estratégias de identificação de um gene supressor tumoral. (112,113)

Em muitos casos, as mutações no gene TP53 são acompanhadas pela perda do alelo selvagem no gene TP53 localizado no braço curto do cromossomo 17, o que leva o gene TP53 a ser visto como um gene supressor tumoral clássico com uma mutação em um alelo e posterior perda de heterozigidade pela inativação do segundo alelo. (10, 112)

Para podermos avaliar a perda de heterozigidade comparamos as alterações encontradas no tecido normal com as encontradas no tecido afetado em um mesmo indivíduo. Uma vez que as células do sangue deste indivíduo quase sempre, excetuando-se os casos de neoplasias hematológicas, serão representativas do tecido normal, a extração de DNA para esta análise pode ser feita a partir da coleta de sangue periférico do indivíduo que contém ambos os alelos. (111,114)

Baccouche et al. descreveram um método mais acurado para detecção do polimorfismo no códon 72 e LOH do TP53. (114) Este método é baseado na digestão de um fragmento amplificado por PCR do éxon 4 e 6 pela enzima de restrição *AccII*. O fragmento amplificado contém dois sítios de restrição para *AccII*: o primeiro, localizado no éxon 4, é polimórfico, enquanto que o segundo, no éxon 5, não é polimórfico, sendo utilizado como controle interno da digestão. (114)

A partir do polimorfismo R72P no gene TP53, a perda de heterozigidade em TP53 pode ser avaliada comparando-se o genótipo em TP53 no tecido tumoral e nas células sangüíneas, entre as pacientes heterozigotas Arg/Pro. A amplificação do fragmento de éxon 4 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA extraído do sangue, seguida da sua digestão com a enzima de restrição *AccII*, leva a geração de três fragmentos no indivíduo heterozigoto, enquanto que a mesma digestão do material obtido a partir do tecido tumoral pode levar a identificação da perda de um alelo, pelo não aparecimento dos três fragmentos e sim, um ou dois, dependendo do alelo perdido, arginina ou prolina respectivamente. (114)

Uma vez que a avaliação da perda de heterozigidade depende da comparação entre células tumorais e tecido normal correspondente ou células sangüíneas para detecção de deleções genéticas, torna-se essencial isolar apenas as células tumorais para extração do DNA. Entretanto, a natureza infiltrante da maioria dos carcinomas sólidos invasivos, incluindo o carcinoma de mama, leva à “contaminação” deste material por células normais, criando um problema na análise de perda de heterozigidade. (114,115) Para solucionar este problema, a microdissecção manual ou, ainda mais precisa, a microdissecção e captura a laser (MCL) podem ser utilizadas. (115) A MCL é uma técnica de desenvolvimento recente que permite a coleta de células individuais ou pequeno conjunto de células para análise molecular. (116)

Estudo avaliando a perda de heterozigidade no gene TP53, em amostras de pacientes com carcinoma de mama, detectou perda de heterozigidade em 52% dos casos. Houve forte associação da perda de heterozigidade em TP53 com grau histológico indiferenciado ($P < 0,001$) e pior grau nuclear ($P < 0,007$). (112)

O polimorfismo no códon 72 do gene TP53 pode afetar a função de mutações neste gene, conferindo uma vantagem de crescimento para tumores nos quais as mutações ocorrem no gene TP53 polimórfico para o alelo arginina no códon 72. (13) Estudos recentes demonstraram que o alelo arginina é preferencialmente conservado no tecido neoplásico daqueles pacientes heterozigotos (Arg/Pro) para o polimorfismo R72P, afetados por carcinomas comuns, como de vulva, esôfago, trato urinário e pulmão. (89)

Bonafé et al. analisaram a perda de heterozigidade em 67 pacientes com carcinoma invasor de mama, comparando o DNA obtido a partir do tecido tumoral com o obtido de linfonodos sem evidência de metástases. Das 29 pacientes heterozigotas Arg/Pro, 9 apresentaram perda de heterozigidade no tecido tumoral: em 7 casos, o alelo retido foi arginina e, em 2 casos, o alelo prolina foi retido. Ao analisar o grupo de pacientes que conservaram o alelo arginina no tecido tumoral ($n = 7$) em comparação com as 58 pacientes que não sofreram alteração do genótipo entre o tecido do linfonodo livre de tumor e o tecido tumoral, a sobrevida entre estes dois grupos foi significativamente diferente após 8 a 10 anos de seguimento. (89) Foi observada uma extrema redução na sobrevida livre de doença (14,3% x 65%; $P = 0,003$) e na sobrevida geral (28,6% x 68,3%; $P = 0,005$). Não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros clínicos e patológicos entre os dois grupos. (89)

OBJETIVOS

1. Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo R72P do gene TP53, em pacientes com câncer de mama ductal invasor, acompanhadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), comparando-as com as frequências na população de doadores do Banco de Sangue do HCPA (frequências estabelecidas em estudo prévio realizado pelo Serviço de Genética do HCPA);
2. Relacionar a presença deste polimorfismo com características clínico-patológicas (idade do diagnóstico, menopausa, uso de terapia hormonal, história familiar de câncer, grau histológico, positividade de receptores estrogênicos, invasão angiolímfática) em pacientes com câncer de mama ductal invasor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *The Lancet*. v. 365, p. 1727-1741, 2005.
2. Moura-Gallo CV, Simão TA, Ribeiro FS, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LEB, Mendonça GAS. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 2, p. 167-175, 2004.
3. Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 07 Jan. 2008.
4. Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncology Reports*. v. 10, p. 711-714, 2003.
5. Folgueira MAAK, Brentani MM. Câncer de Mama. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p 135–144. cap. 13.
6. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDC, Forones NM. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol.*, v. 43, n. 1, p. 8-13, Jan./Mar. 2006.
7. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, Nov. 1990.
8. Burbano RR, Medeiros AC, Mello AA, Lemos JA, Bahia MO, Casartelli C. Investigation of single-strand conformational polymorphism of the TP53 gene in women with a family history of breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 22, p.1325-1328, 2000.
9. Oliver M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research*. v. 63, p. 6643-6650, Oct. 2003.
10. Hainaut P, Wiman KG. *25 Years of p53 Research*. New York: Springer, 2005.
11. Siddique M, Sabapathy. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*. v. 25, p. 3489-3500, 2006.

12. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Molecular Cell Biology Research Communications*; 3:389-392, 2000.
13. Langerod A, Bukholm IRK, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA, Borresen-Dale AL. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 11, p. 1684-1688, 2002.
14. Sjölander A, Birgander R, hallmans G, cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G, Beckman L. p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*. v. 17, n. 6, p. 1313-1316, 1996.
15. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BAJ, Easton DF, Pharoah PPD. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Research*. v. 62, p. 3052-3057, Jun. 2002.
16. Sainsbury JRC, Anderson TJ, Morgan DAL. ABC of breast diseases: breast cancer. *British Medical Journal*. v. 321, p. 745-750, Sep. 2000.
17. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B et al. The pathology of invasive breast cancer: A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). *Cancer*. v. 36, p.1-85, Jul. 1975.
18. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Prognostic factors in invasive carcinoma of the breast. *Clinical Oncology*. v. 10, p. 14-17, 1998.
19. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer – epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal*. v. 321, p. 624-628, Sep. 2000.
20. Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology. The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res*. v. 6, p. 213-218, 2004.
21. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med*. v. 9, n. 1, p. 208-221, 2005.
22. Viale G. Histopathology of primary breast cancer 2005. *The Breast*. v. 14, p. 487-492, 2005.
23. Fisher B, Slack NH, Bross IDJ. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer*. v. 24, p. 1071-1080, 1969.
24. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, et al. Prognostic factors in breast cancer. *College of American*

- Pathologists Concensus Statement Arch Pathol Lab Med. v. 124, p. 966-975, Jul. 1999.
25. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *European Journal of Cancer* v. 37, p 591-596, 2001.
 26. Hellman S, Harris J. História natural do câncer de mama. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Doenças da Mama*. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002. p. 489-508. cap 29.
 27. Rampaul RS, Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management: The Nottingham Breast Team. *European Journal of Surgical Oncology*. v. 27, p. 229–238, 2001.
 28. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 31, p. 209-223, 1999.
 29. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro- and macrometastases. *Cancer*. v. 42, n.4, p. 2032-2038, Oct. 1978.
 30. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer*. v. 63, p. 181-187, 1989.
 31. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J. Clin. Oncol*. v.12, n. 5, p. 888-894, May, 1994.
 32. Cianfrocca M, Goldstein L. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. V. 9, p. 606-616, 2004.
 33. Viale G. Histopathology of primary breast cancer 2003. *The Breast*. v. 12, p. 391-396, 2003.
 34. Pinder SE, Ellis IO, Elston CW. Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J. Clin. Pathol*. v. 48, p. 981-983, 1995.
 35. Okugawa H, Yamamoto D, Uemura Y, Sakaida N, Yamada M, Tanaka K, Kamiyama Y. Prognostic factors in breast cancer: the value of the Nottingham Prognostic Index for patients treated in a single institution. *Surg. Today*. v. 35, p.907-911, 2005.

36. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* v. 22, n. 3, p. 207-219, 1992.
37. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* v. 56, p. 37- 47, 2006.
38. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
39. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* v. 16, n.3, p. 481-488, Mar. 2005.
40. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet.* v. 20, n. 355, p. 1822, May 2000.
41. Schairer 2004 Schairer C, Mink PJ, Carroll L, Devesa SS. Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* v. 96, n. 17, p. 1311-1321, Sep. 2004.
42. Fournier DV, Weber E, Hoeffken W, Bauer M, Kubli F, Barth V. Growth rate of 147 mammary carcinomas. *Cancer.* v. 45, p. 2198-2207, 1980.
43. Hellman S. Darwin's clinical relevance. *Cancer.* v. 79, n. 12, p. 2275-2281, Jun. 1997.
44. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* v. 194, p. 23-28, 1976.
45. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer.* v. 80, n. 9, p. 1740-1745, Nov. 1997.
46. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* v. 350, n. 14, p. 1430-1441, Apr. 2004.
47. Tanyi J, Tory K, Bánkfalvi A, Shröder W, et al. Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. *Pathology Oncology Research.* v. 5, n. 2, p. 90-94, 1999.
48. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* v. 4, p. 70-76, Fev. 2002.
49. Borresen-Dale. TP53 and breast cancer. *Human Mutation.* v. 21, p. 292-300, 2003.

50. O'Connel P, Pekkel V, Fuqua SAW, Osborne CK, Clark GM, Allred DC. Analysis of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 90, n. 9, p. 697- 703, May 1998.
51. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. v. 406, n. 6797, p. 747-752, Aug. 2000.
52. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 11, 98(19), p. 10869-74, Sep. 2001.
53. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 100, n. 14, p. 8418-8423. Jul. 2003.
54. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 100, n. 18, p. 10393-8. Sep. 2003.
55. Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. v. 32, p. 39-47, 1994.
56. Sidransky D. Clinical implications of the p53 gene. *Annu. Rev. Med.* v. 47, p. 285-301, 1996.
57. IARC Homepage – International Agency to Research in cancer – p53 polymorphisms. Disponível em: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>. Acesso em: 05 Nov. 2007.
58. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature*. v. 408, p. 307-310, 2000.
59. Donehower LA, Harvey M, Slage BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*; 356: 215-221, 1992.
60. Soussi T, Beróud C. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Human Mutation*. v. 21, p. 192-200, 2003.
61. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews*. v. 2, p. 594-604, 2002.

