

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E CÂNCER DE MAMA COM  
SUPEREXPRESSÃO DE HER2**

**Mariana Fitarelli Kiehl**

Porto Alegre, fevereiro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E CÂNCER DE MAMA COM  
SUPEREXPRESSION DE HER2**

**Mariana Fitarelli Kiehl**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla**

Porto Alegre, fevereiro de 2015.

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado está organizada em três partes principais, conforme descrito a seguir:

**Parte I:** Introdução e objetivos

**Parte II:** Resultados apresentados na forma de três artigos científicos, organizados em capítulos, em substituição às seções de Material e Métodos e Resultados

**Parte III:** Discussão e Conclusões

A seção de anexos compreende: a) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado às pacientes recrutadas para este estudo; b) Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; c) Figuras complementares ao capítulo 3, contendo os gráficos das análises *High Resolution Melting* (HRM) e eletroferogramas referentes às pacientes em que foi identificada alteração no gene *TP53*.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

As análises moleculares, necessárias para a obtenção dos resultados constantes nesta tese, foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica (LMG) e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), ambos situados no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As entrevistas para recrutamento de pacientes e coletas de sangue periférico foram conduzidas no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) da mesma instituição. As análises de patologia foram realizadas no Serviço de Patologia do HCPA e no laboratório privado Medicina Diagnóstica da cidade de Erechim, Rio Grande do Sul.

Os recursos para a realização deste estudo foram providos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; Edital PPSUS 2013, Processo 1188-2551/13-8) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA; projeto 11-0427). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de doutoramento.

Ao meu marido Hugo e à minha mãe Sonia,  
os amores da minha vida  
e à quem devo tudo o que sou.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Patricia Ashton-Prolla, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo carinho. Teu profissionalismo, tua maneira de orientar, sempre com sabedoria e gentileza, servirão como guia na minha vida profissional. Obrigada acima de tudo pelo incentivo e suporte quando a vida me trouxe novos desafios!

À minha querida mãe, Sonia, por todo amor necessário para superar a distância e a saudade em prol do meu crescimento. Por abrir mão de muita coisa pra que meus sonhos fossem realizados. Nenhuma palavra será suficiente pra expressar meu amor e gratidão por ti.

Ao meu marido Hugo, pelo amor, pela cumplicidade, por me fazer rir mesmo nos dias de luta. Por ser a minha melhor metade! Te amo pra sempre.

À minha segunda família, meus amados sogros Maria Eugênia e Cláudio, pelo cuidado, parceria, pelo exemplo de doação a quem precisar.

A todos que participaram ativamente deste trabalho, pelo empenho, dedicação, pelas discussões científicas: Pati S., Vanessa, Cleandra, Gustavo, Ju, Diego Uchôa, Cris Netto. A todos demais colegas do CPE-HCPA, pela torcida e amizade.

Aos meus amigos Bárbara, Gabriel e Marina, por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e suave, uma extensão de casa. Pela amizade que ultrapassa as barreiras de tempo e distância.

Às pacientes e seus familiares, pelo esforço em ir até o HCPA, dispor de seu tempo, mesmo durante um difícil tratamento. Pelo altruísmo, todas doando um pouco de si em benefício de uma causa única.

A Deus, acima de tudo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>PARTE I</b>	<b>13</b>
<hr/>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)	14
1.2. Proteína p53	16
1.3. Mutações no gene <i>TP53</i>	18
1.3.1. <i>Mutação TP53-p.R337H</i>	19
1.3.2. <i>Análise molecular do gene TP53</i>	22
1.4. Mutações no gene <i>TP53</i> em câncer de mama	24
1.5. Câncer de mama com superexpressão de HER2	26
1.5.1. <i>Vias de sinalização de HER2</i>	27
1.5.2. <i>Diagnóstico e terapias-alvo</i>	29
1.6. Justificativa	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
<b>PARTE II</b>	<b>33</b>
<hr/>	
<b>3. CAPÍTULO 1:</b> <i>The breast cancer immunophenotype of TP53-p.R337H carriers is different from that observed among other pathogenic TP53 mutation carriers</i>	<b>34</b>
<b>4. CAPÍTULO 2:</b> <i>Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53</i>	<b>39</b>
<b>5. CAPÍTULO 3:</b> <i>Germline TP53 mutation analysis in patients diagnosed with HER2 overexpressing breast cancer</i>	<b>71</b>

<b>PARTE III</b>	<b>90</b>
<b>6. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>99</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>107</b>
9.1. Anexo 1: TCLE do presente estudo.	107
9.2. Anexo 2: Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	109
9.3. Anexo 3: Figura complementar ao artigo científico do capítulo 3.	110



## LISTA DE ABREVIATURAS

**A** – Adenina

**AKT** – *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (também conhecida como *Protein Kinase B - PBK*)

**AP-2 $\alpha$**  – *Activating enhancer binding Protein 2 alpha*

**ATM** – *Ataxia Telangiectasia Mutated gene*

**BRCA1** – *Breast Cancer 1 gene*

**BRCA2** – *Breast Cancer 2 gene*

**C** – Citosina

**CDI** – Carcinoma Ductal Invasor

**CDIS** – Carcinoma Ductal *in situ*

**CHEK2** – *Checkpoint Kinase 2 gene*

**CISH** – Hibridização *in situ* cromogênica (*Chromogenic In Situ Hybridization*)

**CpG** – Citosina conectada por ligação fosfodiéster a guanina (*C-phosphodiester bond-G*)

**DM1** – N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (*Mertansine*)

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

**EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

**ERBB2** – *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene*

**FDA** – *United States Food and Drug Administration*

**FISH** – Hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ Hybridization*)

**G** – Guanina

**G1** – Primeira fase de crescimento do ciclo celular (*Growth 1/Gap 1 Phase*)

**HER2** – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

**HRM** – Análise de dissociação do DNA em alta resolução (*High Resolution Melting*)

**IARC** – *International Agency for Research on Cancer*

**IHQ** – Imunohistoquímica

**INCa** – Instituto Nacional de Câncer

**MDM2** – *Mouse Double Minute 2 Homolog*  
**NCCN** – *National Comprehensive Cancer Network*  
**OMIM** – *Online Mendelian Inheritance in Man*  
**p53** – Proteína tumoral p53  
**p63** – Proteína tumoral p63  
**p73** – Proteína tumoral p73  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
**pH** – Potencial de Hidrogênio  
**PI3K** – Fosfatidilinositol 3-quinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)  
**PTEN** – *Phosphatase and Tensin Homolog gene*  
**RE** – Receptor de estrogênio  
**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
**RP** – Receptor de progesterona  
**S** – Fase de síntese do ciclo celular (*Synthesis phase*)  
**SIRT1** – *Sirtuin 1 protein*  
**SLF** – Síndrome de Li-Fraumeni  
**SLFL** – Síndrome de Li-Fraumeni-like  
**SNP** – *Single-Nucleotide Polymorphism*  
**T** – Timina  
**TCGA** – *The Cancer Genome Atlas*  
**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
**T<sub>m</sub>** – Temperatura de dissociação (*Melting Temperature*)  
**TP53** – *Tumor Protein p53 gene*

