



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE TP53 EM PORTADORES DE CÂNCER DE
MAMA NA POPULAÇÃO DE MISSAL-PR**

PATRÍCIA OLIVEIRA DE PAULA

Foz do Iguaçu
2021

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE TP53 EM PORTADORES DE CÂNCER DE
MAMA NA POPULAÇÃO DE MISSAL-PR**

PATRÍCIA OLIVEIRA DE PAULA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Claudia Gross
Coorientadora: Prof. Dr^a. Maria Leandra Terencio

Foz do Iguaçu

2021

PATRÍCIA OLIVEIRA DE PAULA

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE TP53 EM PORTADORES DE CÂNCER DE
MAMA NA POPULAÇÃO DE MISSAL-PR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Gross
UNILA

Prof. Dr. Carlos Henrique Schneider
UNILA

MSc. Christopher William Lee
UNILA

Foz do Iguaçu, 10 de junho de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Patrícia Oliveira De Paula

Curso: Bacharelado em Biotecnologia

Tipo de Documento	
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE TP53 EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA NA POPULAÇÃO DE MISSAL-PR

Nome do orientador(a): Maria Claudia Gross

Data da Defesa: 10/06/2021

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 10 de junho de 2021.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sempre me direcionar ao caminho certo.

À minha família, principalmente aos meus pais, que me incentivaram nos momentos mais difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava aos meus estudos.

Aos meus professores orientadores, Dr^a Maria Claudia Gross, Dr^a Maria Leandra Terencio e Dr. Carlos Henrique Schneider não só pela orientação, mas também pela paciência, disponibilidade, experiências trocadas, lições de vida, risadas, apoio e incentivo, sobretudo por acreditarem em mim e me mostrarem que eu conseguiria.

Aos meus amigos Cassiano Colling e Luana Byhain por sempre estarem comigo e me motivarem a nunca desistir. E à Nathalia Delgado, pela ajuda imensurável, as horas perdidas de sono e pelo carinho em todos esses anos.

Aos colegas de curso da turma de Biotec 2015, obrigada por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do curso. Em especial a Anabel Rodrigues, Ema Barcelos, Eliziane Batista, Linda Ojeda, Mariana Lima e Nathalia Cecchet, por todos esses anos de amizade, todas as conversas, risadas, conselhos e apoio.

A Dr^a Sanely Lourenço pelos conselhos e amizade.

Ao Msc Christopher Lee por todo apoio e ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho, e por gentilmente aceitar compor a banca de avaliação deste trabalho.

À Prefeitura Municipal de Missal e as mulheres que participaram deste estudo, sem os quais esta pesquisa não seria possível.

Por fim, a todos que contribuíram, de alguma forma, para a minha formação, o meu muito obrigada.

*É hora de recomeçar tudo outra vez, sem ilusão e sem
pressa, mas com a teimosia do inseto que busca um
caminho no terremoto.*

Carlos Drummond de Andrade

PAULA, Patricia Oliveira de. **Análise de alterações no gene TP53 em portadores de câncer de mama na população de Missal-PR.** 2021. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

O município de Missal, localizado no oeste do Paraná, apresenta uma possível incidência elevada de adoecimento oncológico, que culmina no fato do câncer ser a segunda causa de morte na região. Dentre os genes relacionados ao surgimento de cânceres destaca-se o gene TP53, que é um gene supressor tumoral, responsável por codificar a proteína p53, considerada guardião do genoma por seu envolvimento na regulação do ciclo celular. Mutações nesse gene têm sido associadas com o aumento do risco do desenvolvimento de câncer, sendo que mutações somáticas são encontradas em até 50% dos cânceres humanos e mutações germinativas em até 10% dos carcinomas mamários. Para o câncer de mama, que é principal causa de morte por neoplasias em mulheres no mundo, a incidência de mutações no TP53 é baixa, mas tem grande significado clínico. Porém, considerando o contexto da cidade de Missal, onde uma possível incidência elevada de cânceres foi identificada, a sua análise é de extrema importância. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar a prevalência de mutações nos éxons 5, 6, 7 e 11 do gene TP53 em pacientes (n=23) com câncer de mama no município de Missal - Paraná, por meio da técnica de sequenciamento de Sanger e classificar as variantes encontradas em sete bancos de dados genéticos, além de verificar se estas possuem contexto familiar e se estão relacionadas a mutações germinativas. Apenas três probandas apresentaram mutações nos éxons analisados, sendo que duas pacientes apresentaram a mesma mutação e uma paciente apresentou 2 mutações diferentes. As três mutações (13%) evidenciadas foram: c.599del, uma mutação patogênica localizada no éxon 6; c.745A>G e c.746G>A no éxon 7, ambas consideradas de significado incerto. A frequência de variantes encontradas corrobora com outros estudos na população brasileira, indicando que o câncer de mama da população de Missal não possui íntima relação com o gene TP53. Ainda, as mutações evidenciadas não apresentam contexto familiar, uma vez que apenas uma paciente portadora de mutação possui familiar com câncer. Análises subsequentes são sugeridas para confirmar os resultados encontrados e para investigar variações fora dos éxons analisados.

Palavras-chave: Mutação. Carcinoma Mamário. Supressor de Tumor. Sequenciamento de Sanger.