62. Martin A-M, Kanetsky PA, Amirimani B, Colligon TA, Athanasiadis G, Shih HA, Gerrero MR, Calzone K, Rebbeck TR, Weber BL. Germline TP53 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers: is *TP53* a modifier of *BRCA-1*? *J Med Genet.* v. 40:e34, p. 1-6, 2003.
63. Gallo CVM, Azevedo G, Mendonça S, Moraes E, Olivier M and Hainaut P: TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutation Research.* v. 589, p. 192 - 207, 2005.
64. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews.* v. 1, p. 233-240, 2001.
65. Carr AM. Cell cycle: piecing together the p53 puzzle. *Science.* v. 287, n. 5459, p. 1765-1766, 2000.
66. Sherr CJ. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research.* v. 60, p. 3689-3695, Jul. 2000.
67. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* v. 2, p. 103-112, Aug. 2002.
68. Levine AJ, Hu W and Feng Z: The p53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell Death and Differentiation.* v. 13, p. 1027-1036, 2006.
69. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumor suppression. *Nature Reviews.* v. 2, p. 731-737, Oct. 2001.
70. Sherr CJ, Weber J. The ARF/p53 pathway. *Current Opinion in Genetics & Development.* v. 10, p. 94-99, 2000.
71. Meek DW. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene.* v. 18, p. 7666-7675, 1999.
72. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene.* v. 242, p. 15-29, 2000.
73. Levine AJ. P53, the celllular gatekeeper for growth and division. *Cell.* v. 88, p. 323-331, Feb. 1997.
74. Hendrix MJC. De-mystifying the mechanism(s) of maspin. *Nature Medicine.* v. 6, n. 4, p. 374-376, Apr. 2000.
75. Zou Z, Gao C, Nagaich AK, Connell T, Saito S, Moul JW, et al. p53 regulates the expression of the tumor supressor gene maspin. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 275, n. 9, p. 6051-6054, Mar. 2000.
76. Oesterreich S, Fuqua SAW. Tumor supressor genes in breast cancer. *Endocrine Related Cancer.* v. 6, p. 405-419, 1999.

77. Lai H, Lin L, Nadji M, Lai S, Trapido E, Meng L. Mutations in the p53 tumor suppressor gene and early onset breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*. v.1, n. 1, p. 31-36, Jan. 2002.
78. Nagai MA, Barbosa HS, Zago MA, Silva WA, Nishimoto IN, et al. TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. *International Journal of Oncology*. v. 23, p. 189-196, 2003.
79. Gasco M, Yulug IG, Crook T. TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Human Mutation*. v. 21, p. 301-306, 2003.
80. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Research*. v. 61, p. 2256-2260, Mar. 2001.
81. Sjögren S, Inganäs, M., Norberg, T., Lindgren, A., Nordgren, H., Holmberg, L., Bergh, J. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst*. v. 88, n. 3/4, p. 173-182, Feb. 1996.
82. Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Research*. v. 61, p. 2256-2260, Mar. 2001.
83. Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. v. 6, p. 443-451, Feb. 2000.
84. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA et al. Race, Breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast cancer Study. *Jama*. v. 295, n. 21, p. 2492-2502, Jun. 2006.
85. Hill KA, Sommer SS. P53 as a mutagen test in breast cancer. *Env. Mol. Mutagenesis*. v. 39, p 216-227, 2002.
86. Oliver M, Hainaut P. TP53 mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis. *Cancer Biology*. v. 11, p. 353-360, 2001.
87. Weston A, Godbold JH (1997) Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. v. 105, n. 4, p. 919-926, 1997.

88. Siddique MM, Balran C, Fiszler-Maliszewska L, Aggarwal A, et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 14, n. 9, p. 2245-2252, Sep. 2005.
89. Bonafé M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C, Marzi E et al. Retention of the p53 codon 72 arginine is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clinical Cancer Research.* v. 9, p. 4860-4864, Oct. 2003.
90. Powell BL, Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns Els MJJ, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis.* v. 23, n. 2, p. 311-315, 2002.
91. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Letters.* v. 222, p 57-65, 2005.
92. Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW, Noh DY. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clinical cancer Research.* v. 10, p. 124-130, 2004.
93. Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Menachem TD, Barzilai SE, Friedman E. The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *British Journal of Cancer.* v. 92, p. 1144 -1148, 2005.
94. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* v. 3, p. 387-402, Apr. 2003.
95. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovanit F et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature.* v. 393, p. 229-234, May 1998.
96. Crook T, Ludwig RL, Marston N, Willkomm D et al. Sensitivity of p53 lysine to ubiquitin-directed degradation targeted by human papillomavirus E6. *Virology.* v. 217, p. 285-292, 1996.
97. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clinical Cancer Research.* v. 5, p. 129-134, 1999.

98. Pierce LM, Sivaraman L, Chang W, Lum A, Donlon T, Seifried A et al. Relationships of TP53 codon 72 and HRAS1 polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 9, p. 1199-1204, Nov. 2000.
99. Soultzizis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters*. v. 179, p. 175-183, 2002.
100. O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM, Mabruk MJEMF. P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J. Clin. Pathol.* v. 54, p. 539-542, 2001.
101. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCalies EC, Weston A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 11, p. 127-130, Jan. 2002.
102. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallita J et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clinical Cancer Research*. v. 11, n. 14, p. 5098-5103, 2005.
103. Buyru N, Altinisik J, Demokan S, Dalay N. p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detection and Prevention*. v. 31, p. 207-213, 2007
104. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LAC, Assumpção LVM, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid, *Cancer Letters*. v. 210, p. 151-157, 2004.
105. Sayhan N, Yazici H, Budak C, Dalay N. p53 codon 72 genotypes in colon cancer. Association with human papillomavirus infection. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. v. 109, p. 25-34, 2001.
106. Leistner-Segal S, Pilger DA, Segal F. TP53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett esophagus. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. v. 170, p. 76-77, 2006.
107. Damin APS, Frazzon APG, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C, Alexandre COP. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detection and Prevention*. v. 30, p. 523-529, 2006.
108. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in

- japanese women. *Cancer Letters*. v. 210, p. 197-203, 2004.
109. Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, Mokdad-Gargouri Raja et al. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in tunisian patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v. 1010, p. 764-770, 2003.
 110. Suspitsin EM, Buslov KG, Grigoriev MY, Ishutkina JG, Ulibina JM et al. Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int. J. Cancer*. v. 103, p. 413-433, 2003.
 111. Leistner S. Investigação molecular no câncer hereditário e esporádico. In: Louro ID, Llerena JC Jr, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann G, Conforti-Fróes N. *Genética Molecular do Câncer*. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2000. p. 263-273. cap VII.
 112. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: basis of its occurrence. *Current Opinion in Oncology*. v. 14, p. 65-72, 2002.
 113. Louro ID. Sistemas de controle celular. In: Louro ID, Llerena JC Jr, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann G, Conforti-Fróes N. *Genética Molecular do Câncer*. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2000. p. 44-86. cap II.
 114. Baccouche S, Mabrouk I, said S, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Letters*. v. 189, p. 91-96, 2003.
 115. Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdisse. Microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Research* v. 60, p. 3884-3892, Jul. 2000.
 116. Ihlaseh SM, Oliveira MLS, Silva GN, Franchi CAS, Camargo JLV. Microdissecção e captura a laser na investigação do gene TP53 em tecidos incluídos em parafina. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v. 43, n. 1, p. 61-67, Fev. 2007.
 117. Andreassen CN. Optimisation and validation of methods to assess single nucleotide polymorphisms (SNPs) in archival histological material. *Radiotherapy and Oncology*. v. 72, p. 351-356, 2004.

ARTIGO (Versão em português)

Artigo será submetido no periódico *Oncology Reports*, conforme Anexo III

Análise do polimorfismo R72P do gene TP53 em pacientes com carcinoma de mama ductal invasor

Márcia Portela de Melo¹, Ana Cristina Bittelbrunn^{2,3}, Carlos Henrique Menke^{2,3},
Luciana Grazziotin Rossato³, Gustavo Lucena³, Sandra Leistner-Segal^{1,3,4}

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Serviço de Mastologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3. Banco de DNA/Tecidos de Mama e de Ovário do Centro de Pesquisas do HCPA

4. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Título Abreviado: Polimorfismo R72P do TP53 em carcinoma de mama

Correspondência para o autor:

Sandra Leistner-Segal; PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: 51-2101-8011

Fax: 51-2101-8010

E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Resumo

O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente e também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, com um aumento na incidência em 0,5% ao ano. O carcinoma de mama resulta de uma série de mutações nos genes reguladores do desenvolvimento e do reparo do DNA. Aproximadamente 50% dos carcinomas humanos possuem mutações no gene TP53. O gene TP53 é polimórfico no códon 72 da proteína que ele codifica, podendo conter arginina (CGC) ou prolina (CCC) nesta posição. Este polimorfismo pode estar envolvido na suscetibilidade e predisposição ao câncer e apresenta uma distribuição étnica e geográfica bastante variável. O genótipo homozigoto para arginina parece ser um fator de risco significativo para o câncer de mama. O propósito deste estudo é determinar a freqüência e a associação do polimorfismo R72P no gene TP53 com carcinoma de mama ductal invasor, em pacientes do sul do Brasil, onde a incidência deste câncer é elevada. Foram analisadas 76 pacientes com carcinoma de mama ductal invasor e 80 controles, cujas amostras foram avaliadas pela PCR, seguida da digestão por enzima de restrição. Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa na freqüência do genótipo ($P = 0,707$) e na freqüência dos alelos arginina e prolina ($P = 0,469$), envolvendo o polimorfismo no códon 72, entre as pacientes com carcinoma de mama invasor e controles. Desta forma, a análise estatística não sugere associação entre o polimorfismo R72P no gene TP53 e o carcinoma ductal invasor na população estudada. Não houve associação significativa com características clinicopatológicas apresentadas pelas pacientes com carcinoma de mama.

Palavras-chave: TP53, polimorfismo R72P, PCR, carcinoma de mama

Introdução

O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente (23% de todos os carcinomas) e também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Desde estimativas de 1990, tem ocorrido um aumento na incidência em 0,5% ao ano. Esta taxa de crescimento permite estimar em torno de 1,4 milhões de novos casos em 2010 (1). No Brasil, é o câncer mais freqüente (excluindo o câncer de pele não melanoma) entre as mulheres, sendo a estimativa, em 2008 e 2009, de 49.400 novos casos segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), permanecendo como o carcinoma mais comum entre as mulheres brasileiras (2).

O carcinoma de mama resulta de uma série de mutações nos genes reguladores do desenvolvimento e do reparo do DNA (3), sendo a ativação dos proto-oncogenes celulares juntamente com a inativação dos genes supressores de tumor as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral (4). A heterogeneidade do comportamento clínico do carcinoma de mama sugere que a base genética pode ser variável (3). Embora as etapas iniciais e as vias da carcinogênese ainda estejam fracamente definidas, o carcinoma invasivo parece evoluir a partir de um componente *in situ* (5). Não somente a coexistência das duas lesões, mas também as semelhanças histológicas entre os componentes invasivos e *in situ*, dentro da mesma lesão (5), assim como a presença de mudanças cromossômicas compartilhadas tanto no carcinoma ductal *in situ* (CDIS) como no carcinoma invasivo, sincrônicos e adjacentes demonstram sua relação clonal e evolutiva (6).

O gene supressor tumoral TP53 está mutado em aproximadamente 25% dos CDIS, mas está raramente mutado no tecido mamário normal ou em lesões proliferativas benignas (6). A freqüência dessas mutações aumenta progressivamente do CDIS baixo grau até 40% no CDIS alto grau (7,8). Assim, as alterações da expressão gênica na carcinogênese parecem ocorrer durante a transição do tecido mamário normal para o CDIS (6).

A instabilidade cromossômica ocorre, com ganho ou perda de múltiplos loci, à medida que as lesões hiperplásicas progridem de CDIS até o carcinoma ductal invasor (9). Estes resultados apontam para um importante papel das alterações em TP53 precocemente no processo de carcinogênese da mama (7,8).

O gene supressor tumoral TP53, localizado no cromossomo 17 (17p13.1), codifica uma fosfoproteína a qual participa da regulação do ciclo celular (10). Foram identificadas mais de 15 mil mutações inativadoras em alelos do gene TP53, sendo a maioria destas mutações missense (11). Aproximadamente 80% dessas mutações estão agrupadas entre os éxons 5 – 8 (12), alterando a conformação, a especificidade de seqüência de ligação ao DNA e sua função como fator de transcrição (11). Como resultado, ocorre a síntese de uma proteína estável, mal-funcionante e não degradável, que se acumula nas células tumorais, podendo ser detectada pela imunistoquímica (13).

Aproximadamente 50% dos carcinomas humanos possuem mutações no gene TP53 com perda de função da proteína por ele codificada, a proteína p53 (7,12,14). Nos carcinomas de mama esporádicos, essas mutações foram identificadas em 20% a 50% dos casos, com marcada heterogeneidade geográfica em nossa população (12,15,16,17) e acompanhadas da perda do alelo selvagem, ou seja, perda de heterozigosidade (18). A associação das mutações em TP53 com diferentes fenótipos clínicos, no carcinoma de mama, tem sido avaliada, sendo que a maioria dos estudos associa a presença dessas mutações com menor sobrevida (7).