## RESUMO

Mutações germinativas no gene *TP53* estão associadas às síndromes de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-*like* (SLF/SLFL), síndromes autossômicas dominantes caracterizadas pela predisposição hereditária a vários tipos de tumores em idade jovem. Entre mulheres com SLF, o câncer de mama (CM) é o tumor mais prevalente, e estudos recentes demonstraram que superexpressão de HER2 ocorre na maioria dos casos. No Brasil, a prevalência da mutação germinativa *TP53*-p.R337H é excessivamente alta tanto na população em geral quanto em pacientes afetados por câncer, devido a um efeito fundador. Os estudos apresentados nesta tese tiveram por objetivo explorar a associação entre a SLF e o CM com superexpressão de HER2, no contexto de diferentes mutações germinativas em *TP53*, incluindo p.R337H. Nossos resultados demonstraram que o imunofenótipo do CM em portadores da mutação p.R337H não é comumente HER2-positivo, conforme observado entre portadores de outras mutações patogênicas em *TP53*, sugerindo que diferentes mutações germinativas neste gene podem predispor a CM através de diferentes mecanismos. Nós também investigamos a prevalência de variantes germinativas de *TP53* em uma coorte de mulheres com CM com superexpressão de HER2 diagnosticado antes dos 60 anos de idade, e a frequência de mutações não funcionais foi 1,9%. Embora esta prevalência encontrada tenha sido mais baixa do que o esperado, a realização de teste genético de *TP53* deve ser considerada em pacientes com CM HER2-positivo, mesmo na ausência de história familiar de câncer. Neste caso, a utilização de uma técnica para detecção de mutações que seja robusta, confiável e acessível é essencial. Portanto, nós comparamos a performance e os custos de diferentes metodologias (sequenciamento de Sanger, PCR-RFLP, PCR em tempo real pelo método TaqMan e HRM), utilizando como modelo a genotipagem de p.R337H. Sequenciamento foi o método mais custoso, seguido por TaqMan, RFLP e HRM. Todas metodologias apresentaram resultados 100% concordantes e são adequadas para a detecção de mutações em *TP53*, sendo a escolha dependente da aplicação e do cenário clínico.

## ABSTRACT

Germline mutations in the *TP53* gene are associated to Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like Syndromes (LFS/LFL), autosomal dominant disorders characterized by increased predisposition to multiple early-onset tumors. Among LFS women, breast cancer (BC) is the most prevalent tumor and recent reports found that HER2 overexpression occurs in the majority of the cases. In Brazil, the prevalence of the *TP53*-p.R337H germline mutation is exceedingly high in the general population and in cancer-affected patients, as result of a founder effect. The studies presented in this thesis aimed to explore this association between the LFS and HER2-overexpressing BC, in the context of different *TP53* germline mutation, including the p.R337H. Our results showed that the BC immunophenotype of p.R337H carriers was not commonly HER2-positive, as observed among other pathogenic *TP53* mutation carriers, suggesting that different germline mutations in this gene may predispose to BC through different mechanisms. We also investigated the prevalence of germline *TP53* sequence variants in a cohort of women diagnosed with HER2-overexpressing BC before age 60 years, and the frequency of non-functional mutations was 1.9%. Although this prevalence was lower than expected, *TP53* testing should be considered in HER2-positive BC patients even in the absence of family history of cancer. In this case, the use of a robust, reliable and affordable mutation detection technique is essential. Therefore, we compared performance and cost different methodologies (Sanger sequencing, PCR-RFLP, real-time TaqMan PCR and HRM), using the p.R337H genotyping as model. Sequencing was the most expensive method followed by TaqMan, RFLP and HRM. All methodologies showed 100% agreement results and are suitable for the detection of *TP53* mutations, being the choice depending on the application and clinical scenario.

# **PARTE I**

## **Introdução e Objetivos**

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)

Em 1969, Li e Fraumeni identificaram uma alta incidência de diferentes tipos de câncer em idade precoce entre os familiares de algumas crianças diagnosticadas com rabdomyossarcomas, levando à definição da Síndrome de Li-Fraumeni (Li and Fraumeni Jr. 1969).

A SLF (OMIM #151623) é uma síndrome autossômica dominante de predisposição hereditária a vários tipos de câncer, especialmente sarcomas, câncer de mama, tumores do sistema nervoso central, leucemia e tumores adrenocorticais, diagnosticados em idade jovem (Li et al. 1988). O carcinoma de mama é o tumor mais frequente em famílias com SLF, contabilizando aproximadamente 30% dos tumores (Kleihues et al. 1997; Olivier et al. 2003).

A SLF clássica e suas variantes, coletivamente denominadas de Síndrome de Li-Fraumeni-*like* (SLFL), são duas formas da síndrome que compartilham muitas porém não todas características clínicas. Os critérios para determinação do diagnóstico clínico da SLF e da SLFL estão apresentados no Quadro 1.

Em 1990, as síndromes SLF e SLFL foram associadas a mutações germinativas no gene *TP53* (Malkin et al. 1990). No entanto, nem todas as famílias com tumores característicos da SLF/SLFL apresentam mutações em *TP53*. Estudos descrevem mutações germinativas neste gene são encontradas em 70 a 90% das famílias que preenchem o critério clássico da SLF (Li et al. 1988; Malkin et al. 1990; Petitjean et al. 2007) e em 21% das que preenchem o critério de Chompret (Ruijs et al. 2010).

A SLF apresenta alta penetrância. Análise de segregação realizada em famílias com SLF demonstrou que indivíduos portadores de mutações germinativas no domínio de ligação ao DNA de *TP53* têm um risco de 50% de desenvolver algum tipo de câncer até os 40 anos de idade, comparado a 1% na população em geral, e de 90% até os 60 anos de idade (Lustbader et al. 1992).