PAULA, Patricia Oliveira de. **Análise de alterações no gene TP53 em portadores de câncer de mama na população de Missal-PR.** 2021. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

ABSTRACT

Missal City, located in western Paraná, Brazil, has a possible high incidence of oncological illness, and the cancer is the second leading cause of death in the region. Among the genes related to the emergence of cancer, the TP53 gene stands out, a tumor suppressor gene, responsible for encoding the p53 protein, considered the guardian of the genome due to its involvement in the regulation of the cell cycle. Mutations in this gene have been linked to an increased risk of developing cancer, with somatic mutations found in up to 50% of human cancers and germline mutations in up to 10% of breast carcinomas. For breast cancer, which is the main cause of death from cancer in women worldwide, the incidence of TP53 mutations is low, but has great clinical significance. However, its analysis is extremely important considering the context of Missal city, where a possible high incidence of cancer was identified. Therefore, the aim of the present study was to identify the prevalence of mutations in exons 5, 6, 7, and 11 of the TP53 gene in patients (n=23) with breast cancer in Missal city, Paraná, using the Sanger sequencing technique, classification of the variant in seven genetic databases and verifying if these have a familial context and are related to germline mutations. Only three probands had mutations in the analyzed exons, and two patients had the same mutation and one patient had 2 different mutations. The three mutations (13%) evidenced were: c.599del, that pathogenic mutation located in exon 6; c.745A>G and c.746G>A in exon 7, both considered to be of uncertain significance, with two patients having the same mutation and one patient having 2 different mutations. The frequency of variants found corroborates other studies in the Brazilian population, indicating that breast cancer in the population of Missal is not closely related to the TP53 gene; the mutations evidenced in this research do not have a family context, as only one patient carrying the mutation has family history of cancer. Subsequent analyzes are suggested to confirm the results found and to investigate variations outside the analyzed exons.

Key words: Mutation. Breast carcinoma. Tumor Suppressor. Sanger sequencing.

PAULA, Patricia Oliveira de. **Análise de alterações no gene TP53 em portadores de câncer de mama na população de Missal-PR.** 2021. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMEN

El municipio de Missal, ubicado en el occidente de Paraná, tiene una posible alta incidencia de cáncer, en el que el cáncer es la segunda causa de muerte en la región, después de las enfermedades respiratorias. De entre los genes relacionados al surgimiento de cánceres se destaca el gen TP53, que es un gen supresor de tumores, responsable de codificar la proteína p53, considerada la guardiana del genoma por su implicación en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones en este gen se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer, encontrándose mutaciones somáticas en hasta el 50% de los cánceres humanos y mutaciones de la línea germinal en hasta el 10% de los carcinomas mamarios. Para el cáncer de mama, que es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo, la incidencia de mutaciones TP53 es baja, pero tiene una gran importancia clínica. Sin embargo, su análisis es sumamente importante considerando el contexto de la ciudad de Misal, donde se identificó una posible alta incidencia de cánceres. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la prevalencia de mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 11 del gen TP53 en pacientes (n = 23) con cáncer de mama en la ciudad de Missal, Paraná, mediante la secuenciación técnica de Sanger, la clasificación de la variante en siete bases de datos genéticas y comprobar si estas tienen un contexto familiar y están relacionadas con mutaciones de la línea germinal. Se evidenciaron tres mutaciones (13%): c.599del, mutación patogénica localizada en el exón 6, c. 745A>G y c.746G>A en el exón 7, ambos considerados de significado incierto, dos pacientes tenían la misma mutación y un paciente tenía 2 mutaciones diferentes. El cáncer de mama en la población de Missal no está estrechamente relacionado con el gen TP53; el Las mutaciones evidenciadas en esta investigación no tienen un contexto familiar, ya que solo un paciente con la mutación tiene un familiar con cáncer. Se sugieren análisis posteriores para confirmar los resultados encontrados e investigar variaciones fuera de los exones analizados.