A proteína p53 já foi chamada de “guardiã da integridade do DNA” e atua como uma reguladora transcricional induzida em resposta aos danos ao DNA, podendo levar a uma parada do ciclo celular ou induzir apoptose em resposta à depleção de metabólitos, ao choque térmico, à hipóxia, a oncoproteínas virais e a onco-genes celulares ativados (4,12,19,20,21,22).

O gene TP53 é polimórfico no códon 72 da proteína que ele codifica (14,23), ao nível do nucleotídeo 215, com um par de base variável (g.215 G>C) no éxon 4, que resulta na substituição de prolina por arginina na seqüência protéica (8,24,25). Desta forma, p53 pode conter um códon arginina (CGC) ou prolina (CCC) nesta posição, que podem estar envolvidos na suscetibilidade e predisposição ao câncer, sendo possível identificá-los pelo uso de enzimas de restrição (10,23,26,27,28). Este polimorfismo apresenta uma distribuição étnica e geográfica bastante variável (14), sendo estudado em vários tumores, além do carcinoma de mama, como os carcinomas de pulmão, cólon, estômago e bexiga (29).

O gene TP53 com alelo Pro72 é estruturalmente diferente do TP53 com alelo Arg72. Tumores contendo células com Pro72 TP53 têm surgimento mais lento e são menores do que tumores com células Arg72 TP53. Ambas as formas

polimórficas de TP53 humano parecem participar da carcinogênese do câncer de mama (12,14,23). A forma Arg72 TP53 é considerada mais oncogênica (14,30) e significativamente associada à maior frequência de mutações no gene TP53, naqueles tumores onde está presente (23).

O processo migratório no Brasil, aliado à grande extensão de seu território, muito contribuiu para a diversidade e complexidade da composição étnica da população (31). O estado mais ao sul do Brasil, o Rio Grande do Sul (RS), é composto por uma população de origem basicamente européia, o que o diferencia das demais regiões do país (31). Além disso, apresenta a segunda maior incidência da neoplasia no país (2). Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência do polimorfismo R72P no gene TP53, em pacientes com carcinoma de mama ductal invasor, no estado do Rio Grande do Sul, e a associação deste polimorfismo com o carcinoma de mama e com suas características clinico-patológicas.

Material e Métodos

Pacientes e controles

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em EDTA de 76 pacientes arroladas consecutivamente com carcinoma ductal invasor, confirmado por exame anatomopatológico, tratadas e acompanhadas no Ambulatório de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em qualquer estágio da doença. O grupo controle consistiu de 80 doadores saudáveis do Banco de Sangue do HCPA. O DNA foi extraído a partir do sangue periférico, utilizando procedimento de precipitação por sais descrito por Miller et al. (1998) (32) e mantidas em freezer a temperatura de -20°C.

As pacientes em consulta, na avaliação pré-operatória, foram incluídas, após leitura e assinatura do termo de consentimento. Nesta consulta, foram obtidos dados demográficos, dados sobre fatores hormonais, história familiar de carcinoma, história pregressa de doença benigna de mama por meio de um questionário. Posteriormente ao tratamento cirúrgico, foram obtidos dados referentes às características do carcinoma de mama a partir do exame anatomopatológico e imunoistoquímico de rotina realizados no Serviço de Patologia do HCPA.

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (Projeto N° 05-551). Todos os procedimentos foram realizados após o consentimento livre e esclarecido das pacientes.

Amplificação do material genético pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O éxon 4 do gene TP53 foi amplificado através do método da PCR. Para o PCR utilizamos 5 µL de dNTP (Sigma), 5 µL de tampão amônio (16mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris. HCL pH 8,8 e 0,1% Tween 20), 0,2 µL de DNA Taq polimerase Gibco, 1,5 µL MgCl₂, 1,5 µL de BSA, 1,0 µL dos *primers* específicos para o fragmento a ser amplificado, para um volume final de 50 µL. Os *primers* de PCR utilizados foram descritos por Leistner-Segal et al. (2006) (33).

As condições da PCR foram a desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, temperatura de anelamento de 56°C por 30 segundos, 72°C de extensão por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado de 350 pb foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Digestão - Polimorfismo R72P

Para identificação do polimorfismo R72P do éxon 4, foi realizada a digestão do produto de PCR com 0,5 µL da enzima de restrição *Bst*UI (New England Biolabs, ME), 3 µL de tampão (10 mM Tris-HCL pH 7,5, 7 mM MgCl₂, 60 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoetanol e 0,01% BSA), 10 µL do produto de PCR, para um volume final de 30 µL. Os tubos foram incubados a 60°C no termociclador por 2 horas até completa digestão. A reação de digestão foi visualizada por eletroforese em gel e agarose 3% corado com brometo de etídio.

A enzima de restrição *Bst*UI reconhece o sítio CG↓CG, clivando o fragmento de 350 pb em 191 pb e 159 pb, respectivamente, na presença do alelo arginina (CGC). O alelo prolina (CCG) não apresenta o sítio de restrição e, portanto, não é clivado, permanecendo 350 pb.

Foi realizado o cálculo das freqüências absolutas e relativas das alterações nas amostras de pacientes e controles. O Test χ^2 Pearson foi usado para avaliar se os grupos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), como também para verificar a presença de diferenças em relação ao genótipo e à freqüência alélica entre os grupos de pacientes e de controles. Foi usado Teste χ^2 Pearson com correção de Yates, quando apropriado. O nível de significância estatística considerado foi $P < 0,05$. A associação entre o polimorfismo R72P em TP53 e as características clínico-patológicas do carcinoma de mama foi avaliada pelo Test χ^2 Pearson (variáveis categóricas). A associação da freqüência alélica com dados da literatura foi avaliada pelo Teste χ^2 Pearson com correção de Yates. A computação dos dados e cálculos estatísticos foi realizada utilizando o SPSS 12.0 (para Windows) e o Pepi versão 4.0.

Resultados

As 76 pacientes com carcinoma ductal invasor (CDI), histologicamente confirmado, apresentavam uma média de idade de $53,2 \pm 13,2$ anos, sendo, na sua grande maioria, autodeclaradas brancas (64,5%). Destas pacientes, 15 (19,7%) apresentavam história familiar significativa para o risco de desenvolver carcinoma de mama (considerando um ou mais parentes de primeiro grau afetados). Após o procedimento cirúrgico, foi determinado, pelo resultado do exame anatomopatológico, o estadiamento tumoral conforme os critérios da classificação AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), sexta edição, sendo 27,6% dos casos estágio I, 28,9% estágio IIA, 23,7% estágio IIB, 15,8% estágio IIIA e 3,9% estágio IIIC.

O grau histológico foi determinado conforme o Índice Prognóstico de Nottingham, assim distribuído: 12 casos (15,8%) grau 1, 46 casos (60,5%) grau 2 e 13 casos (17,1%) grau 3, em 5 pacientes o grau não pôde ser avaliado em função de efeitos pós-quimioterapia neo-adjuvante.

A metodologia apresentada mostrou-se adequada para amplificação do éxon 4 do gene TP53, já tendo sido testada em estudo prévio (33). A distribuição dos genótipos no códon 72 do gene TP53, tanto em pacientes como em controles, encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados foram analisados quanto às freqüências do genótipo (tabela I) e dos alelos (tabela II). A freqüência encontrada para o polimorfismo R72P foi similar entre os grupos pacientes com CDI e controles, não sendo encontrada diferença significativa na freqüência do genótipo ($P = 0,707$) e na freqüência alélica ($P = 0,469$). A figura 1 mostra os resultados da digestão pela BstUI, demonstrando os alelos possíveis.

Não houve associação significativa entre o polimorfismo R72P com características clínicas e patológicas apresentadas pelas pacientes com CDI (tabelas III e IV). Os resultados deste estudo foram comparados com dados da literatura, não sendo encontrada diferença significativa entre as freqüências dos alelos polimórficos, exceto em dois estudos envolvendo uma população de mulheres judias Ashkenazi (34) e uma população de mulheres gregas (28) ($P < 0,001$) (tabela 5). Quando comparadas com as freqüências de subpopulações americanas, houve diferença significativa com afro-americanos ($P < 0,001$) (35).

Discussão

A compreensão dos mecanismos da carcinogênese de diferentes neoplasias vem sendo buscada em inúmeros estudos, em todo o mundo. Pesquisas são realizadas com o objetivo de entender e identificar variações genéticas, enzimáticas e protéicas que possam estar envolvidas na progressão de uma célula normal para neoplásica. As alterações genéticas como as mutações e alguns polimorfismos podem acometer qualquer região do DNA, levando, muitas vezes, a uma cascata de eventos que irão culminar em um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de neoplasias, e no surgimento de alterações biológicas e clínico-patológicas características de cada neoplasia.

Muitos estudos sugerem uma associação entre o polimorfismo no códon 72 no gene TP53 e a carcinogênese de vários carcinomas humanos, como cervical (36,37), de pulmão (38,39), colorretal (40), de bexiga (41) e de pele (42), incluindo o carcinoma de mama (14,30,43,44,45,46) com resultados controversos. Soultzis et al., em 2002, publicaram o primeiro estudo correlacionando o polimorfismo R72P no gene TP53 com o câncer de bexiga, dando evidências de que este polimorfismo está relacionado à carcinogênese desta neoplasia. A presença do genótipo Arg/Arg pode estar relacionada a um risco aumentado de desenvolvimento do câncer de bexiga (41).

O polimorfismo R72P parece influenciar a expressão da proteína p53 (47), uma vez que ocorre dentro do domínio de transativação da p53. O códon 72 está localizado na região hidrofóbica da proteína, a qual determina sua conformação, ligação ao DNA e atividade transcricional, essencial para o mecanismo de supressão celular (14). As diferenças na atividade da p53 fizeram com que a frequência do polimorfismo no códon 72 do gene TP53 fosse amplamente estudada nos últimos anos (23,30,41,47).

Foi descrito um aumento em sete vezes no risco de desenvolver carcinoma cervical associado ao papilomavírus humano (HPV) em pacientes homozigotas para o alelo arginina no códon 72 em relação às pacientes apresentando um ou mais alelos prolina (36). Estudos *in vitro* indicam que a proteína p53 contendo arginina está mais propensa a sofrer degradação pela oncoproteína HPV E6 (37).

Os resultados apresentados neste estudo não evidenciaram diferença estatisticamente significativa na frequência do genótipo e na frequência dos alelos arginina e prolina, envolvendo o polimorfismo no códon 72, entre as pacientes com carcinoma ductal invasor (CDI) e controles. Desta forma, o polimorfismo R72P no gene TP53 não se associou com maior risco de desenvolvimento de CDI na população estudada. Apesar de não haver diferença entre os grupos, o alelo arginina no códon 72 foi o mais comum em ambos os grupos, assim como apresentado na maioria dos estudos (12).

Estes achados estão em desacordo com alguns estudos que encontraram diferença significativa na frequência do genótipo Arg/Arg no códon 72 entre as pacientes com carcinoma de mama e controles (14,23,24,28,30,34,48), ou com estudos nos quais o genótipo Pro/Pro foi observado com maior frequência nas pacientes com carcinoma de mama quando comparadas com o grupo controle (43,49).

Entretanto, nossos dados foram consistentes com os encontrados em estudos semelhantes, conduzidos com pacientes turcas, japonesas e russas com carcinoma de mama, sendo que esses dados também não evidenciaram diferenças na distribuição dos três genótipos (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro) entre casos e controles (29,51,52). Resultados similares também foram encontrados em alguns estudos envolvendo carcinoma colorretal, onde não foi encontrada associação com os diferentes genótipos no códon 72 (40).

Os estados pertencentes à Região Sul apresentam as maiores proporções de brancos, com o Rio Grande do Sul tendo sido povoado por imigrantes de origem portuguesa, alemã, italiana e, em menor escala, de eslavos (31). Hoje, formado por uma população muito miscigenada e com grupos étnicos diferentes. Esta característica da população do sul do Brasil pode ser uma das explicações para a diferença dos resultados apresentados neste estudo com outro conduzido na mesma região (48). Damin et al. identificaram, quando comparada ao grupo controle formado por mulheres sadias doadoras do banco de sangue de outra instituição também no sul do Brasil, frequência significativamente maior do genótipo Arg/Arg no códon 72 entre 118 pacientes com carcinoma de mama (incluindo outros tipos histológicos de carcinoma de mama além do CDI), no sul do Brasil, atendidas em uma mesma instituição (48).