**Quadro 1.** Critérios clínicos para SLF e SLFL.

<p><b>Critério Clássico para a SLF</b> (Li et al. 1988)</p>	<p>Probando diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos de idade; E Familiar de primeiro grau<sup>a</sup> diagnosticado com qualquer câncer antes dos 45 anos; E Outro familiar de primeiro ou segundo grau<sup>b</sup> com diagnóstico de câncer antes dos 45 anos ou sarcoma em qualquer idade.</p>
<p><b>Critério de Birch para a SLFL</b> (Birch 1994)</p>	<p>Probando com qualquer câncer na infância ou sarcoma, tumor no sistema nervoso central ou carcinoma adrenocortical antes dos 45 anos; E Familiar de primeiro ou segundo grau com câncer típico da SLF (sarcoma, câncer de mama, tumor no sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade; E Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer antes dos 60 anos.</p>
<p><b>Definição de Eeles para a SLFL</b> (Eeles 1995)</p>	<p>Presença de dois familiares de primeiro ou segundo grau com tumor típico da SLFL em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor no sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical, leucemia, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático).</p>
<p><b>Critério de Chompret para testagem de mutações germinativas em TP53</b> (Tinat et al. 2009)</p>	<p>Probando com tumor típico da SLF (sarcoma, tumor no sistema nervoso central, câncer de mama pré-menopáusico, carcinoma adrenocortical, leucemia, carcinoma brônquio-alveolar de pulmão) antes dos 46 anos, e pelo menos um familiar de primeiro ou segundo grau com câncer típico da SLF antes dos 56 anos (exceto câncer de mama caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores; OU Probando com múltiplos tumores primários, sendo pelo menos dois do espectro da LFS e o primeiro antes dos 46 anos; independente da história familiar; OU Probando com carcinoma adrenocortical ou tumor de plexo coróide, independente da história familiar.</p>

<sup>a</sup> São considerados familiares de primeiro grau os pais, irmãos e filhos

<sup>b</sup> São considerados familiares de segundo grau os avós, tios, sobrinhos e netos

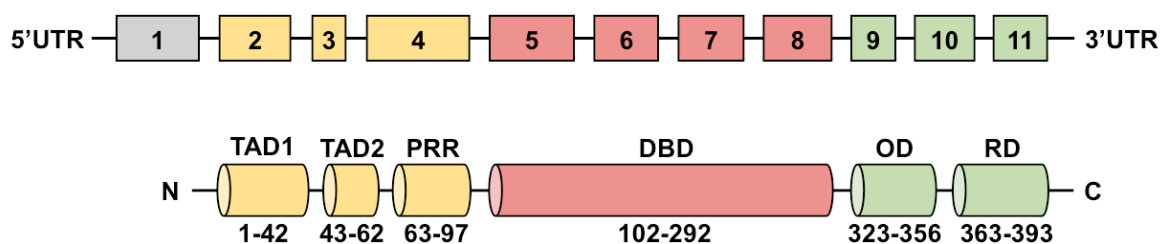
Até o momento, mutações germinativas em *TP53* foram detectadas em mais de 500 famílias com características completas ou parciais da SLF (Petitjean et al. 2007). Na Europa e Estados Unidos, a taxa de portadores de mutação germinativa em *TP53* na população em geral pode variar de 1:5.000 a 1:20.000 nascidos-vivos (Lalloo et al. 2006; Gonzalez et al. 2009). No Brasil, a prevalência de mutações clássicas em *TP53* na população em geral ainda não foi determinada.

## 1.2. Proteína p53

A proteína p53 é codificada pelo gene *TP53* (OMIM #191170) (Levine 1989), que está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), compreende 20 kb de DNA genômico e está dividido em 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante (Isobe et al. 1986; Bourdon et al. 2005). A estrutura do gene *TP53* está esquematizada na Figura 1.

A proteína p53, conhecida como “guardiã do genoma”, é um fator de transcrição de vida curta, cuja capacidade de mediar a supressão tumoral tem sido amplamente estudada. A p53 exerce múltiplas funções antiproliferativas através do controle transcricional de diversos genes-alvo e através de interações proteína-proteína. É uma fosfoproteína tetramérica, sendo que cada monômero é composto por 393 aminoácidos, cuja estrutura é típica de outros reguladores transcricionais, com seis domínios estruturais e funcionais principais (Figura 1): a) dois domínios de transativação amino-terminais (resíduos 1 a 62); b) um domínio regulatório, rico em prolinas (resíduos 63 a 97); c) um domínio central, altamente conservado evolutivamente, responsável pela ligação de p53 a sequências de DNA consenso de regiões promotoras em genes alvo (resíduos 102 a 292); d) um domínio de oligomerização, fundamental para a formação de tetrâmeros de p53 (resíduos 323 a 356); e) um domínio carbóxi-terminal, envolvido na regulação da ligação ao DNA (resíduos 363 a 393) (Beckerman and Prives 2010).





**Figura 1.** Estrutura do gene *TP53*, composto por 11 éxons (painel superior) e da proteína p53 (painel inferior). 5'UTR: região 5' não traduzida; 3'UTR: região 3' não traduzida; N: porção amino-terminal; C: porção carbóxi-terminal; TAD1: domínio de transativação 1 (*Transactivation Domain 1*); TAD2: domínio de transativação 2; PRR: região rica em prolina (*Proline Rich Region*); DBD: domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*); OD: domínio de oligomerização (*Oligomerization Domain*); RD: domínio regulatório (*Regulatory Domain*).

Em células normais não expostas a estresse, o nível e a atividade de p53 são muito baixos, devido à sua ativa degradação por proteossomo mediada pela ubiquitina ligase MDM2. MDM2 é uma oncoproteína que se liga ao domínio de transativação de p53 e atua como seu regulador negativo (Olivier et al. 2009). Várias formas de estresse, como dano ao DNA, sinalização oncogênica, hipóxia, estresse oxidativo, encurtamento telomérico, entre outros, promovem a estabilização e ativação de p53 através de modificações pós-traducionais, permitindo que a proteína escape da degradação e tenha capacidade de se ligar a sequências específicas de DNA. Os sítios de ligação reconhecidos por p53 encontram-se geralmente em regiões promotoras de uma série de genes, que são diferencialmente modulados (induzidos ou reprimidos) dependendo do tipo celular, da natureza do estresse e da extensão do dano (Lacroix et al. 2006; Vousden and Prives 2009; Beckerman and Prives 2010).