Palabras clave: Mutación. Carcinoma de mama. Supresor de tumor. Secuenciación de Sanger.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por neoplasia maligna de mama feminina, por 100.000 mulheres, pelas unidades da federação do Brasil, no ano de 2019.	17
Figura 2 – Representação esquemática correlacionando os éxons do gene TP53 (A) aos domínios funcionais da proteína p53 (B).	22
Figura 3 – Esquema simplificado da via da p53	23
Figura 4 – Histogramas exibindo a distribuição das mutações <i>hotspots</i> em TP53 por códon (%).....	25
Figura 5 – Fluxograma do procedimento de extração e purificação do DNA genômico utilizando kit de extração de coluna	29
Figura 6 – Parâmetros de amplificação utilizados na PCR para éxons 5, 6, 7, e 11 do gene TP53.....	32
Figura 7 – Eletroferograma mostrando variante encontrada na amostra 127 do primer 239.	39
Figura 8 – Eletroferograma mostrando a variante encontrada na amostra 130 do primer 239.	39
Figura 9 – Eletroferograma mostrando as variantes encontradas na amostra 108 do primer 237	40
Figura 10 – Esquema das regiões dos iniciadores e dos amplicons utilizados para análise do gene TP53.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni.....	20
Quadro 2 – Quadro de Caracterização das variantes obtidas por sequenciamentos dos éxons 5, 6, 7, e 11 do gene TP53 de portadoras de câncer de mama de Missal, PR.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação das regiões de interesse do gene TP53 e nas reações de sequenciamento	31
Tabela 2 – Características de história pessoal, história familiar, tipo de câncer e presença de mutação nos éxons 5, 6, 7, e 11 do gene TP53 das moradoras do município de Missal portadoras de neoplasia maligna de mama	36
Tabela 3 – Caracterização da localização, tipo de alteração e efeito das variações genéticas encontradas nos éxons analisados do gene TP53.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABRAOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATM	do inglês <i>ataxia-telangiectasia mutated gene</i>
BRCA 1	do inglês <i>Breast cancer 1 gene</i>
BRCA 2	do inglês <i>Breast cancer 2 gene</i>
C	Citosina
°C	graus <i>Celsius</i>
CDH1	do inglês <i>Cadherin-1</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHEK2	do inglês <i>Checkpoint Kinase 2</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ddNTPs	Dideoxiribunucleotídeos trifosfatados
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G	Guanina
Gly	Glicina
GNOMAD	do inglês <i>Genome Aggregation Database</i>
His	Histidina
HGMD	do inglês <i>The Human Gene Mutation Database</i>
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
LFL	Síndrome Li-Fraumeni <i>Like</i>
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
LOVD	do inglês <i>Leiden Open Variation Database</i>
LPCM	Laboratório de Pesquisa em Ciências Médicas
Lys	Lisina
MDM2	do inglês <i>Mouse double minute 2 homolog</i>
mg	Miligramas

MgCL2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
MLH1	do inglês <i>MutL homolog 1</i>
MLH2	do inglês <i>MutL homolog 2</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF1	do inglês <i>Neurofibromin 1</i>
OMIM	do inglês <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PALB2	do inglês <i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Paraná
PTEN	do inglês <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
p53	do inglês <i>phosphoprotein 53</i>
RAD51C	do inglês <i>RAD51 homolog C</i>
RAD51D	do inglês <i>RAD51 PARALOG D</i>
RPM	Rotações por minuto
SNPs	do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
STK11	do inglês <i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
SV-40	vírus <i>símio 40</i>
T	Timina
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TP53	do inglês <i>tumor supressor gene TP53</i>
uL	Microlitro
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana
V	<i>Volts</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 MISSAL	14
2.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	14
2.3 CÂNCER DE MAMA	16
2.3.1 <i>Diagnóstico</i>	18
2.3.2 <i>Fatores de Risco</i>	21
2.4 GENE TP53 E A PROTEÍNA P53.....	21
2.4.1 <i>Mutações TP53 Associadas ao Câncer de Mama</i>	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVO ESPECIFICO	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	28
4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	28
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO.....	28
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	30
4.5 SEQUENCIAMENTO	32
4.5.1 <i>Purificação</i>	32
4.5.2 <i>Reação de sequenciamento</i>	33
4.5.3 <i>Precipitação</i>	33
4.5.4 <i>Análise e interpretação dos dados</i>	34
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8. REFERÊNCIAS	46
9. APÊNDICES.....	51
10. ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer tem demonstrado ser um problema de saúde pública, sendo a segunda causa mais frequente de mortes, depois de doenças cardiovasculares. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 2000 o número de mortes causadas por neoplasias aumentou em 31% e estima-se que este número dobre em 20 ou 40 anos. O aumento na incidência relaciona-se com as significativas alterações de perfis epidemiológicos e demográficos, o aumento na expectativa de vida da população (TEIXEIRA; PORTO; NORONHA, 2012) e a maior exposição dos indivíduos a agentes carcinogênicos (INCA, 2020).

A Prefeitura Municipal de Missal, cidade localizada no oeste do estado do Paraná, identificou uma possível incidência elevada de casos de câncer no município por meio da análise de informações de saúde disponíveis no DATASUS. Em 2016, 189 (1,80%) residentes do município possuíam algum tipo de neoplasia e destes 35 (18,5%) são portadores de câncer de mama.

O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentes no mundo e a mais comum entre as mulheres e no Brasil é a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres (INCA, 2018). Um dos fatores cruciais no manejo do câncer de mama é a genética. Entre as mutações gênicas associadas ao câncer de mama, o gene principal se refere a BRCA1 e 2, mas pelo menos outros sete genes estão associados ao risco de câncer de mama ATM, CDH1, CHEK2, NF1, PALB2, PTEN e TP53 (CAI *et al.*, 2021). Os testes genéticos são indicados como um componente da avaliação de risco usado para prevenir o câncer de mama, pois o conhecimento dos mecanismos de ação, dos aspectos moleculares, das alterações genéticas e sua associação com fatores ambientais e dos genes envolvidos no processo de carcinogênese é fundamental para uma melhor compreensão da doença (LYNCH *et al.*, 2015).

Dentre estes genes, a incidência de mutações no TP53 é baixa, mas tem grande significado clínico. Mutações neste gene estão associadas ao câncer de mama e 95% dessas alterações causam câncer de mama, sendo que muitas dessas mutações ocorrem em uma idade precoce. Ainda, estudos revelaram que a exposição à radiação pode levar à maior incidência de tumores secundários em portadores de mutação em TP53 (KONY *et al.*, 1997; SALMON *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2021).