O polimorfismo no códon 72 foi observado como um fator de risco independente para o carcinoma de mama em afro-americanos e hispânicos nos Estados Unidos, mas com significado *borderline* em caucasianos ($P = 0,054$) (53), sendo o alelo arginina mais freqüente em caucasianos e hispânicos, e o alelo prolina mais comum entre afro-americanos (53). Em outro estudo envolvendo chineses heterozigotos no códon 72 (Arg/Pro) foi evidenciado um aumento significativo da expressão do alelo arginina nas pacientes com carcinoma de mama, embora não tenha ocorrido diferença significativa nas freqüências do genótipo entre pacientes chinesas e controles saudáveis. Isto sugere a possibilidade de que o alelo arginina esteja envolvido na carcinogênese do carcinoma de mama (24).

Não houve associação deste polimorfismo com características clínico-patológicas apresentadas pelo CDI, podendo este achado ser conseqüência do pequeno tamanho da amostra, não sendo possível realizar avaliação estatística adequada desta associação. Também não encontraram associação estudos envolvendo mulheres com carcinoma de mama na Grécia e na Turquia, assim como, outro estudo conduzido no sul do Brasil, podendo significar que o polimorfismo R72P não interfira sobre a história natural do carcinoma de mama (14,30,48). Han et al., por outro lado, identificaram que casos com genótipos Pro/Pro e Arg/Pro no códon 72 apresentavam menor número de metástases para linfonodos axilares, quando comparados aos casos homozigotos para arginina (54).

Não foi possível analisar a relação entre a sobrevida e o polimorfismo estudado devido ao diagnóstico relativamente recente das pacientes do estudo. Entretanto, foi observado um efeito protetor para o desfecho morte entre as pacientes inglesas com carcinoma de mama e a presença do alelo prolina no polimorfismo R72P, perdendo sua significância estatística em análise multivariadas (55). Estes achados contrariam o relatado por Tommiska et al., onde as pacientes com carcinoma de mama homozigotas para o alelo prolina apresentaram pior prognóstico quando comparadas às pacientes com outros genótipos (45).

Conclusão

Os achados contraditórios envolvendo o polimorfismo R72P no gene TP53 e o risco para carcinoma de mama, assim como para outros carcinomas, podem dever-se a variações inter-raciais, étnicas e geográficas, uma vez que a

distribuição do alelo prolina parece variar entre diferentes grupos étnicos e a frequência do alelo arginina aumenta, à medida que afastam-se do equador os grupos populacionais analisados (12,14). Além disso, qualquer alteração no sítio de clivagem pode ocorrer, levando a uma digestão parcial do fragmento amplificado (éxon 4). Esta alteração somente pode ser confirmada pelo seqüenciamento do DNA (33,56).

Assim, o polimorfismo R72P no gene TP53 não se associou a maior risco de desenvolvimento de CDI na população estudada. Este achado pode estar relacionado à grande variação inter-racial e étnica em nossa população, decorrente de freqüentes miscigenações e exposição a diferentes fatores ambientais, importantes na evolução do carcinoma de mama. É necessário outros estudos envolvendo um número maior de pacientes, analisando mutações em sítios *splicing* (7,17,23), também testando a perda de heterozigosidade (26) e o estudo de haplótipos envolvendo diferentes polimorfismos no gene TP53, que parecem modificar o risco para o carcinoma de mama, auxiliando a identificar pacientes com maior risco de desenvolver a doença (43,46). A aplicabilidade e a generalização dos achados deste e de outros estudos, em relação ao risco para carcinoma de mama, permanecem incertas e ainda precisam ser estabelecidas.

Referências Bibliográficas

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
2. Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2005. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em Jan. 2008.
3. Hellman S: Darwin's clinical relevance. *Cancer* 79 (12): 2275-2281, 1997.
4. Elledge RM and Allred DC: The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Research and Treatment* 32: 39-47, 1994.
5. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM and Mansel RE: The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 80(9): 1740-1745, 1997.
6. Burstein HJ, Polyak K, Wong J, Lestor SC and Kaelin CM: Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 350: 1430-1441, 2004.
7. Gasco M, Shami S and Crook T: The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4: 70-76, 2002.
8. Borresen-Dale AL: TP53 and breast cancer. *21*: 292-300, 2003.
9. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SAW, Osborne CK, Clark GM and Allred DC: Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *Journal of the National Cancer Institute* 90(9): 697-703, 1998.
10. IARC Homepage – International Agency to Research in cancer – p53 polymorphisms. Disponível em <http://www.iarc.fr/p53/index.html>. Acesso em Nov. 2007.
11. Tanyi J, Tory K, Bánkfalvi A, Schröder W, et al. Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. *Pathology Oncology Research* 5(2): 90-94, 1999.
12. Gallo CVM, Azevedo G, Mendonça S, Moraes E, Olivier M and Hainaut P: TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutation Research* 589: 192-207, 2005.
13. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA and Borresen-Dale AL: Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Research* 61:2505-2512, 2001.

14. Buyru N, Tigli H and Dalay N: P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. 10: 711-714, 2003.
15. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor sub classes with clinical implications. PNAS 98(19): 10869-10874, 2001
16. Lai H, Lin L, Nadji M, Lai S, Trapido E and Meng L: Mutations in the p53 tumor suppressor gene and early onset breast cancer. Cancer Biology and Therapy 1: 31-36, 2002.
17. Nagai MA, Barbosa HS, Zago MA, Silva Jr WA et al: TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. International Journal of Oncology 23: 189-196, 2003.
18. Oesterreich S and Fuqua SA. Tumor suppressor genes in breast cancer. Endocrine-Related Cancer 6: 405-419, 1999.
19. Sherr CJ: The peacock lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Research 60: 3689-3695, 2000.
20. Sherr CJ and McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer. Cancer cell 2: 103-112, 2002.
21. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. Nature 408: 307-310, 2000.
22. Levine AJ, Hu W and Feng Z: The p53 pathway: What questions remain to be explored? Cell Death and Differentiation 13: 1027-1036, 2006.
23. Langerod A, Bukholm IRK, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA and Borresen-Dale AL: The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 11: 1684-1688, 2002.
24. Siddique MM, Balran C, Fiszler-Maliszewska L, Aggarwal A, et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(9): 2245–2252, 2005.
25. Martin A-M, Kanetsky PA, Amirmani B, Colligon TA, Athanasiadis G, Shih HA, Gerrero MR, Calzone K, Rebbeck TR and Weber BL: Germline TP53 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers: is *TP53* a modifier of *BRCA-1*? J Med Genet 40:e34: 1–6, 2003.

26. Bonafé M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C, Marzi E et al.: Retention of the p53 codon 72 arginine is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 9: 4860–4864, 2003.
27. Powell BL, Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns Els MJJ and Iacopetta B: Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 23(2): 311-315, 2002.
28. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT and Kotsis A: The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Letters* 222: 57-65, 2005.
29. Weston A and Godbold JH: Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 919-926, 1997.
30. Papadakis EN, Dokianakis DN and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer: *Molecular Cell Biology Research Communications* 3: 389-92, 2000.
31. Tendências Demográficas: uma análise da população com base nos resultados dos *Censos Demográficos 1940 e 2000: Tendências demográficas no período de 1940/2000: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); Rio de Janeiro, 2007.*
32. Miller SA: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988
33. Leistner-Segal S, Pilger DA and Segal F: TP53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett esophagus. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 170: 76 – 77, 2006.
34. Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Menachem TD, Barzilai SE and Friedman E: The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *British Journal of Cancer* 92: 1144-48, 2005.
35. NCI – National Cancer Institute. <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm>, Acesso em: janeiro/2008.
36. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovanit F et al.: Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated

- cancer. *Nature* 393: 229 – 234, 1998.
37. Crook T, Ludwig RL, Marston N, Willkomm D et al.: Sensitivity of p53 lysine to ubiquitin-directed degradation targeted by human papillomavirus E6. *Virology* 217: 285 – 292, 1996.
 38. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY and Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clinical Cancer Research* 5: 129 – 134, 1999.
 39. Pierce LM, Sivaraman L, Chang W, Lum A, Donlon T, Seifried A et al. Relationships of TP53 codon 72 and HRAS1 polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 1199–1204, 2000.
 40. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDC and Forones NM: Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol* 43: (1): 8-13, 2006.
 41. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN and Spandidos DA: P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters* 179: 175–183, 2002.
 42. O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM and Mabruk MJEMF: P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J. Clin. Pathol.* 54: 539-542, 2001.
 43. Sjölander A, Birgander R, hallmans G, cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G and Beckman L: p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*. 17(6): 1313-1316, 1996.
 44. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCalies EC and Weston A: Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 127 – 130, 2002.
 45. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallita J et al.: Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clinical Cancer Research* 11(14): 5098 – 5103, 2005.
 46. Buyru N, Altinisik J, Demokan S and Dalay N: p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 31: 207 – 213, 2007
 47. Soussi T and Bérout C: Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews* 1: 233 – 240, 2001.

48. Damin APS, Frazzon APG, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C and Alexandre COP: Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detection and Prevention* 30: 523 – 529, 2006.
49. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y and Noguchi S: Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Letters* 210: 197 – 203, 2004.
50. Weston A and Godbold JH: Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 919-926, 1997.
51. Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, Mokdad-Gargouri Raja et al.: No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010: 764 – 770, 2003.
52. Suspitsin EM, Buslov KG, Grigoriev MY, Ishutkina JG, Ulibina JM et al.: Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int. J. Cancer* 103: 413-433, 2003.
53. Weston A, Pan C, Ksieski B, Wallenstein S, Berkowitz GS, Tartter PI et al.: p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 6: 105 – 112, 1997.
54. Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW and Noh DY: Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clinical Cancer Research* 10: 124 - 130, 2004.
55. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BAJ, Easton DF and Pharoah PPD: Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Research* 62: 3052-3057, 2002.
56. Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R and Gargouri A: A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Letters* 189: 91 – 96, 2003.

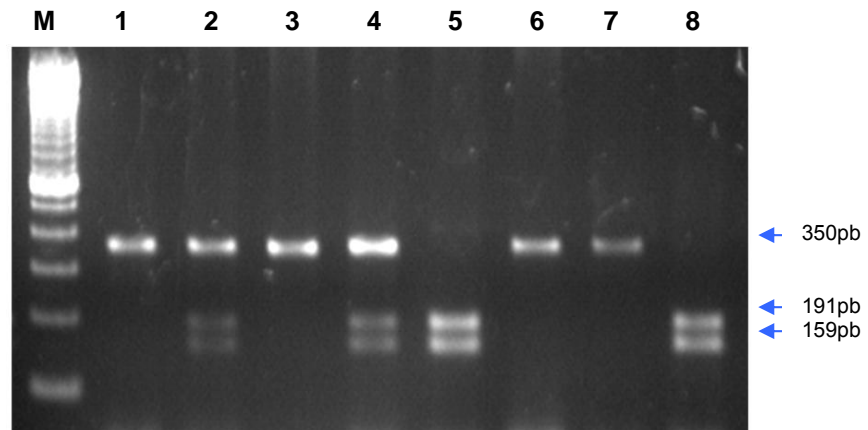


Figura 1. Gel de agarose (3.0%) demonstrando resultado da digestão com a enzima de restrição *Bst*UI. A posição M apresenta o marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). Nas posições 1, 3, 6 e 7 visualiza-se o padrão alélico Pro/Pro, nas posições 2 e 4 visualiza-se o padrão alélico Arg/Pro e nas posições 5 e 8 visualiza-se o padrão alélico Arg/Arg para o polimorfismo R72P do gene TP53.