A proteína p53 modula a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, mediando, assim, a parada das células em um dos principais pontos de checagem do ciclo celular, na transição da fase G1 para a S. A proteína p53 previne a proliferação de células cujo DNA esteja danificado, atuando na

manutenção da integridade genômica (Lacroix et al. 2006). Além disso, p53 também exerce um efeito na estabilidade de outras proteínas celulares como, por exemplo, a proteína *SIRT1*, que funciona como um fator de sobrevivência, e sua degradação mediada por p53 pode favorecer a morte celular e, assim, a apoptose dependente de p53. Apoptose e parada do ciclo celular são as respostas celulares induzidas por p53 melhor caracterizadas até o momento, porém, estudos têm demonstrado que p53 também atua nos processos de reparo do DNA, diferenciação celular, inibição da angiogênese, inibição da proliferação celular, indução da senescência, modulação da migração celular, entre outros (Olivier et al. 2009; Lane and Levine 2010).

### **1.3. Mutações no gene *TP53***

A perda de função de p53 por mutações deletérias no gene *TP53*, permite que a divisão celular ocorra mesmo que o DNA esteja danificado, predispondo as células a um rápido acúmulo de danos genéticos. Alterações somáticas em *TP53* ocorrem em praticamente todos os tipos de câncer, com frequências de mutação de 38 a 50% em câncer de ovário, colorretal e pulmão, e aproximadamente 5% em leucemia primária, melanoma, entre outros (Petitjean et al. 2007).

Até o momento, mais de 28.000 mutações somáticas e 750 mutações germinativas foram identificadas no gene *TP53* e estão compiladas no banco de dados do IARC ([www-p53.iarc.fr](http://www-p53.iarc.fr), release R17). Cerca de 75% das mutações são substituições de apenas um nucleotídeo que promovem a troca de um aminoácido (mutações *missense*) (Petitjean et al. 2007). A maioria das mutações em *TP53* ocorre entre os éxons 5 a 8, que correspondem ao domínio de ligação ao DNA de p53. Em quase todos resíduos deste domínio já foram identificadas substituições, porém alguns códons (R175, G245, R248, R273 e R282) são mais frequentemente mutados do que outros, formando cinco “*hotspots*” principais (Petitjean et al. 2007). Aproximadamente 30% de todas as mutações conhecidas no gene *TP53* estão localizadas nestes “*hotspots*”, que apresentam sítios CpG, onde citosinas são geralmente metiladas e sua desaminação espontânea induz à

transição de citosina para timina. Substituições nestes resíduos resultam em uma proteína com menor afinidade pelo DNA e, portanto, com menor capacidade de atuar como fator de transcrição e assim suprimir a proliferação celular (Szymanska and Hainaut 2003).

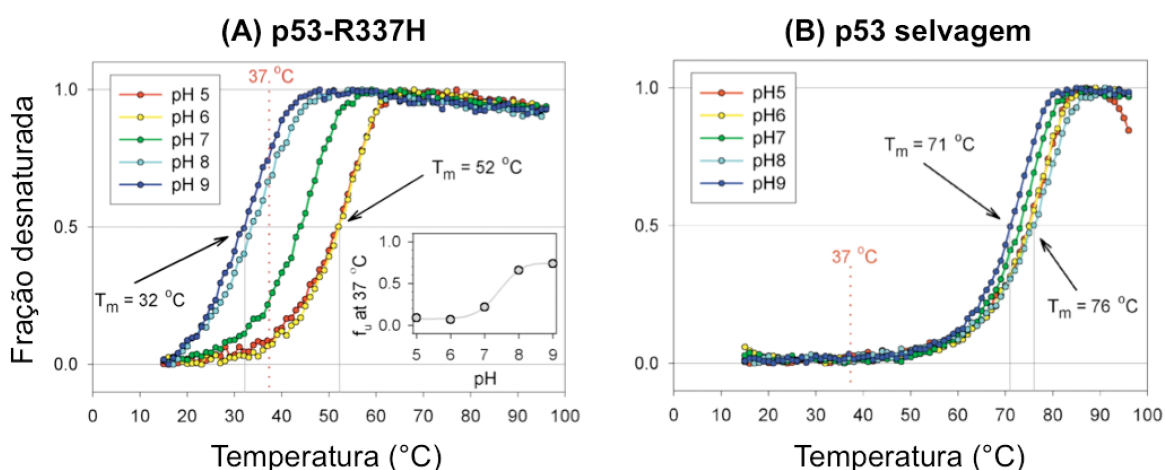
A maioria das mutações em *TP53* encontradas em células tumorais humanas impede a ligação de p53 à sequência de DNA alvo. Acredita-se que quando uma mutação está presente em heterozigose, a proteína mutante pode apresentar uma ação dominante-negativa sobre a proteína p53 normal codificada pelo alelo selvagem, através de um mecanismo que envolve a hetero-oligomerização das proteínas normais e mutantes na formação do tetrâmero funcional. Neste caso, p53 mutante poderia contribuir para a inativação de p53 selvagem. Além disso, p53 mutante pode adquirir novas propriedades oncogênicas, através da interação com proteínas com as quais geralmente não interage. Um dos principais mecanismos de ganho de função é a habilidade que p53 mutante tem de se ligar e inativar p63 e p73, outros membros da família de p53 que em condições normais tem a função de suprimir a tumorigênese (Brosh and Rotter 2009).

### 1.3.1. Mutação *TP53-p.R337H*

A mutação *TP53-p.R337H* é originada por uma substituição nucleotídica G>A (c.1010G>A) no éxon 10 do gene *TP53*, que promove a troca de uma arginina (R) para uma histidina (H) no códon 337. Esta alteração foi identificada primeiramente no estado do Paraná, Brasil, como uma mutação germinativa especialmente associada com carcinoma adrenocortical em várias famílias independentes que não apresentavam outros tipos de tumores, ou seja, que não preenchiam critérios clínicos para a SLF (Ribeiro et al. 2001).