Considerando a incidência de cânceres em Missal - PR e que mutações no gene TP53 são as alterações genéticas mais frequentes em cânceres humanos, a avaliação

de p53 é imprescindível por trazer novos aportes informacionais que podem contribuir para identificação de pacientes com alto risco, identificação precoce do câncer em pessoas que sofrem ou sofreram exposição a agentes cancerígenos, detecção de lesões benignas antes da progressão para o câncer, garantir um melhor prognóstico, auxiliar no fechamento do diagnóstico, na escolha da forma de tratamento mais adequada a afecção e até mesmo para avaliar risco de recidiva da doença (MOURA-GALLO *et al.*, 2004; GALIOTTO, 2011; UNGERLEIDER *et al.*, 2018; JINDAL *et al.*, 2020). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar a presença de mutações no gene TP53 relacionadas ao câncer de mama na população de Missal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MISSAL

O município de Missal está localizado ao sul do Brasil, no extremo oeste do estado do Paraná. Em meados da década de 60, os descendentes da segunda geração de imigrantes alemães, estabelecidos previamente no Rio Grande do Sul, começaram a colonizar a região. Naquela época, apenas famílias pertencentes ao catolicismo podiam se instalar na área. Somente com a dissolução do município de Medianeira, na década de 1980, Missal foi oficialmente reconhecido como município (PREFEITURA DE MISSAL, 2016).

Uma das fontes geradoras de recursos na época da colonização, foi a extração de madeira. Atualmente, com uma área de 323,783 km² e 10.474 habitantes, é considerado um município agrícola, caracterizado pela agricultura familiar e pecuária (IBGE, 2017; IPARDES, 2021).

De acordo com dados da Rede de Assistência à Saúde, disponibilizados pelo TABNET (DATASUS), em termos de pacientes ambulatoriais e internações, as neoplasias ocupam o segundo lugar, ficando atrás apenas das doenças respiratórias. Os dados de mortalidade apontam que os tumores são a segunda causa de morte (21%), as doenças do aparelho circulatório ocupam o primeiro lugar. Em relação à presença de tumores e óbitos da população local, a faixa etária mais comum é de 50 a 64 anos, seguida de 20 a 49 anos.

2.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Define-se como tumor ou neoplasia, uma célula anormal que aumenta sua massa e prolifera-se descontroladamente. Quando essa célula neoplásica não é invasiva, considera-se um tumor benigno e neste estágio é possível a remissão completa da massa tecidual localizada. Um tumor benigno evolui para a qualidade de tumor maligno, e é denominado como câncer, quando estas células adquirem a capacidade de invasividade, que a possibilita se desprender de seu tecido original, penetrar na corrente sanguínea ou em vasos linfáticos e formar tumores secundários (metástases) que vão colonizar outros tecidos adjacentes. Neste estágio é mais difícil a erradicação do tumor (ALBERTS *et al.*, 2017).

O termo câncer origina-se do grego *karkínos*, cujo significado tem origem da palavra caranguejo (INCA, 2020). Este nome é atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam em comum a capacidade de crescimento desordenado e autônomo, porém possuem características clínicas e patológicas distintas. Os diferentes tipos de câncer são classificados de acordo com os tipos de células do corpo ou tecido em que se originam (ALBERTS *et al.*, 2017; INCA 2020). O processo de formação do câncer é denominado de carcinogênese ou oncogênese, é considerado uma doença de etiologia complexa, dito que é multifatorial, que envolve centenas de genes e uma série de etapas. Este processo é dividido em três estágios: iniciação – no qual os genes sofrem ação dos agentes carcinogênicos; promoção – atuação de agentes onco-promotores nas células alteradas; e progressão – multiplicação descontrolada e irreversível da célula, processo este, ocasionado pelas mutações em genes específicos envolvidos no controle da multiplicação, diferenciação e sobrevivência celular (JEGGO; PEARL; CARR, 2016; INCA, 2020;).

Os principais genes envolvidos na carcinogênese são os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os relacionados ao reparo do DNA (DANTAS *et al.*, 2009). Os proto-oncogenes estimulam a divisão celular, enquanto, os supressores inibem. As mutações envolvendo proto-oncogenes atuam de forma dominante, ou seja, a mutação de um único alelo pode conferir à célula ganho de função, transformando um proto-oncogene em um oncogene com vantagem em termos de crescimento e/ou transformação. Já os genes supressores tumorais apresentam perda de função quando estão mutados de forma recessiva, isto é, em ambos os alelos (WARD, 2002). A inativação desses genes impede que a célula regule os pontos de checagem do ciclo celular, o que se torna vantajoso para o crescimento e a sobrevivência das células tumorais, resultando na proliferação celular (OLIVEIRA; ROSS; FLETCHER, 2005). Mutações em genes de reparo impedem a correção de erros que ocorrem durante a duplicação celular, permitindo que erros perpetuem para as células filhas; além de que, a falta de reparo em oncogenes e supressores de tumor possibilita o acúmulo de mutações, acelerando a progressão tumoral (WARD, 2002).