Tabela I. Frequência do genótipo do polimorfismo R72P no gene TP53 em pacientes com carcinoma ductal invasor e controles

	Homozigotos Arg/Arg	Heterozigotos Arg/Pro	Homozigotos Pro/Pro	P
Pacientes (n = 76)	34 (44,7%)	33 (43,4%)	9 (11,8%)	0,707
Controles (n = 80)	31 (38,8%)	37 (46,3%)	12 (15,0%)	
Total (n = 156)	65	70	21	

χ^2 0,693

Tabela II. Frequência alélica do polimorfismo R72P no gene TP53 em pacientes com carcinoma ductal invasor e controles

	f(R)	f(P)	Total alelos	P
Pacientes (n = 76)	101 (66,4%)	51 (33,6%)	152	0,469
Controles (n = 80)	99 (61,9%)	61 (38,1%)	160	
Total	200	112	312	

χ^2 com correção de Yates 0,523

Tabela III. Características clínicas das pacientes com carcinoma de mama ductal invasor e o polimorfismo R72P no gene TP53

	N (%)	Homozigotos Arg/Arg (%)	Homozigotos Pro/Pro (%)	Heterozigotos Arg/Pro (%)	P
Idade no diagnóstico					
≤ 50 anos	30 (39,5)	15 (44,1)	3 (33,3)	12 (36,4)	0,747
> 50 anos	46 (60,5)	19 (55,9)	6 (66,7)	21 (63,6)	
História familiar					
sim	15 (19,7)	8 (23,5)	2 (22,2)	5 (15,2)	0,676
não	61 (80,3)	26 (76,5)	7 (77,8)	28 (84,8)	
Paridade					
sim	67 (88,2)	29 (85,3)	8 (88,9)	30 (90,9)	0,775
não	9 (11,8)	5 (14,7)	1 (11,1)	3 (9,1)	
Menopausa					
sim	57 (75)	27 (79,4)	6 (66,7)	24 (72,7)	0,678
não	19 (25)	7 (20,6)	3 (33,3)	9 (27,3)	

Tabela IV. Características histopatológicas das pacientes com carcinoma de mama ductal invasor e o polimorfismo R72P no gene TP53

	N (%)	Homozigotos Arg/Arg (%)	Homozigotos Pro/Pro (%)	Heterozigotos Arg/Pro (%)	P
Tamanho do tumor					
T1 (\leq 2 cm)	32 (42,1)	18 (52,9)	3 (33,3)	11 (33,3)	0,508
T2 (3 – 5 cm)	39 (51,3)	14 (41,2)	5 (55,6)	20 (60,6)	
T3 (> 5 cm)	5 (6,6)	2 (5,9)	1 (11,1)	2 (6,1)	
Linfonodos					
positivos	41 (53,9)	20 (58,8)	6 (66,7)	15 (45,5)	0,393
negativos	35 (46,1)	14 (41,2)	3 (33,3)	18 (54,5)	
Grau tumoral					
1	12 (15,8)	2 (5,9)	2 (22,2)	8 (24,2)	0,229
2	46 (60,5)	25 (73,5)	4 (44,4)	17 (51,5)	
3	13 (17,1)	5 (14,7)	3 (33,3)	5 (15,2)	
Indeterminado	5 (6,6)	2 (5,9)	0	3 (9,1)	
ILV¹					
sim	15 (19,7)	8 (23,5)	2 (22,2)	5 (15,2)	0,676
não	61 (80,3)	26 (76,5)	7 (77,8)	28 (84,8)	
ECIS²					
sim	18 (23,7)	9 (26,5)	2 (22,2)	7 (21,2)	0,874
não	58 (76,3)	25 (73,5)	7 (77,8)	26 (78,8)	
RE³					
positivo	61 (80,3)	27 (79,4)	8 (88,9)	26 (78,8)	0,785
negativo	15 (19,7)	7 (20,6)	1 (11,1)	7 (21,2)	
RP⁴					
positivo	56 (73,7)	25 (73,5)	7 (77,8)	24 (72,7)	0,954
negativo	20 (26,3)	9 (26,5)	2 (22,2)	9 (27,3)	
p53					
Positivo	36 (47,4)	17 (50)	5 (55,6)	14 (42,4)	0,719
negativo	40 (52,6)	17 (50)	4 (44,4)	19 (57,6)	
HER-2/neu					
negativo	18 (23,7)	8 (23,5)	0	10 (55,6)	0,147
1+	16 (21,1)	8 (23,5)	3 (33,3)	5 (15,2)	
2+	19 (25)	6 (17,6)	5 (55,6)	8 (24,2)	
3+	23 (30,3)	12 (35,3)	1 (11,1)	10 (30,3)	

1 - ILV : invasão linfovascular; 2 - ECIS: extenso componente in situ; 3 – RE: receptor de estrógeno; 4 – RP: receptor de progesterona

Tabela V. Comparação das freqüências dos alelos polimórficos no códon 72 do TP53 das 76 pacientes do estudo com a freqüência alélica da literatura

Estudos	População	N¹	Alelo Arginina²	P³
Noma et al. 2004	Japonesa	382	255	0,999
Buyru et al. 2003	Turca	230	167	1,378
Tommiska et al. 2005	Escandinava	3102	2267	0,089
Damin et al. 2006	Brasileira (sul)	404	251	0,399
Papadakis et al. 2000	Grega	112	78	0,677
Ohayon et al. 2005				
	Judeus não-Ashkenazi	48	38	0,137
	Judeus Ashkenazi	216	180	< 0,001
Han et al. 2004	Coreana	1328	881	0,999
Siddique et al. 2005	Chinesa	188	123	0,934
Kalemi et al. 2005	Grega	87	84	< 0,001
Mabrouk et al. 2004	Tunisiana	63	45	0,581

1 – N: número total de alelos; 2 - Alelo polimórfico (obtendo-se igual resultado ao considerar o alelo prolina); 3 - Valor obtido do cálculo do χ^2 com correção de Yates

Tabela VI. Comparação das freqüências dos alelos polimórficos no códon 72 do TP53 das 76 pacientes do estudo com dados das subpopulações americanas

Estudos¹	N²	Alelo Arginina³	P⁴
Afro-americanos	48	14	< 0,001
Caucasianos	62	45	0,476
Hispânicos.	46	32	0,829

1 – Dados do banco do NCI (National Cancer Institute).

Disponível em <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm> (Data de acesso: 05/01/08);

2 – N: número total de alelos; 3 - Alelo polimórfico (obtendo-se igual resultado ao considerar o alelo prolina); 4 - Valor obtido do cálculo do χ^2 com correção de Yates

ARTICLE (English version)

Article to be submitted to *Oncology Reports* journal according to Attachment III

Analysis of R72P polymorphism of the TP53 gene in patients with invasive ductal breast carcinoma

Márcia Portela de Melo¹, Ana Cristina Bittelbrunn^{2,3}, Carlos Henrique Menke^{2,3},
Luciana Grazziotin Rossato³, Gustavo Lucena³, Sandra Leistner-Segal^{1,3,4}

1. Medical Sciences Post-Graduation Program at the Federal University of Rio Grande do Sul - Medical School
2. Mastology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
3. DNA/Breast and Ovary Tissue Bank at the HCPA - Research Center
4. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Abbreviated Title: R72P Polymorphism of TP53 in breast carcinoma

Author's mailing address:

Sandra Leistner-Segal; PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone: 51-2101-8011

Fax: 51-2101-8010

E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Breast cancer is the most frequent neoplasia as well as the main cause of death from cancer among women, with an increase in incidence of 0.5% per year. Breast carcinoma results from a series of mutations in the DNA development and repair genes. Approximately 50% of human carcinomas present mutations in the TP53 gene, which is polymorphic in codon 72 of the proteins it encodes, containing either arginine (CGC) or proline (CCC) in that position. Such polymorphism may be involved in the susceptibility and predisposition for cancer presenting a widely variable ethnic and geographic distribution. The arginine homozygous genotype seems to be a significant risk factor for breast cancer. The purpose of this study is to determine the frequency and association of R72P polymorphism in the TP53 gene with invasive ductal breast cancer in patients from Southern Brazil, where this type of cancer has a high incidence. 76 patients suffering from invasive ductal breast cancer and 80 controls were analyzed, and samples were evaluated by PCR followed by restriction enzyme digestion. There was no evidence of statistical difference in the genotype frequency ($P = 0.707$) and in the arginine and proline allele frequency ($P = 0.469$), involving codon 72 between the patients suffering from invasive breast cancer and controls. Thus, the statistical analysis does not suggest any association between R72P polymorphism of the TP53 gene and invasive ductal carcinoma in the population studied. There was no significant association with clinical pathologic characteristics presented by the breast carcinoma sufferers.

Key words: gene TP53, R72P polymorphism, PCR, breast carcinoma

Introduction

Breast cancer is the most frequent neoplasia (23% of all carcinomas) as well as the main cause of death from cancer among women. Since the 1990 estimates, there has been an increase in incidence of 0.5% per year. This growth rate allows to estimate around 1.4 million new cases by 2010 (1). In Brazil, it is the most frequent cancer (except for non-melanoma skin cancer) among women, with the estimate for 2008 and 2009, of 49,400 new cases, according to data from the National Cancer Institute (INCA), remaining the most common carcinoma among Brazilian women (2).

Breast carcinoma results from a series of mutations in the DNA development and repair genes (3), with the activation of the cell proto-oncogene together with the inactivation of tumor suppressing genes the main genetic changes involved in tumor development (4). The heterogeneity of breast cancer clinical behavior suggests that the genetic base may be variable (3). Although the early stages and carcinogenesis paths are still poorly defined, the invasive carcinoma seems to evolve from an *in situ* component (5). Not only the coexistence of both lesions, but also the histological similarities between the invasive and *in situ* components within the same lesion (5), as well as the presence of chromosomal changes shared in both the ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and the invasive carcinoma, synchronous and adjacent demonstrate their clonal and evolutionary relation (6).

The TP53 tumor suppressor gene is mutated in approximately 25% of DCIS, but is rarely mutated in the normal breast tissue or benign proliferative lesions (6). The frequency of such mutations progressively increases from low grade DCIS up to 40% in high grade CDIS (7,8). So, the changes in genic expression in carcinogenesis seem to occur during the transition from normal breast tissue to DCIS (6).

Chromosomal instability, with gain or loss of multiple loci, occurs as hyperplastic lesions progress from DCIS up to the invasive ductal carcinoma (IDC) (9). These results point to an important role played by the changes in TP53 precociously in the breast carcinogenesis process (7,8).

The tumor suppressor gene TP53, located in chromosome 17 (17p13.1), encodes a phosphoprotein that takes part in the cell cycle (10). More than 15

thousand inactivating mutations in TP53 gene alleles have been identified, with the majority of these being missense mutations (11). Approximately 80% of those mutations are grouped between exons 5 – 8 (12), and change the conformation, specificity, and linking sequence to the DNA and its role as a transcription factor (11). As a result, a synthesis occurs on a stable, non-functional and non-degradable protein that accumulates in the tumoral cells that can be detected through immunohistochemistry (13).

Approximately 50% of human carcinomas present mutations in the TP53 gene with loss of function of the protein it encodes, protein p53 (7,12,24). In sporadic breast carcinomas, those mutations were identified in 20% to 50% of cases, with a marked geographical heterogeneity in our population (12,15,16,17) and together with the loss of the wild allele, that is, loss of heterozygosity (18). A number of studies have evaluated the association of mutations in TP53 with different clinical phenotypes in breast carcinoma, with the majority of studies having associated the presence of mutations with a shorter survival (7).

Protein p53 has been called the “guardian of DNA integrity” and it acts as a transitional regulator induced in response to damages to DNA, and may lead to an interruption of the cellular cycle or induce apoptosis in response to the depletion of metabolites, thermal shock, hypoxia, viral oncoproteins and activated cell oncogenes (4,12,19,20,21,22).

Gene TP53 is polymorphic in codon 72 of the protein it encodes (14,23), at nucleotide 215 with a variable base pair (g.215 G>C) in exon 4, which results in the replacement of proline for arginine in the proteic sequence (8,24,26). Thus, p53 may contain an arginine (CGC) or proline (CCC) codon in this position that may be involved in susceptibility or predisposition for cancer, and it is possible to identify them through the use of restriction enzymes (10,23,26,27,28). This polymorphism features a widely variable ethnic and geographic distribution (14), and has been studied in several tumors, not only breast carcinoma, but also lung, colon, stomach and bladder carcinomas (29).