Por ser uma mutação localizada no domínio de oligomerização de p53, acreditou-se inicialmente que a proteína mutante p53-R337H era incapaz de se oligomerizar, e conseqüentemente, de exercer a função normal de supressor tumoral. Porém, dois estudos de transativação demonstraram que p53-R337H apresentava uma atividade muito similar à de p53 selvagem em fibroblastos e células de osteossarcoma (Lomax et al. 1998; Ribeiro et al. 2001), um dado

contrastante com as evidências clínicas que associaram esta mutação a carcinoma adrenocortical pediátrico. Então, em 2002, DiGiammarino e colaboradores, através de análises bioquímicas precisas, revelaram que a proteína p53-R337H é muito similar estruturalmente à p53 selvagem, no entanto apresenta uma estabilidade dependente de pH, levando a mudanças estruturais dependendo do nível de protonação da proteína (Figura 2). O tetrâmero contendo p53-R337H torna-se menos estável com o aumento do pH, dentro da faixa fisiológica, sugerindo portanto que na proteína mutante p53-R337H o defeito molecular é dependente de pH (DiGiammarino et al. 2002).



**Figura 2.** A estabilidade térmica de p53-R337H varia conforme o pH e é reduzida em relação à proteína selvagem. Em pH 8 e 9, aproximadamente 70% de p53-R337H está desnaturada em temperatura fisiológica de 37°C (A), enquanto nesta temperatura a proteína selvagem permanece inalterada. (adaptado de DiGiammarino *et al.*, 2002)

A mutação p.R337H tem sido identificada em alta frequência nas regiões sul e sudeste do Brasil, tanto na população em geral quanto em famílias que preenchem critérios de SLF e SLFL, e é encontrada em pacientes afetados com diferentes tipos de tumores.

Em 2009, Palmero e colaboradores, estudaram a prevalência da mutação p.R337H em um grupo de 750 mulheres não afetadas por câncer, participantes de um programa de rastreamento mamográfico no estado do Rio Grande do Sul (Palmero et al. 2009). A mutação foi encontrada em aproximadamente 0,3% das mulheres assintomáticas, frequência semelhante à observada em recém-nascidos do Paraná, em um estudo conduzido recentemente por Custódio e colaboradores (Custodio et al. 2013), inferindo que esta mutação esteja presente em um a cada 300 indivíduos da população geral nestes dois estados do sul do Brasil.

Em crianças diagnosticadas com carcinoma adrenocortical ou de plexo coróide, p.R337H apresenta uma prevalência de aproximadamente 90% (Ribeiro et al. 2001; Achatz et al. 2007; Seidinger et al. 2011). Entre mulheres afetadas por câncer de mama, não selecionadas pela história familiar, esta mutação foi descrita em uma frequência de até 8,6%, chegando a 20% ao restringir-se a idade ao diagnóstico para 30 anos (Cury et al. 2014; Giacomazzi et al. 2014). A detecção de p.R337H em famílias com uma ampla gama de tumores hereditários, compatíveis com as definições SLF/SLFL, indica que esta mutação é patogênica e predispõe a tumores em diversos tecidos (Achatz et al. 2009).

A alta prevalência desta mutação em pacientes do Brasil a classifica como a mutação germinativa de *TP53* mais comum já descrita em uma determinada população. A haplotipagem do *locus* de *TP53* utilizando 29 Tag SNPs intragênicos, em pacientes do sul e sudeste do Brasil, demonstrou que a mutação p.R337H é fundadora e proveniente de um único alelo *TP53* de origem europeia (Garritano et al. 2010). No entanto, até o momento, p.R337H foi descrita em poucos casos na Europa. Estudos moleculares de pacientes alemães diagnosticados com carcinoma adrenocortical identificaram apenas um portador de p.R337H, e com um haplótipo diferente do que ocorre nos pacientes brasileiros, indicando origem independente da mutação germinativa (Herrmann et al. 2012; Waldmann et al. 2012).

Considerando a alta densidade populacional no sul e sudeste do Brasil, acredita-se que a mutação p.R337H possa estar presente em milhares de indivíduos da população geral. Sua relação patogênica com o câncer de mama no

fenótipo SLFL poderia explicar, ao menos em parte, a elevada incidência de câncer de mama na região.

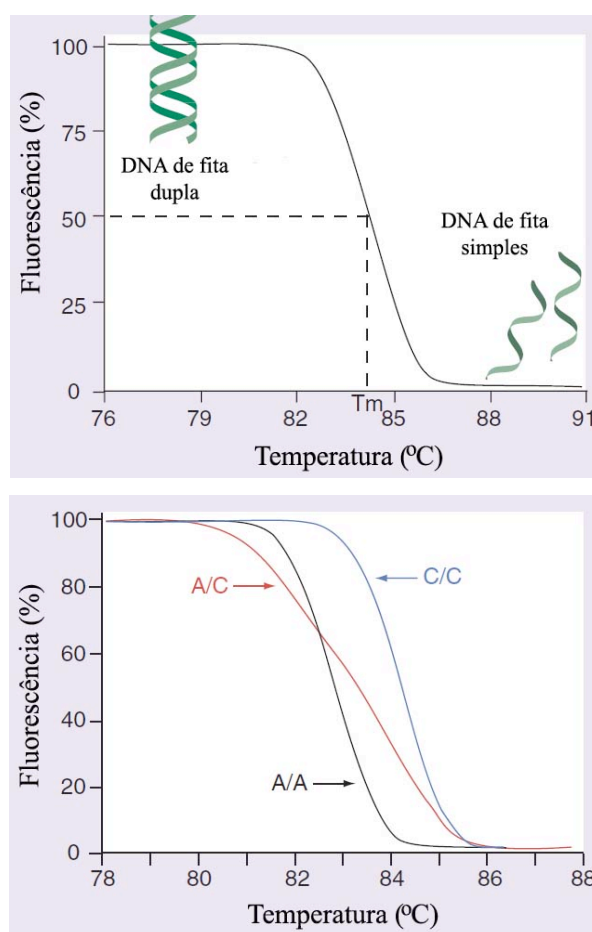
### 1.3.2. Análise molecular do gene *TP53*

O padrão áureo para a identificação de mutações germinativas em *TP53* é o sequenciamento direto de todos os éxons codificantes (2 a 11) e sequências intrônicas flanqueadoras. Porém, a utilização de técnicas triagem para a busca de alterações de sequência possibilita que um menor número de reações de sequenciamento sejam realizadas, reduzindo, assim, o custo global da análise de toda a região codificante do gene. A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis* – HRM), introduzida em 2002, é adequada para essa finalidade e já foi previamente validada para a análise do gene *TP53* em contexto de pesquisa acadêmica (Bastien et al. 2008; Garritano et al. 2009).