A maioria dos casos de câncer são esporádicos, pois alterações ocorrem espontaneamente com envelhecimento e a exposição a fatores ambientais. Porém, as mutações podem ser herdadas, com neoplasias prevalentes em indivíduos de uma mesma família, caracterizando o câncer hereditário (RAMAMURTHY; CHERTOCK; HALL, 2017). Berliner e Fay (2007), definem câncer hereditário com os seguintes critérios: 1) transmissão com padrão mendeliano bem definido, geralmente do tipo autossômica dominante; 2) idade

mais precoce do início do câncer do que esperado; 3) vários cânceres primários em um indivíduo; 4) agrupamento de cânceres raros; 5) cânceres bilaterais ou multifocais; 6) parentes de primeiro grau possuem risco de 50% de portar a mesma mutação; 7) penetrância do gene é incompleta e a expressividade é variável e 8) aqueles que não têm a mutação familiar apresentam o mesmo o risco de câncer do que população geral.

2.3 CÂNCER DE MAMA

De acordo com pesquisas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, no triênio de 2020-2022 devem ser diagnosticados 625 mil novos casos de câncer a cada ano e uma das neoplasias mais prevalentes será o câncer de mama feminino, atingindo aproximadamente 66.000 mulheres (INCA, 2019). O Brasil apresenta 50% de todos os casos de câncer de mama da América Latina (TEIXEIRA; PORTO; NORONHA, 2012), e as região sul e sudeste são onde ocorrem a maior taxa de incidência. Assim como a incidência, a mortalidade por neoplasia de mama tende a crescer progressivamente a partir dos 40 anos (INCA, 2019a).

Apesar de apresentar bom prognóstico quando diagnosticado precocemente, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o Brasil, provavelmente devido ao diagnóstico em estágio avançado (LEVY, 2010; TEIXEIRA; PORTO; NORONHA, 2012). No ano de 2019, os óbitos por câncer de mama ocuparam o primeiro lugar no país, representando 16,1% do total de óbitos de mulheres. Esse padrão foi observado em quase todas as regiões brasileiras e novamente os maiores percentuais são observados nas regiões do Sudeste e Sul (Figura 1) (INCA, 2021).

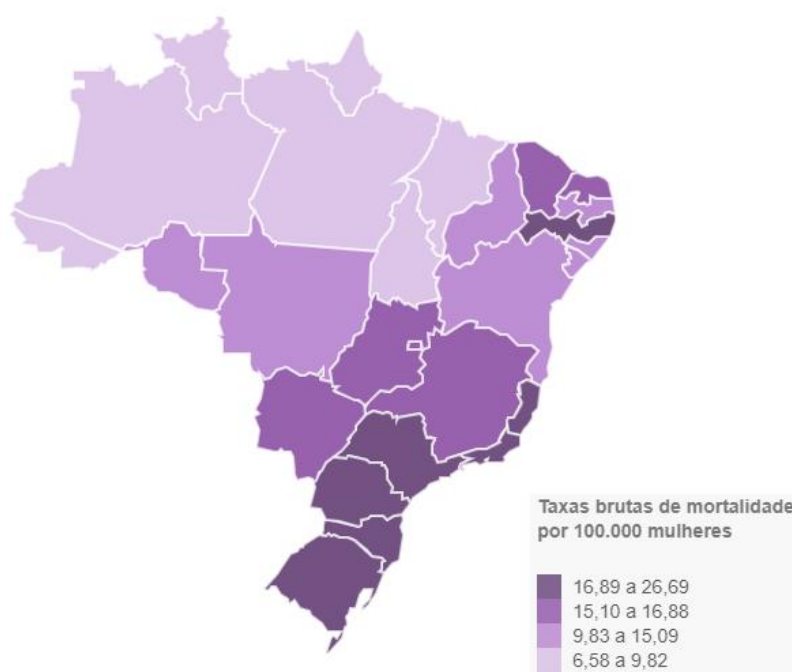


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por neoplasia maligna de mama feminina, por 100.000 mulheres, pelas unidades da federação do Brasil, no ano de 2019 (FONTE: INCA, 2021).

O câncer de mama exibe um amplo espectro de características morfológicas, diferentes perfis imuno-histoquímicos e subtipos histopatológicos, com curso clínico e desfechos específicos, podendo ocorrer em qualquer tipo celular da glândula mamária (MAKKI, 2015). É causado pela multiplicação desordenada de células da mama. Na maioria das vezes origina-se de alterações epiteliais, denominado carcinoma, inicia-se com a hiperproliferação de células epiteliais que revestem o ducto terminal do lóbulo mamário, seguida por duas fases: a *in situ*, em que as células permanecem dentro das camadas dos ductos; e a invasiva em que as células adquirem a capacidade de migrar para tecidos adjacentes e gerar metástases (FENTIMAN; D'ARRIGO, 2004; MAKKI, 2015; POLYAK, 2007). A doença pode evoluir de diferentes formas, devido ao fato de existirem vários tipos de câncer de mama que progridem de acordo com características próprias do tumor. Apesar de raro, o câncer de mama também acomete homens, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2020).