Gene TP53 with proline (Pro72) allele is structurally different from TP53 with arginine (Arg72) allele. Tumors that contain cells with Pro72 in TP53 are of slower appearance and smaller than tumors with Arg72 cells in TP53. Both human TP53 polymorphic forms seem to take part in breast cancer carcinogenesis (12,14,23). The Arg72 TP53 form is considered as more oncogenic (14,30) and

significantly associated to a higher frequency of mutations in gene TP53 in those tumors in which it is present (23).

The migration process in Brazil together with its large territorial extension contributes greatly to the diversity and complexity of the population's ethnic composition (31). The southernmost state in Brazil, Rio Grande do Sul (RS) comprises a population of mainly European origin which makes it different from the other regions in the country (31). Besides, it presents the second highest incidence of neoplasia in the country (2). This study aims at evaluating the frequency of R72P polymorphism in gene TP53 in patients suffering from invasive ductal breast cancer in the state of Rio Grande do Sul, and the association of this polymorphism with breast carcinoma and its clinical pathological characteristics.

Materials and Methods

Patients and controls

10 ml samples of peripheral blood in EDTA were collected from 76 patients suffering from invasive ductal carcinoma confirmed through anatomopathological exam who were treated and followed up at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Mastology Clinic at any stage of the disease. The control group consisted of 80 healthy donors from the Blood Bank at the HCPA. DNA was extracted from the peripheral blood with the salt precipitation procedure described by Miller et al. (1998) (32) and kept frozen at -20°C.

The patients attended in the presurgical evaluation were enrolled consecutively after reading the term of consent. During this consultation, demographic data were collected, as well as hormonal factor data, family history of carcinoma, progress history of benign breast disease through a questionnaire. Following the surgical treatment, data regarding the breast carcinoma were collected through routine anatomopathological and immunohistochemical exam performed at the HCPA Pathology Service.

This study was submitted and approved by the Scientific and Ethical Committee of the Research and Post-Graduation Group at the HCPA (Project N° 05-551). All the procedures were performed with informed consent by the patients.

Genetic material amplification through polymerase chain reaction (PCR)

Exon 4 of gene TP53 was amplified through the PCR method. For the PCR we used 5 µL of dNTP (Sigma), 5 µL ammonia plug (16mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris. HCL pH 8.8 and 0.1% Tween 20), 0.2 µL of Taq DNA polymerase Gibco, 1.5 µL MgCl₂, 1.5 µL of BSA, 1.0 µL of specific primers for the fragment being amplified for a final volume of 50 µL. The PCR primers used were described by Leistner-Segal et al (2006) (33).

PCR conditions were initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 40-second, annealing temperature of 56°C for 30 seconds, 72°C extension for 1 minute and final extension at 72°C for 10 minutes. The amplified, 350

pb fragment was observed through 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Digestion - R72P Polymorphism

To identify the exon 4 R72P polymorphism the PCR product was digested with 0.5 μ L of the restriction enzyme *Bst*UI (New England Biolabs, ME), 3 μ L buffer (10 mM Tris-HCL pH 7.5, 7 mM $MgCl_2$, 60 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoethanol and 0.01% BSA), 10 μ L of the PCR product for a final volume of 30 μ L. The tubes were incubated at 60°C in the thermocycler for 2 hours until fully digested. The digestion reaction was viewed through electrophoresis in 3% agarose gel stained with ethide bromide.

The restriction enzyme *Bst*UI recognizes the CG↓CG site, cleaving the 350 pb fragment into 191 pb and 159 pb, respectively in the presence of arginine allele (CGC). The proline allele (CGC) does not feature the restriction site and, therefore, is not cleaved, remaining 350 pb.

Absolute and relative frequencies were used to calculate differences between patients and control samples. The X^2 Pearson test was used to assess whether the groups were in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and to assess the presence of differences in relation to the genotype and allele frequency between the patient and control groups. The X^2 Pearson test with Yates' correction was used when appropriate. The statistical significance level considered was of $P < 0.05$. The association between R72P polymorphism in TP53 and breast carcinoma clinical pathological characteristics was assessed with the X^2 Pearson test (categorical variations). The association of allele frequency with data from the literature was assessed by the X^2 Pearson test with Yates' correction. Statistical analysis was performed with SPSS 12.0 (for Windows) and Pepi version 4.0.

Results

The 76 patients with histologically confirmed invasive ductal carcinoma (IDC) had an average age of 53.2 ± 13.2 years, with the vast majority self declared as white (64.5%). Of those patients, 15 (19.7%) featured a significant family history for the risk of developing breast carcinoma (considering first degree relatives affected). None of the patients in menopause were undergoing hormonal therapy. Following the surgical procedure, tumor stadium was determined through the anatomopathological exam result according to criteria from the AJCC classification (American Joint Committee on Cancer), sixth edition, with 27.6% of stage I, 28.9% stage IIA, 23.7% stage IIB, and 15.8% stage IIIA, 3.9% stage IIIC cases.

The histological grade was determined according to Nottingham Prognostic Index and each patient was assigned to one of three prognostic groups: 12 (15,8%) patients were in the good prognostic group, 46 (60,5%) in the moderate prognostic group and 13 (17,1%) in the poor prognostic group. It was not possible to assess the histological grade of 5 patients due to postneoadjuvant chemotherapy effects.

The methodology presented was adequate to amplify the exon 4 of gene TP53, having been tested in a previous study (33). The distribution of genotypes in codon 72 of gene TP53, both for patients and controls was in Hardy-Weiberg equilibrium. Data were analyzed as to genotype (table I) and allele (table II) frequencies. The frequency found for R72P polymorphism was similar between IDC patients and controls, with no significant difference being found in the genotype frequency ($P = 0.707$) and allele frequency ($P = 0.469$). Figure 1 shows the results from BstUI digestion showing the possible alleles.

There was no significant association between R72P polymorphism with clinical and pathological characteristics featured by the patients suffering from IDC (tables III and IV). The results from this study were compared with data from the literature, with no significant differences found between polymorphic allele frequencies, except for two studies involving a population of Ashkenazi Jewish women (34) and a population of Greek women (28) ($P < 0.001$) (table V). Upon comparing allele frequencies with those found in American subpopulations (35), there was a significant difference with Afro-Americans ($P < 0.001$) (table VI).

Discussion

The understanding of carcinogenesis mechanisms involving different neoplasias has been increasingly sought in countless studies throughout the world. Researches are carried out with the objective of understanding genetic, enzyme, and protein variations that may be involved in the progression from a normal to a neoplastic cell. Genetic changes such as mutations and some polymorphisms can involve any DNA region, in many cases leading to a cascade of events that will culminate in an increase of susceptibility to neoplasia development and the appearance of biological and clinical pathological changes that are characteristic of each tumor.

Many studies suggest an association between polymorphism in codon 72 in gene TP53 and the carcinogenesis of several human carcinomas such as cervical (36,37), lung (38,39), colorectal (40), bladder (41), and skin (42), including breast carcinoma (14,30,43-46), with controversial results. In 2002, Soultzis et al. published the first study that correlated the R72P polymorphism in gene TP53 with bladder cancer, providing evidence that this polymorphism is related to the carcinogenesis of this neoplasia. The presence of the Arg/Arg genotype may be related to an increased risk to develop bladder cancer (41).

R72P polymorphism seems to influence the expression of protein p53 (47), since it occurs within the transactivation domain of p53. Codon 72 is located in the hydrophobic region of the protein which determines its conformation, link to DNA, and the transcriptional activity (14). The differences in the p53 activity led the frequency of polymorphism in codon 72 of gene TP53 to be widely studied in recent years (23,30,41,47).

A sevenfold increase was described in the risk of developing cervical carcinoma associated to human papillomavirus (HPV) in homozygote patients for the arginine allele in codon 72 in relation to the patients who presented one or more proline alleles in codon 72 of gene TP53 (36). *In vitro* studies indicate that protein p53 containing arginine is more prone to suffer degradation from the HPV E6 oncoprotein (37).

The results presented in this study did not evidence statistically significant difference for genotype and allele frequencies of R72P between IDC patients and controls. Thus, R72P polymorphism in TP53 gene was not associated to an

increased risk of developing IDC in the population studied. Although there was no difference between the groups, the arginine allele in codon 72 was the most common in both groups, as has been shown by most studies (12).

These findings are in disagreement with some studies that found a significant difference in the frequency of Arg/Arg genotype in codon 72 between patients with breast carcinoma and controls (14,23,24,28,30,34,48), or with studies in which the Pro/Pro genotype was observed with more frequently in patients with breast carcinoma (43,49).

However, our data were consistent with those found in similar studies carried out with Turkish, Japanese, and Russian patients with breast carcinoma, which did not show differences in the distribution of the three genotypes (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro) between cases and controls (29,51,52). Similar results were also found in some studies involving colorectal carcinoma, in which no association was found with the different genotypes (40).

The Southern Region of Brazil have the highest proportion of caucasians, with the population of Rio Grande do Sul state consisting of immigrants from Portuguese, German, Italian, and, to a lesser degree, Slav origin (31). Today it is inhabited by a highly miscegenated population among human groups, not only of different races, but also different ethnic groups. This characteristics could explain, in part, the differences in the results presented in this study in relation to another one carried out in the same region (48). Damin et al. identified, when compared to the control group, a significantly higher frequency of the Arg/Arg genotype among 118 patients with breast carcinoma treated in the same institution (48).

Codon 72 polymorphism was observed as an independent risk factor for breast carcinoma in afro-americans and hispanics in the United States, but with a *borderline* significance in caucasians ($P = 0.054$) (53), with the arginine allele being more frequent in caucasians and hispanics, and the proline allele more common among afro-americans (53). Another study involving codon 72 (Arg/Pro) heterozygote chinese found evidence of a significant increase in the expression of the arginine allele in patients suffering from breast carcinoma, although there was no significant difference in the genotype frequencies between chinese patients and healthy controls. This suggests the possibility that the arginine allele is involved in breast carcinoma carcinogenesis (24).

There was no association of this polymorphism with clinical pathological characteristics presented by IDC in the present study, which may be a consequence of the small sample size. No association was found either in studies involving women with breast carcinoma in Greece and Turkey, as in another study carried out in the south of Brazil, which could mean that the R72P polymorphism does not interfere on the natural history of breast carcinoma (14,30,48). On the other hand, Han et al. identified that cases with Pro/Pro and Arg/Pro genotypes in codon 72 presented a smaller number of metastases for axillary lymph nodes when compared with the homozygote cases for arginine (54).

It was not possible to analyze the relation between survival and the studied polymorphism due to the relatively recent diagnostic of the patients in the study. However, a protective effect was observed for the death outcome among English patients suffering from breast carcinoma and the presence of the proline allele in R72P polymorphism, with lost of statistical significance in multivaried analysis (55). These findings are contrary to those reported by Tommiska et al., in which proline homozygote patients with breast carcinoma presented the worst prognostic when compared to other genotypes (45).

Conclusion

The contradictory findings involving R72P polymorphism in gene TP53 and the risks for breast carcinoma, as well as for other carcinomas, may be due to interracial, ethnic, and geographic variations. Given that the distribution of the proline allele seems to vary between different ethnic groups and the frequency of the arginine allele increases as the analyzed population groups distance themselves from the equator (12,14). Moreover, any change in the cleavage cycle may occur and lead to a partial digestion of the amplified fragment (exon 4). This change can only be confirmed through DNA sequencing (33,56).

Thus, R72P polymorphism in gene TP53 was not associated to an increased risk of developing IDC in the population studied. This finding may be related to the great interracial and ethnic variation in our population deriving from frequent miscegenations and exposure to different environmental factors that are important in the evolution of breast cancer. Further studies are required involving a larger number of patients to analyze mutation in splicing sites (7,17,23), also testing

for loss of heterozygosity (26) and the study of haplotypes involving different polymorphisms that seem to modify the risk for breast carcinoma in the TP53 gene could help identifying patients with greater risk of developing the disease (43,46). The applicability and generalization of the findings from this and other studies in relation to the risk for breast carcinoma remain uncertain and need to be established.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
2. Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2005. <http://www.inca.gov.br>. Cited at Jan. 2008.
3. Hellman S: Darwin's clinical relevance. *Cancer* 79 (12): 2275-2281, 1997.
4. Elledge RM and Allred DC: The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Research and Treatment* 32: 39-47, 1994.
5. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM and Mansel RE: The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 80(9): 1740-1745, 1997.
6. Burstein HJ, Polyak K, Wong J, Lestor SC and Kaelin CM: Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 350: 1430-1441, 2004.
7. Gasco M, Shami S and Crook T: The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4: 70-76, 2002.
8. Borresen-Dale AL: TP53 and breast cancer. *21*: 292-300, 2003.
9. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SAW, Osborne CK, Clark GM and Allred DC: Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *Journal of the National Cancer Institute* 90(9): 697-703, 1998.
10. IARC Homepage – International Agency to Research in cancer – p53 polymorphisms. In: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>. Cited at Nov. 2007.
11. Tanyi J, Tory K, Bánkfalvi A, Shröder W, et al. Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. *Pathology Oncology Research* 5(2): 90-94, 1999.
12. Gallo CVM, Azevedo G, Mendonça S, Moraes E, Olivier M and Hainaut P: TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutation Research* 589: 192-207, 2005.
13. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA and Borresen-Dale AL: Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Research* 61:2505-2512, 2001.