A análise por HRM não necessita processamento, adição de reagentes ou separação das amostras após a PCR, visto que um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla fita é adicionado na PCR antes da reação de amplificação. Após a amplificação do DNA, uma curva de dissociação é gerada e, para isso, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada. Conforme a temperatura é elevada, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fitas simples (Reed et al. 2007). A partir da curva de dissociação, a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) da amostra pode ser obtida, a qual é definida como a temperatura em que 50% de cada molécula de DNA está desnaturada. A análise HRM é baseada na diferença entre valores  $T_m$  e na diferença entre a forma das curvas de dissociação das amostras (Figura 3). O perfil de dissociação de um produto de PCR depende de seu conteúdo GC, do comprimento do fragmento, da sequência de nucleotídeos e da heterozigosidade. Portanto, a forma da curva é utilizada como indicador da presença de heterodúplexes formados a partir de DNA heterozigoto (Graham et al. 2005).

A identificação de alterações germinativas em heterozigose no DNA por HRM é realizada através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação de amostras na forma de heterodúplexes, quando comparadas a

amostras controle homozigotas. Apesar de ter sido elaborado para detectar heterozigotos, a análise HRM também é capaz de identificar diferenças entre homozigotos. Por ser um método de varredura, as amostras que apresentam alteração na curva de dissociação devem ser submetidas a sequenciamento de DNA, para identificação da mutação ou polimorfismo presente (Reed et al. 2007).



**Figura 3.** Representação de uma curva de dissociação do DNA, demonstrando o efeito do acréscimo da temperatura sobre a dupla-fita de DNA (painel superior); e curvas de dissociação de amostras com diferentes genótipos, A/A, A/C, C/C (painel inferior). (adaptado de Reed *et al.*, 2007)

HRM é um método de rastreamento adequado para a detecção de alterações na sequência de DNA e apresenta vantagens, como facilidade de execução, rapidez na obtenção dos resultados e menor custo, quando comparado a técnicas tradicionalmente utilizadas (Reed et al. 2007). O método HRM tem sido validado para a busca de variações de sequência em diferentes genes com relevância clínica, e na análise de *TP53* apresenta uma sensibilidade muito próxima a 100% (Garritano et al. 2009). Tendo em vista estas vantagens, HRM foi o método de escolha para a análise do gene *TP53* em dois estudos que compõem esta tese.

#### **1.4. Mutações no gene *TP53* em câncer de mama**

Aproximadamente 35% dos cânceres de mama apresentam alguma mutação somática em *TP53* (Petitjean et al. 2007). Estas mutações são ainda mais frequentes em subtipos de câncer de mama com comportamento mais agressivo, ocorrendo em 70% dos tumores com superexpressão da proteína HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e em 83% dos tumores triplo-negativos (sem expressão de receptores de estrogênio, receptores de progesterona e HER2) (Langerød et al. 2007).

Embora mutações germinativas tenham sido classicamente associadas à Síndrome de Li-Fraumeni em famílias com múltiplos tumores em mais de uma geração (Malkin et al. 1990), a frequência de mutações germinativas em *TP53* em mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes dos 30 anos de idade, não selecionadas pela história familiar, varia de 1 a 7% (Lalloo et al. 2006; Walsh et al. 2006; Gonzalez et al. 2009; Mouchawar et al. 2010). Em um estudo publicado pelo nosso grupo, envolvendo a análise molecular de p.R337H em 815 mulheres diagnosticadas com câncer de mama em diferentes faixas etárias, esta única mutação foi identificada em 8,6 % das mulheres, provenientes do sul do Brasil (Giacomazzi et al. 2014).

O primeiro estudo a identificar um fenótipo específico nos tumores de mama de mulheres portadoras de mutação germinativa em *TP53* foi conduzido



por Wilson *et al.* e publicado em 2010. Neste estudo foi descrito que 83% (10 de 12) dos tumores de mulheres portadoras de mutação germinativa apresentavam superexpressão de HER2 em comparação a 19% (44 de 229) naquelas sem mutação germinativa em *TP53*, sugerindo forte associação entre a presença de mutações germinativas de *TP53* e superexpressão de HER2 em carcinomas de mama (Wilson *et al.* 2010).

Em 2012, Melhem-Bertrandt *et al.* confirmaram os achados de Wilson *et al.* e identificaram superexpressão de HER2 em 67% (20 de 30) dos tumores do grupo com mutação, comparado a 25% (20 de 79) nos controles. Assim, em mulheres jovens (idade média de 38,5 anos) diagnosticadas com câncer de mama neste estudo, desenvolver um tumor positivo para HER2 aumentaria em cerca de 7 vezes a probabilidade de apresentar mutação germinativa em *TP53* (Melhem-Bertrandt *et al.* 2012).

Um terceiro estudo, de Masciari e colaboradores (2012), complementou os achados dos dois trabalhos anteriores, e demonstrou que 63% (20 de 32) dos carcinomas invasivos e 73% (8 de 11) dos carcinomas *in situ* de mulheres com mutações germinativas em *TP53* apresentaram superexpressão de HER2 (Masciari *et al.* 2012). Assim, os resultados desses três trabalhos em conjunto sugerem que tumores de mama em portadores de mutação germinativa em *TP53* são predominantemente, mas não exclusivamente, HER2-positivos.

Mais recentemente, Rath *et al.* analisaram um grupo de 213 mulheres diagnosticadas com câncer de mama HER2-positivo antes dos 50 anos de idade e observaram uma prevalência de mutações germinativas em *TP53* de 1,4%. Das 3 pacientes identificadas com mutação, 2 apresentavam história familiar de câncer, preenchendo critérios clínicos da SLFL, porém uma não apresentava critérios clínicos que levassem à suspeita de alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer (Rath *et al.* 2013). Este estudo analisou pacientes provenientes de um único centro de recrutamento, nos Estados Unidos, e a análise de prevalência de mutações em *TP53* em outras populações se faz necessária para refinar as estimativas de prevalência nos casos de câncer de mama HER2-positivos.

## 1.5. Câncer de mama com superexpressão de HER2

A proteína HER2 é um receptor de membrana com atividade tirosina quinase, que está superexpressa em aproximadamente 15 a 30% dos carcinomas de mama do tipo ductal invasor (CDI), e em mais de 60% dos carcinomas ductais *in situ* (CDIS) (Slamon et al. 1989; Bartkova et al. 1990; Lodato et al. 1990; Collins et al. 2012). Nas regiões sul e sudeste do Brasil, aproximadamente 17% dos cânceres de mama apresentam superexpressão de HER2 (Carvalho et al. 2014). A superexpressão de HER2 também é observada em alguns tipos de tumores gástricos, esofágicos, endometriais, e mais raramente em câncer de pulmão e faringe (Moasser 2007).