Os principais sintomas do câncer de mama são referidos como: aparecimento de nódulo mamário (quando antes da menopausa, são em sua maioria benignos), alterações persistentes na pele da mama (vermelhidão, retração cutânea, edema cutâneo semelhante a casca de laranja, eczema), retração do mamilo, secreção

papilar anormal, caroços palpável na axila e inchaço do braço (MARTÍN; HERRERO, 2015).

Algumas predisposições genéticas podem conferir um alto risco para câncer de mama hereditário, dentre estas estão: câncer de mama e ovário hereditário – genes BRCA1 e BRCA2, síndrome de Li-Fraumeni – gene TP53, síndrome de Peutz-Jeghers – gene STK11, síndrome de Cowden – gene PTEN e na síndrome Muir-Torre – gene MLH1 e MLH2 (DANTAS *et al.*, 2009).

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) (OMIM #191170) é uma síndrome familiar rara de predisposição ao câncer, causada pela herança de mutações na linhagem germinativa no gene TP53. É caracterizada pelo aparecimento de tumores de início precoce, diversos tumores em um indivíduo e vários membros da família afetados. Transmitida de forma autossômica dominante, a LFS é associada com o alto risco de desenvolvimento de câncer de mama, sarcomas de tecidos moles, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais (OLIVIER *et al.*, 2003; GUHA; MALKIN, 2017). Devido à alta penetrância o risco de desenvolver câncer ao longo da vida em indivíduos com LFS é alto, $\geq 70\%$ para homens e $\geq 90\%$ para mulheres (MAI *et al.*, 2016; GUHA; MALKIN, 2017). Indivíduos portadores da Síndrome Li-Fraumeni *Like* (LFL) apresentam características parciais da LFS (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010).

Em um estudo recente, Rana e colaboradores (2019) relataram que indivíduos portadores de LFS com variantes patogênicas de TP53 da linha germinativa causadoras de perda de função da proteína p53 apresentavam um fenótipo mais grave, com início mais precoce do primeiro câncer, quando comparados com indivíduos portadores de variantes patogênicas causadoras de perda de função parcial de p53. Ainda, apresentavam maior incidência de câncer de mama e de sarcoma, e maior probabilidade de atender aos critérios clássicos de LFS clássica e / ou Chompret.

2.3.1 Diagnóstico

As estratégias adotadas pelo Ministério da Saúde para prevenção e intervenção do câncer de mama são direcionadas a detecção precoce, baseado no diagnóstico precoce e no rastreamento, com o intuito de identificação em etapas iniciais de processos neoplásicos, alcançando assim um melhor prognóstico. O diagnóstico precoce tem como foco a abordagem de pessoas com sinais e/ou sintomas iniciais da doença, para isso a orientação é que as mulheres realizem a auto palpação/observação das mamas

frequentemente. Enquanto o rastreamento busca identificar lesões sugestivas de câncer em uma população assintomática, para tanto, preconiza-se a realização de exame mamográfico, em mulheres entre 50 a 69 anos de idade a cada dois anos e exame clínico das mamas e mamografia anual, a partir dos 35 anos de idade, em mulheres pertencentes a grupos populacionais considerados de risco elevado para o desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres com resultados alterados são encaminhadas para investigação diagnóstica e tratamento (INCA, 2015, 2019b).

O risco elevado para desenvolvimento de câncer de mama inclui: história familiar de câncer de mama em parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) antes dos 50 anos ou de câncer de mama bilateral ou câncer de ovário em qualquer faixa etária; história familiar de câncer de mama masculino; e diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ* (VIEIRA, 2017).

O diagnóstico envolve exame clínico, exame de imagem e análise histopatológica. A confirmação do diagnóstico é através de biópsia. As biópsias percutâneas realizadas por agulha grossa podem ser executadas tanto em lesões palpáveis quanto impalpáveis. São métodos minimamente invasivos, de boa acurácia, que permitem a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do tumor. Porém, quando não é possível realizar esta técnica é indicada a biópsia cirúrgica. Também é realizada avaliação citológica do linfonodo axilar, por meio da técnica de punção aspirativa por agulha fina (INCA, 2019b).

O diagnóstico e rastreamento de LFS é geralmente baseado na avaliação clínica e conformidade com critérios (Quadro 1) independentes do estado genômico, uma vez que as mutações germinativas em TP53 são confirmadas em apenas 70% das famílias com suspeitas de LFS, enquanto que na LFL, apenas de 20-40% dos indivíduos são portadores de alterações em TP53 (RUIJS et al., 2010).

As recomendações práticas relacionadas à avaliação genética/familiar de alto risco: mama, ovário e pancreático estão descritas nas diretrizes da NCCN (Anexo 1). Indivíduos que atendem aos critérios de teste da síndrome de Li-Fraumeni (LFS) se enquadram nos critérios para teste genético (NCCN, 2021a). Para mulheres que não se enquadram nos critérios de risco para câncer de mama hereditário é recomendada a avaliação de outros fatores que contribuem para o aumento do risco de câncer de mama (NCCN, 2021b).

Quadro 1: Critérios de diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni (Fonte: ACHATZ, 2008).