14. Buyru N, Tigli H and Dalay N: P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. 10: 711-714, 2003.
15. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor sub classes with clinical implications. PNAS 98(19): 10869-10874, 2001
16. Lai H, Lin L, Nadji M, Lai S, Trapido E and Meng L: Mutations in the p53 tumor suppressor gene and early onset breast cancer. Cancer Biology and Therapy 1: 31-36, 2002.
17. Nagai MA, Barbosa HS, Zago MA, Silva Jr WA et al: TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. International Journal of Oncology 23: 189-196, 2003.
18. Oesterreich S and Fuqua SA. Tumor suppressor genes in breast cancer. Endocrine-Related Cancer 6: 405-419, 1999.
19. Sherr CJ: The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Research 60: 3689-3695, 2000.
20. Sherr CJ and McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer. Cancer cell 2: 103-112, 2002.
21. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. Nature 408: 307-310, 2000.
22. Levine AJ, Hu W and Feng Z: The p53 pathway: What questions remain to be explored? Cell Death and Differentiation 13: 1027-1036, 2006.
23. Langerod A, Bukholm IRK, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA and Borresen-Dale AL: The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 11: 1684-1688, 2002.
24. Siddique MM, Balran C, Fiszler-Maliszewska L, Aggarwal A, et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(9): 2245–2252, 2005.
25. Martin A-M, Kanetsky PA, Amirmani B, Colligon TA, Athanasiadis G, Shih HA, Gerrero MR, Calzone K, Rebbeck TR and Weber BL: Germline TP53 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers: is *TP53* a modifier of *BRCA-1*? J Med Genet 40:e34: 1–6, 2003.

26. Bonafé M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C, Marzi E et al.: Retention of the p53 codon 72 arginine is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 9: 4860–4864, 2003.
27. Powell BL, Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns Els MJJ and Iacopetta B: Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 23(2): 311-315, 2002.
28. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT and Kotsis A: The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Letters* 222: 57-65, 2005.
29. Weston A and Godbold JH: Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 919-926, 1997.
30. Papadakis EN, Dokianakis DN and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer: *Molecular Cell Biology Research Communications* 3: 389-92, 2000.
31. Tendências Demográficas: uma análise da população com base nos resultados dos *Censos Demográficos 1940 e 2000: Tendências demográficas no período de 1940/2000: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); Rio de Janeiro, 2007.*
32. Miller SA: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988
33. Leistner-Segal S, Pilger DA and Segal F: TP53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett esophagus. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 170: 76 – 77, 2006.
34. Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Menachem TD, Barzilai SE and Friedman E: The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *British Journal of Cancer* 92: 1144-48, 2005.
35. NCI – National Cancer Institute. <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm>, Cited at September, 2007.
36. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovanit F et al.: Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated

- cancer. *Nature* 393: 229 – 234, 1998.
37. Crook T, Ludwig RL, Marston N, Willkomm D et al.: Sensitivity of p53 lysine to ubiquitin-directed degradation targeted by human papillomavirus E6. *Virology* 217: 285 – 292, 1996.
 38. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY and Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clinical Cancer Research* 5: 129 – 134, 1999.
 39. Pierce LM, Sivaraman L, Chang W, Lum A, Donlon T, Seifried A et al. Relationships of TP53 codon 72 and HRAS1 polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 1199–1204, 2000.
 40. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDC and Forones NM: Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol* 43: (1): 8-13, 2006.
 41. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN and Spandidos DA: P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters* 179: 175–183, 2002.
 42. O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM and Mabruk MJEMF: P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J. Clin. Pathol.* 54: 539-542, 2001.
 43. Sjölander A, Birgander R, hallmans G, cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G and Beckman L: p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*. 17(6): 1313-1316, 1996.
 44. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCalies EC and Weston A: Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 127 – 130, 2002.
 45. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallita J et al.: Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clinical Cancer Research* 11(14): 5098 – 5103, 2005.
 46. Buyru N, Altinisik J, Demokan S and Dalay N: p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 31: 207 – 213, 2007
 47. Soussi T and Bérout C: Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews* 1: 233 – 240, 2001.

48. Damin APS, Frazzon APG, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C and Alexandre COP: Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detection and Prevention* 30: 523 – 529, 2006.
49. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y and Noguchi S: Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Letters* 210: 197 – 203, 2004.
50. Weston A and Godbold JH: Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 919-926, 1997.
51. Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, Mokdad-Gargouri Raja et al.: No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010: 764 – 770, 2003.
52. Suspitsin EM, Buslov KG, Grigoriev MY, Ishutkina JG, Ulibina JM et al.: Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int. J. Cancer* 103: 413-433, 2003.
53. Weston A, Pan C, Ksieski B, Wallenstein S, Berkowitz GS, Tartter PI et al.: p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 6: 105 – 112, 1997.
54. Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW and Noh DY: Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clinical Cancer Research* 10: 124 - 130, 2004.
55. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BAJ, Easton DF and Pharoah PPD: Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Research* 62: 3052-3057, 2002.
56. Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R and Gargouri A: A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Letters* 189: 91 – 96, 2003.

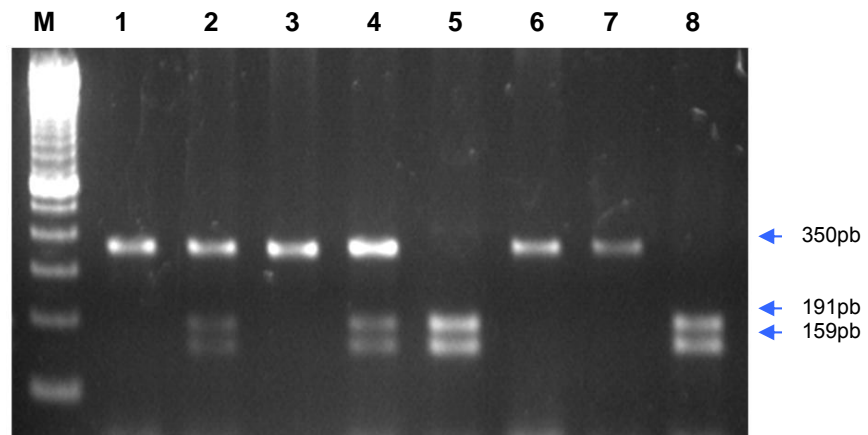


Figure 1. Agarose gel (3.0%) showing digestions carried out with *Bst*UI. Position M shows the 100 bp molecular weight marker. Positions 1, 3, 6 and 7 show the allelic patterns Pro/Pro, positions 2 and 4 show the allelic patterns Arg/Pro and positions 5 and 8 show the allelic patterns Arg/Arg for the R72P polymorphism of TP53.

Table I. Frequency of R72P polymorphism in gene TP53 in patients with invasive ductal breast carcinoma and controls

	Homozygotes Arg/Arg	Heterozygotes Arg/Pro	Homozygotes Pro/Pro	<i>P</i>
Patients (n = 76)	34 (44.7%)	33 (43.4%)	9 (11.8%)	0.707
Controls (n = 80)	31 (38.8%)	37 (46.3%)	12 (15.0%)	
Total (n = 156)	65	70	21	

χ^2 0.693

Table II. Allele frequency of R72P polymorphism in gene TP53 in patients with invasive ductal breast carcinoma and controls

	f(R)	f(P)	Total alleles	<i>P</i>
Patients (n = 76)	66.4 (101)	33.6 (51)	(152)	0.469
Controls (n = 80)	61.9 (99)	38.1 (61)	(160)	
Total	(200)	(112)	(312)	

χ^2 with Yates' correction 0.523

Table III. Clinical characteristics of patients suffering from invasive ductal breast carcinoma and R72P polymorphism in gene TP53

	N (%)	Homozygotes Arg/Arg (%)	Homozygotes Pro/Pro (%)	Heterozygotes Arg/Pro (%)	<i>P</i>
Age at diagnostic					
≤ 50 years	30 (39.5)	15 (44.1)	3 (33.3)	12 (36.4)	0.747
> 50 years	46 (60.5)	19 (55.9)	6 (66.7)	21 (63.6)	
Family history					
Yes	15 (19.7)	8 (23.5)	2 (22.2)	5 (15.2)	0.676
No	61 (80.3)	26 (76.5)	7 (77.8)	28 (84.8)	
Parity					
Yes	67 (88.2)	29 (85.3)	8 (88.9)	30 (90.9)	0.775
No	9 (11.8)	5 (14.7)	1 (11.1)	3 (9.1)	
Menopause					
Yes	57 (75)	27 (79.4)	6 (66.7)	24 (72.7)	0.678
No	19 (25)	7 (20.6)	3 (33.3)	9 (27.3)	

Table IV. Pathological characteristics of patients with invasive ductal breast carcinoma and R72P polymorphism in gene TP53

	N (%)	Homozygotes Arg/Arg (%)	Homozygotes Pro/Pro (%)	Heterozygotes Arg/Pro (%)	P
Tumor size					
T1 (\leq 2 cm)	32 (42.1)	18 (52.9)	3 (33.3)	11 (33.3)	0.508
T2 (3 – 5 cm)	39 (51.3)	14 (41.2)	5 (55.6)	20 (60.6)	
T3 (> 5 cm)	5 (6.6)	2 (5.9)	1 (11.1)	2 (6.1)	
Lymph nodes					
Positive	41 (53.9)	20 (58.8)	6 (66.7)	15 (45.5)	0.393
Negative	35 (46.1)	14 (41.2)	3 (33.3)	18 (54.5)	
Tumor grade					
1	12 (15.8)	2 (5.9)	2 (22.2)	8 (24.2)	0.229
2	46 (60.5)	25 (73.5)	4 (44.4)	17 (51.5)	
3	13 (17.1)	5 (14.7)	3 (33.3)	5 (15.2)	
Undetermined	5 (6.6)	2 (5.9)	0	3 (9.1)	
LVI¹					
Yes	15 (19.7)	8 (23.5)	2 (22.2)	5 (15.2)	0.676
No	61 (80.3)	26 (76.5)	7 (77.8)	28 (84.8)	
EISC²					
Yes	18 (23.7)	9 (26.5)	2 (22.2)	7 (21.2)	0.874
No	58 (76.3)	25 (73.5)	7 (77.8)	26 (78.8)	
ER³					
Positive	61 (80.3)	27 (79.4)	8 (88.9)	26 (78.8)	0.785
Negative	15 (19.7)	7 (20.6)	1 (11.1)	7 (21.2)	
PR⁴					
Positive	56 (73.7)	25 (73.5)	7 (77.8)	24 (72.7)	0.954
Negative	20 (26.3)	9 (26.5)	2 (22.2)	9 (27.3)	
p53					
Positive	36 (47.4)	17 (50)	5 (55.6)	14 (42.4)	0.719
Negative	40 (52.6)	17 (50)	4 (44.4)	19 (57.6)	
HER-2/neu					
Negative	18 (23.7)	8 (23.5)	0	10 (55.6)	0.147
1+	16 (21.1)	8 (23.5)	3 (33.3)	5 (15.2)	
2+	19 (25)	6 (17.6)	5 (55.6)	8 (24.2)	
3+	23 (30.3)	12 (35.3)	1 (11.1)	10 (30.3)	

1 - LVI: lymph-vascular invasion; 2 - EISC: extensive *in situ* component; 3 – ER: estrogen receptor;

4 – PR: progesterone receptor

Table V. Comparison of polymorphic allele frequencies in codon 72 TP53 between the 76 patients in this study with the frequencies in cases reported worldwide.