A proteína HER2 é normalmente um constituinte da membrana de uma variedade de tipos celulares epiteliais. HER2 foi identificada em células epiteliais dos sistemas gastrointestinal, respiratório, reprodutivo e urinário, bem como na pele, mama e placenta. A quantidade de HER2 é geralmente maior em tecidos fetais do que nos tecidos adultos correspondentes, sugerindo que esta proteína desempenhe um importante papel durante o desenvolvimento de múltiplos órgãos e sistemas (Press et al. 1990). HER2 também é expresso em células cardíacas neonatais e adultas, promovendo a sobrevivência de miócitos, e em células endoteliais, promovendo angiogênese (Negro et al. 2004). O nível de expressão de HER2 em tecidos normais é comparável aos níveis encontrados em células tumorais que não superexpressam HER2 (Press et al. 1990).

A proteína HER2 é codificada pelo oncogene *ERBB2* (também conhecido como *c-erbB-2*), localizado no cromossomo 17q21-q22 (Coussens et al. 1985). Em aproximadamente 90% dos casos de câncer de mama HER2-positivos, a superexpressão da proteína HER2 está associada à amplificação (aumento do número de cópias) do oncogene *ERBB2*. Estes tumores podem apresentar de 25 a 50 cópias do gene *ERBB2*, o que aumenta em 40 a 100 vezes a expressão da proteína HER2, resultando na expressão de aproximadamente 2 milhões de receptores HER2 na superfície celular tumoral (Venter et al. 1987; Kallioniemi et al. 1992; Gutierrez and Schiff 2011). No entanto, em alguns tumores de mama HER2-positivos, o aumento da expressão de HER2 na superfície celular não está

associada à amplificação do gene *ERBB2*. Os mecanismos biológicos responsáveis pela superexpressão de HER2 sem amplificação gênica ainda não estão totalmente esclarecidos, mas podem ser decorrentes de alteração na transcrição gênica, na meia-vida ou no processo de reciclagem da proteína HER2 (Magnifico et al. 2007).

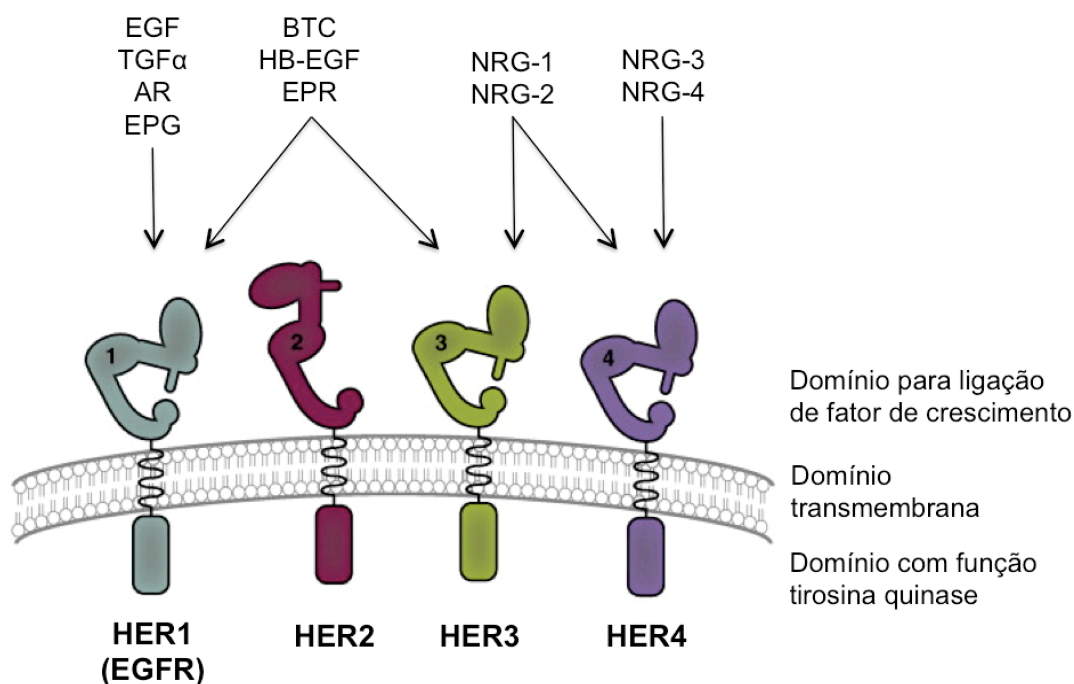
Mutações somáticas no gene *ERBB2*, no domínio quinase de HER2, foram descritas em 2 a 5% dos casos de adenocarcinoma pulmonar, carcinoma gástrico, colorretal e de mama (Lee et al. 2006; Moasser 2007). Até o momento foram identificadas 13 diferentes mutações somáticas em *ERBB2* de tumores de mama sem amplificação gênica, sendo 7 mutações ativadoras da função quinase, com comprovado potencial para governar a carcinogênese. Essas mutações aumentam a atividade quinase da proteína, mas não estão associadas à superexpressão ou amplificação gênica de HER2 (Bose et al. 2013).

HER2, quando está superexpressa, é capaz de ativar vias de sinalização intracelulares e regular a expressão de diferentes genes envolvidos no crescimento e proliferação de células tumorais (Gutierrez and Schiff 2011). Tumores com superexpressão de HER2 são particularmente agressivos, com aumento do potencial proliferativo e metastático (Ross et al. 2003).

#### 1.5.1. Vias de sinalização de HER2

HER2 é membro de uma família de quatro receptores de fatores de crescimento (HER1 ou EGFR, HER2, HER3 e HER4) que atuam em uma rede de vias de sinalização complexa. Os membros da família HER apresentam homologia estrutural, com um domínio extracelular de ligação a ligante (com exceção de HER2), um domínio transmembrana e um domínio intracelular com função tirosina quinase (Hynes and MacDonald 2009). A ligação de ligantes externos induz a uma mudança conformacional nas proteínas HER, promovendo dimerização e consequente transfosforilação de seus domínios intracelulares. No entanto, o domínio extracelular de HER2 existe em uma conformação constitutivamente ativada, e não apresenta sítio para ligação de ligante externo (Figura 4). Em células normais, HER2 preferencialmente forma heterodímeros com HER3, porém em células que superexpressam HER2, homodímeros de

HER2 são formados espontaneamente, permitindo que seus domínios intracelulares sejam transfosforilados sem a necessidade de um sinal extracelular que regule a via. Os resíduos intracelulares fosforilados, devido à atividade tirosina quinase, ativam uma série de cascatas de mensageiros secundários, estimulando vias de sinalização intracelular como PI3K/AKT, por exemplo. Fatores de transcrição são assim ativados e regulam seus alvos, genes envolvidos na proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, angiogênese, invasão e metástase (Yarden and Sliwkowski 2001; Moasser 2007; Gutierrez and Schiff 2011).