Clássico Li-Fraumeni	• Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) E • Familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) E • Familiar de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
Variante Birch	• Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou ADR antes dos 45 anos E • Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni *(sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR ou leucemia) em qualquer idade E • Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.
Eeles	• LFL-E1 presença de dois familiares de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático). • LFL-E2: sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo) câncer de mama <50 anos e/ou tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático aos <60 anos ou sarcoma em qualquer idade.
Chompret	• Sarcoma, SNC, câncer de mama ou ADR antes dos 36 anos E a) Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos OU b) Familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade OU • Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, SNC, câncer de mama ou ADR, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar OU • ADR em qualquer idade e independente da história familiar.
Chompret modificado	• Paciente-índice com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma de partes moles, osteosarcoma, câncer de mama pré-menopausal, SNC, ADR, leucemia e carcinoma brônquio-alveolar de pulmão) antes dos 46 anos E • Familiar de primeiro ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores OU • Paciente-índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro LFS e o primeiro antes dos 46 anos OU • ADR em qualquer idade ou câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes BRCA1 ou 2

2.3.2 Fatores de Risco

Embora a exata etiologia do carcinoma mamário seja desconhecida (POLYAK, 2007), sabe-se que o câncer de mama não tem uma causa única, a interação entre diversos fatores determina o risco individual de desenvolver a doença. Uma gama de fatores está relacionada com o aumento deste risco, tais como: idade, fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários. No entanto, a idade é considerada um dos principais fatores, mulheres a partir dos 50 anos são mais propensas a desenvolver a doença (INCA, 2020).

- **Fatores ambientais e comportamentais:** incluem obesidade e sobrepeso após a menopausa; sedentarismo e inatividade física; consumo de bebida alcoólica; exposição frequente a radiações ionizantes (Raios-X); exposições ocupacionais.
- **Fatores da história reprodutiva e hormonal:** Referem-se ao estímulo do hormônio estrogênio produzido pelo próprio organismo ou consumido por meio do uso continuado de substâncias com esse hormônio. Esses fatores incluem: primeira menstruação antes de 12 anos; não ter tido filhos; primeira gravidez após os 30 anos; menopausa tardia (após os 55 anos); uso de contraceptivos hormonais (estrogênio-progesterona); ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos.
- **Fatores genéticos e hereditários:** História familiar de câncer de ovário; casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos; alterações genéticas.

Os principais genes que aumentam o risco de câncer de mama são principalmente BRCA1, BRCA2, como os genes PALB2, ARD1, RAD51C, RAD51D, ATM e CHEK2. Ainda, BARD1, CDH1, NF1, PTEN e TP53 também estão associados ao risco de câncer de mama (CAI et al., 2021; DORLING et al., 2021; HU et al., 2021; NAROD, 2021).

2.4 GENE TP53 E A PROTEÍNA P53

O gene TP53 (OMIM # 191117) foi descrito pela primeira vez na literatura em 1979 por dois grupos de pesquisadores, pela interação de seu produto com antígeno T do vírus símio 40 (SV-40) (LANE; CRAWFORD, 1979; LINZER; LEVINE, 1979). Inicialmente

acreditava-se ser um tipo de oncogene devido sua super-expressão em tumores humanos, mas pesquisas posteriores demonstraram sua atividade supressora de tumor *in vitro* e *in vivo* (FINLAY; HINDS; LEVINE, 1989). Está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), possui aproximadamente 20 kb e é composto por 11 éxons (Figura 2. A.). Sendo o primeiro não codificante e altamente conservado nos vertebrados. O produto de sua transcrição é a proteína p53 (*phosphoprotein* 53) (GUIMARAES; HAINAUT, 2002; KASTENHUBER; LOWE, 2017).

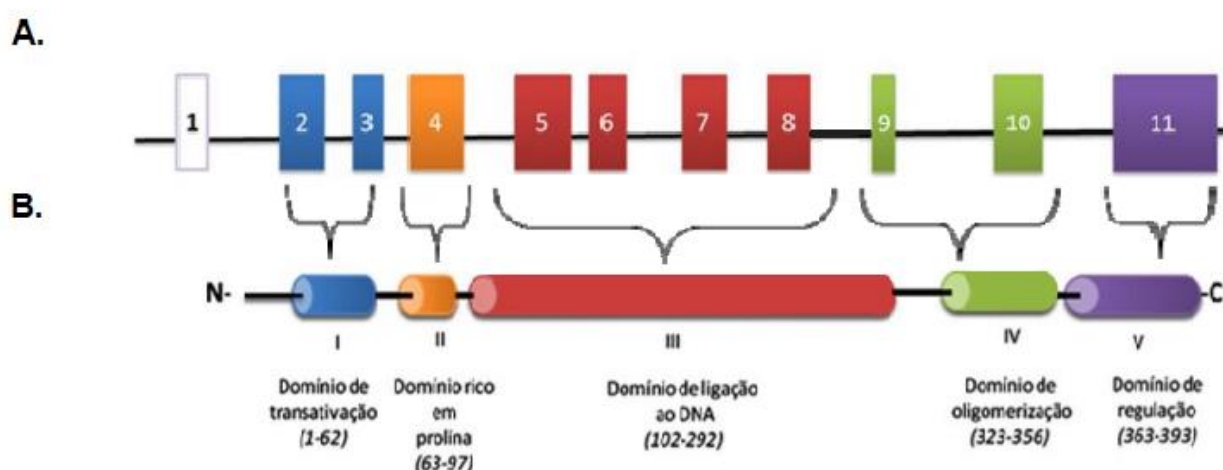


Figura 2: Representação esquemática correlacionando os éxons do gene TP53 (A) aos domínios funcionais da proteína p53 (B). As diferentes cores indicam os domínios da proteína p53 e seus respectivos éxons codificantes. Note que o éxon 1 não é codificante. Em B também são indicados os números dos resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio (Modificado de SEMP, 2014).