Studies	N¹	Arginine Allele²	P³
Noma et al.	382	255	0.999
Buyru et al.	230	167	1.378
Tommiska et al.	3102	2267	0.089
Damin	404	251	0.399
Papadakis et al.	112	78	0.677
Ohayon et al.			
Non-Ashkenazi Jews	48	38	0.137
Ashkenazi Jews	216	180	< 0.001
Han et al	1328	881	0.999
Siddique et al.	188	123	0.934
Kalemi et al.	87	84	< 0.001
Mabrouk et al.	63	45	0.581

1 – N: total allele number; 2 - Polymorphic allele; 3 - Value obtained from χ^2 calculation with Yates' correction

Table VI. Comparison of polymorphic allele frequencies in codon 72 TP53 between the 76 patients in this study with the frequencies in American subpopulations (NCI)

Studies	N¹	Arginine Allele²	P³
Afro-Americans	48	14	< 0.001
Caucasians	62	45	0.476
Hispanic	46	32	0.829

1 – N: total allele number; 2 - Polymorphic allele; 3 - Value obtained from χ^2 calculation with Yates' correction

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A perda do controle do ciclo celular e a progressão para neoplasia envolvendo mutações no gene TP53, nos éxons 5 a 8, já estão bem estabelecidas. A frequência e o significado funcional dos polimorfismos envolvendo o gene TP53, em especial, o polimorfismo R72P, ainda precisam ser explorados e melhor entendidos, uma vez que se acredita que possam contribuir para uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores, participando de sua carcinogênese.

Em nosso estudo, não encontramos associação entre o polimorfismo R72P e o carcinoma de mama ductal invasor na população estudada. Este achado pode estar relacionado à grande variação inter-racial e étnica em nossa população, decorrente de freqüentes miscigenações e exposição a diferentes fatores ambientais, importantes na evolução do carcinoma de mama. Não foi possível realizar avaliação estatística adequada da associação deste polimorfismo com as características clínicas e patológicas apresentadas pelas pacientes, provavelmente pelo pequeno tamanho da amostra.

Cabe ressaltar que, apesar da maioria dos estudos identificarem o alelo Arg72 como fator de risco associado ao desenvolvimento do carcinoma de mama, muitos resultados contraditórios são encontrados entre os estudos deste polimorfismo dentro do carcinoma de mama e também em outras neoplasias. Novamente, estes achados parecem estar relacionados a variações inter-raciais, étnicas e também geográficas.

Alterações no sítio de clivagem também podem ocorrer, levando à digestão parcial do fragmento amplificado (éxon 4), o que pode ser confirmado apenas pelo seqüenciamento do DNA.

Outros estudos, considerando a avaliação de haplótipos envolvendo diferentes polimorfismos no gene TP53 e da perda de heterozigosidade (LOH), podem vir a identificar fatores de risco associados ao desenvolvimento do carcinoma de mama nesta população estudada.

Nos objetivos iniciais deste estudo, fazia parte a avaliação da LOH para o polimorfismo no códon 72 do gene TP53 nas pacientes com carcinoma de mama ductal invasor, comparando amostras de DNA obtidas de sangue periférico e de tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina.

Foram selecionados os blocos de parafina das 33 pacientes cujo genótipo foi heterozigoto para o polimorfismo R72P. Como cada paciente pode conter vários blocos de parafina do tecido tumoral, foram revisadas as lâminas de H&E correspondentes a estes blocos, junto com patologista do Serviço de Patologia, para selecionar o bloco com maior componente de carcinoma de mama. Foram realizados cortes com 10 micra com o uso do micrótomo (lavado com etanol antes de processar os cortes de cada bloco). Um possível viés é a “contaminação” deste material por células normais, o que somente pode ser controlado pelo uso da microdissecção e captura a laser (MCL). No Brasil, há raros microscópicos para MCL, sendo uma técnica pouco acessível.

Foi realizada a desparafinização dos tecidos obtidos dos blocos de parafina, a partir de metodologia descrita por Andreassen et al. (2004), e efetuada a extração do DNA. Ao buscar comprovar a extração de DNA pela PCR, não ocorreu a amplificação da região do DNA correspondente ao éxon 4. A técnica de PCR utilizada já havia sido testada nas análises do sangue deste estudo e também em outros estudos realizados.

Após algumas mudanças no volume de DNA utilizado, no volume de $MgCl_2$ e na temperatura de anelamento da PCR, não se obteve resultados favoráveis. Desta forma, acreditamos que o problema envolve as amostras de DNA extraídas como baixa concentração de DNA e/ou inibição da reação de PCR por contaminantes da amostra de DNA (como o formol utilizado para fixação). Outro forte fator influente no sucesso da amplificação do DNA obtido de tecido incluído em parafina é o grau de fragmentação do DNA presente nessas amostras (com ausência das seqüências-alvo pesquisadas), além de um efeito direto do fixador, tempo e/ou temperatura de fixação utilizada no processamento dessas amostras no Serviço de Patologia.

A avaliação da LOH auxilia no entendimento dos processos de reparo ao DNA e da carcinogênese do carcinoma de mama e, na avaliação do prognóstico dessas pacientes, a partir da retenção do alelo mais associado a mutações e ao risco de desenvolvimento do carcinoma de mama. Além disso, como, muitas vezes, os arquivo dos Serviços de Patologia são a única fonte acessível de amostras teciduais, vamos estudar metodologias capazes de extrair o material necessário (DNA) para as possíveis análises. Desta forma, planejamos seguir nosso estudo com a pesquisa da LOH para o polimorfismo no códon 72 do gene TP53 nas

pacientes com carcinoma de mama ductal invasor, a partir das amostras de tecido fixados e incluídos em parafina, buscando também padronizar técnica para desparafinização, seguida da extração de DNA.

Ressaltamos a importância da existência de biobancos institucionais para o fornecimento de amostras biológicas de qualidade, processadas de forma adequada a servir como substrato às novas técnicas de biologia molecular, sendo um dos planos para o futuro a utilização das amostras armazenadas no Banco de Tumores do Serviço de Mastologia do HCPA criado para este fim.

ANEXO I – Consentimento 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 pequena 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 da 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 estudos 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 estes estudos.

c) Caso eu esteja impossibilitada, por qualquer motivo, de receber esses 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: ____ / ____ / ____

ANEXO II - Ficha de coleta de dados

SERVIÇO DE MASTOLOGIA - BANCO DE TECIDOS/DNA: PROJETO R72 P – TP53 FICHA DE COLETA DE DADOS

1. DATA:		2. PRONTUÁRIO:		3. FICHA Nº	
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO			Data da Assinatura do Consentimento:		
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 lesão de maior risco)					
29. NÚMERO DE BIÓPSIAS MAMA PRÉVIAS:					
30. HISTÓRIA PESSOAL DE CÂNCER (OUTROS // idade INÍCIO):					
HISTÓRIA PESSOAL DE CÂNCER: 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. HER 2:		
MICROMETÁSTASES: Sim () Não ()			45. FISH HER 2:		
37. TAMANHO TUMOR – CLÍNICO: mm			46. p 53:		
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 DEFINITIVO: 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:	M:	ESTÁGIO:
LOCAL METÁSTASES:			
TRATAMENTOS COMPLEMENTARES			
50. QT NEO: não // sim: 1ª Linha _____ Total	TOTAL CICLOS: _____	51. Resposta: Não // Parcial //	
mm 2ª Linha _____	TOTAL CICLOS: _____	Tamanho TU após QT:	
52. QT ADJ: não // sim: 1ª Linha _____	TOTAL CICLOS: _____		
2ª Linha _____	TOTAL CICLOS: _____		
53. RXT ADJ: não // sim: _____			
54. HORMONIOTERAPIA ADJ: não // sim: Esquema _____			
55. OUTROS: _____			
RECIDIVA - DATA:			
56. TOPOGRAFIA: _____		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

ANEXO III – Instruções aos autores do periódico *Oncology Reports*

Information for Authors

For a printable version of the Information regarding e-mail submission of figures

Instructions to Authors for:

International Journal of Oncology

International Journal of Molecular Medicine

Oncology Reports

Molecular Medicine Reports

The principal aim of the above journals is to provide for the prompt publication of original works of high quality. Manuscripts will be accepted on the understanding that they report original unpublished works on the cancer problem and are not under consideration for publication by another journal. All material submitted will be subject to review by appropriate referees selected by the Editorial Office. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style. The corresponding author is responsible on behalf of all authors for the submission.

- **Submission of manuscripts:**
E-mail submission:

One file including text and tables should be sent as Microsoft Word (.doc file) to contact@spandidos-publications.com. Illustrations must be submitted as separate files (.tiff format, 300 dpi). Save color figures as CMYK files. Label the text file with the surname of the first author and illustration files as Fig. 1, Fig. 2 etc.

Print submission:

- By regular mail:
Professor D.A. Spandidos
P.O.B. 18179, Athens 116 10, Greece
- By courier service (overnight mail):
Professor D.A. Spandidos
10, Vriaxidos Street, Athens 116 35, Greece
- **Cover letter:** Summarize briefly the main importance of the submitted work.
- **Format:** Original work and review articles concerning fields of recognisable progress are accepted for evaluation. Manuscripts should be written in clear, concise English and should contain all essential data in order to make the presentation clear.
- **General style:** Title of the work, sub-titles and general headlines should be presented in lower case letters (not capitals). Indicate affiliations of the Authors by number (not symbols). Abstract should be continuous (without reference numbers, or headlines).
- **Manuscripts:** Submitted manuscripts should include abstract, text, figures and references. Manuscripts reporting experimental results should be divided into the following sections: (a) First page should include the title of the presented work, full names and full postal addresses of all Authors, name and the e-mail address of the Author to whom correspondence is to be sent, key words and an abbreviated running title; (b) Abstract of approximately 150-300 words; (c) Introduction; (d) Materials and methods; (e) Results; (f) Discussion; (g) Acknowledgements and (h) References. The pages should be numbered consecutively. Footnotes should not be used.
- **Reviews:** Review articles may have different sections and headlines according to the subject matter and the Author's opinion; however, an Abstract is mandatory. The main headlines of the review should be summarized as a contents section immediately following the Abstract.
- **Figures:** Color figures are welcome, however, should be submitted only if reproduction in color is intended (a charge will be made for this). Electronically submitted figures should be sent in high resolution (300 dpi) and color figures saved as CMYK files. Figures in print should be clear, high contrast of the size they are to appear in the journal; 8.00 cm (3.15 in) wide for a

single column; 17.00 cm (6.70 in) for a double column; maximum height 20.00 cm (7.87 in). Graphs should not require any artwork or typesetting, symbols, numbering and lettering should be clearly legible and of appropriate size. The number, and top of each figure should be indicated.

- **Tables:** Each table should be submitted on a separate page, and typed using double-spacing. Tables should be numbered with Roman numerals and should include a short title.
- **Nomenclature and Abbreviations:** Nomenclature should follow that given in Chemical Abstracts. Standard abbreviations are preferable. If a new abbreviation is used, it should be defined at its first usage.
- **References:** Citation of journal titles follow the standard form of Index Medicus and the references must be numbered consecutively. Do NOT use full stop after initials or abbreviations. In the text, references should be cited by number in soft brackets e.g. (1-3) (1,2). Inclusive page numbers should be given. Complete Author list is preferred, however, if more than 7 Authors, 3 names and *et al* can be used. Following are examples of order and style, which should be strictly adhered to:
 - Spandidos DA and Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310: 469-475, 1984.
 - Hall A, Morris JDH, Price B, Lloyd A, Hancock JF, Gardener S, Houslay MD, Wakelam MJO and Marshall CJ: The function of the mammalian Ras proteins. In: *Ras oncogenes*. Spandidos DA (ed.) Plenum Publ. Corp., New York, pp99-104, 1989.Personal communications should be avoided. Manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, and abstracts, may be cited in the text, however should NOT be included in the list of references.
- **Proofs:** It is of vital importance that Authors check their manuscripts carefully before submission, because any errors will be faithfully transferred into the typeset version.
- **Reprints:** A reprint order form will accompany notification of acceptance of a manuscript and should be completed and returned immediately.
- **Page charges:** Accepted manuscripts will be published on the understanding that the author(s) will pay the page charges as indicated on submission.