**Figura 4.** Receptores da família HER e seus ligantes. EGF: epidermal growth factor; TGF $\alpha$ : transforming growth factor alpha; AR: soluble amphiregulin; EPG: epigen; BTC: betacellulin; HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor; EPR: epiregulin; NRG-(1-4): neuregulin 1-4. (adaptado de Hynes e MacDonald, 2009)

### 1.5.2. Diagnóstico e terapias-alvo

Desde que foi estabelecida a associação da superexpressão de HER2 com a patogênese do câncer de mama, várias terapias-alvo contra HER2 foram desenvolvidas, reduzindo significativamente a mortalidade, e assim a detecção de HER2 se tornou procedimento de rotina (Gutierrez and Schiff 2011).

A análise do nível de expressão de HER2 é realizada rotineiramente em pacientes com diagnóstico de câncer de mama e o método predominantemente utilizado é a imunohistoquímica (IHQ), que detecta a proteína HER2 por meio do uso de anticorpos monoclonais ou policlonais. Através da análise por IHQ, os carcinomas de mama podem ser classificados em uma escala de 0 a 3+, sendo HER2 0 ou 1+ (negativos para expressão de HER2), HER2 2+ (expressão intermediária, ou seja, resultado indeterminado para superexpressão de HER2) e HER2 3+ (positivos para superexpressão de HER2). Segundo recomendações da ASCO/CAP, tumores com expressão HER2 2+ devem ser submetidos à hibridização *in situ* fluorescente (FISH), para definir o número de cópias do gene *ERBB2* nas células. Tumores com resultado 2+ na IHQ e positivo na análise por FISH são classificados como positivos para superexpressão de HER2 (Wolff et al. 2007; Wolff et al. 2013).

O nível de expressão de HER2 tem se tornado um importante biomarcador para indicação do uso de terapia anti-HER2. Algumas drogas estão aprovadas pela FDA para tratamento de câncer de mama HER2-positivo (IHQ 3+ ou IHQ 2+/FISH+), entre elas o trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Genentech), um anticorpo monoclonal humanizado que reconhece o domínio externo de HER2 e inibe as vias de sinalização desencadeadas por HER2; o lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>, SmithKline Beecham), um inibidor que bloqueia a atividade tirosina quinase de HER2; o pertuzumab (Perjeta<sup>®</sup>, Genentech), um anticorpo monoclonal inibidor da dimerização dos receptores HER; e o ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla<sup>®</sup>, Genentech), um conjugado do trastuzumab com o quimioterápico DM1 (Drugs@FDA, www.fda.gov). Embora estas terapias-alvo moleculares estejam revolucionando o tratamento do câncer de mama HER2-positivo, elas apresentam algumas falhas, incluindo associação com certos eventos adversos (toxicidade cardíaca é o predominante, principalmente durante o tratamento de câncer de

mama metastático com trastuzumab) e desenvolvimento de resistência (Dent et al. 2013). Sendo assim, um melhor entendimento da biologia desses tumores e dos mecanismos que levam à superexpressão de HER2 é crucial para aprimorar a estratégia de tratamento com alvo molecular específico.

## 1.6. Justificativa

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e é considerado um problema significativo de saúde pública no Brasil, especialmente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, que apresentam uma previsão de, respectivamente, 71,18, 70,98 e 51,30 novos casos a cada 100.000 mulheres em 2014 (Ministério da Saúde, 2014).

Estudos recentes de nosso grupo e colaboradores identificaram uma frequência significativa do fenótipo SLF ou SLFL no sul e sudeste do Brasil. Em paralelo, a mutação fundadora *TP53*-p.R337H parece estar presente em 1:300 indivíduos da população geral (Palmero et al. 2009; Custodio et al. 2013) e em cerca de 8% das mulheres com câncer de mama nessa região do país (Cury et al. 2014; Giacomazzi et al. 2014). A melhor compreensão do processo de carcinogênese e do perfil anatomopatológico e molecular do câncer de mama nas mulheres com mutações germinativas de *TP53* poderá auxiliar na identificação de estratégias diferenciadas de manejo nesse importante grupo de pacientes, com intervenções terapêuticas dirigidas.

Além disso, definição da prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* em mulheres diagnosticadas com câncer de mama com superexpressão de HER2 será uma informação fundamental para o aprimoramento de condutas de rastreamento e para instrumentar o processo de aconselhamento genético nas famílias nas quais segrega uma mutação. Considerando que a predisposição hereditária ao câncer de mama é uma doença de início na vida adulta, o diagnóstico pré-sintomático de um indivíduo afetado, através da identificação de mutação genética, por exemplo, tem um grande potencial para redução do risco de câncer, eliminando gastos e intervenções preventivas desnecessárias. Neste

contexto, a utilização de técnicas para a identificação de mutações que sejam de fácil execução, passíveis de automação e com baixo custo comparado a outras metodologias disponíveis, é essencial para fornecer um diagnóstico molecular rápido e ampliar o acesso dos pacientes à análise.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação de mutações germinativas em *TP53* com o fenótipo de câncer de mama com superexpressão de HER2 em mulheres brasileiras.

### 2.2. Objetivos específicos

- Comparar o nível de expressão de HER2 em carcinomas de mama de mulheres portadoras de diferentes mutações germinativas em *TP53*, que potencialmente apresentam diferentes efeitos na função de p53 por afetarem porções distintas da proteína, como o domínio de ligação ao DNA e o de oligomerização;
- Comparar a performance e o custo de diferentes metodologias na análise de mutações do gene *TP53*, utilizando como modelo a genotipagem da mutação p.R337H;
- Determinar a prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* em mulheres que desenvolveram câncer de mama com superexpressão de HER2 antes dos 60 anos de idade, não selecionadas pela história familiar de câncer;
- Avaliar características clínicas das pacientes que desenvolveram câncer de mama com superexpressão de HER2, portadoras e não-portadoras de mutação germinativa em *TP53*, bem como história familiar de câncer.