A proteína p53 recebe este nome devido ao seu peso molecular de 53 kDa, é composta por 393 aminoácidos e cinco domínios funcionais (Figura 2. B.). O primeiro domínio, denominado domínio de transativação, está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal) entre o aminoácido 01 e 62. É seguido por um domínio rico em prolina (aminoácidos 63 a 97) e pelo domínio de ligação em sítios específicos do DNA, região onde ocorre interações com outras proteínas, situado na parte central entre os aminoácidos 102 a 292. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal) estão localizados o domínio de oligomerização (aminoácidos 323 a 356), responsável pela tetramerização da proteína, e o domínio regulatório, entre os aminoácidos 363 ao 393 (HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018).

Em células normais, esta proteína é sintetizada continuamente, mas o seu nível celular é rigidamente regulado, não permitindo o acúmulo em níveis significativos. O processo de regulação é realizado por modificação covalente da proteína ou por interação com diferentes fatores, o que causa ativação ou desativação da mesma, a ubiquitina ligase

MDM2 é a responsável por esta regulação (Figura 3). É observado uma auto-regulação negativa, dado que a MDM2 é um supressor da função de p53 e também um alvo transcricional desta proteína. Em resposta aos danos e outros sinais de estresse ao DNA, as proteínas quinases, ATM e CHK2, impedem a interação entre MDM2 e p53 por meio da fosforilação de ambas. Então, ocorre o aumento do nível de p53, que por sua vez sendo um ativador transcricional, passa a regular a expressão de genes alvos, impedindo a progressão do ciclo celular nas fases G1 e G2 (P21/WAF-1, 14-3-3sigma, GADD45), permitindo o reparo dos danos no DNA (GADD45) ou início do processo de apoptose (BAX, CD95/FAS, KILLER/DR5, p53AIP1, PIG3, IGFBP3, NOXA, PUMA, p53AIF1) em caso de danos irreparáveis (LEVINE; OREN, 2009; HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018).

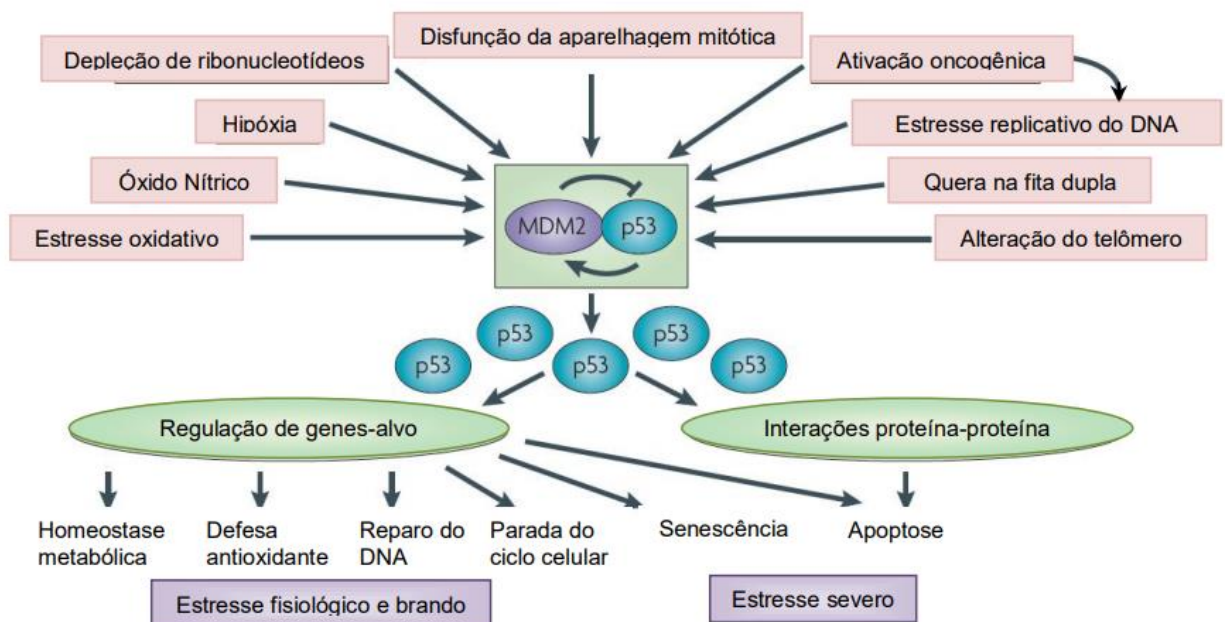


Figura 3: Esquema simplificado da via da p53. Representação da regulação MDM2-p53, na qual em condições normais MDM2 mantém os níveis e atividade de p53 constantemente baixos. Quando ocorrem sinais de estresse (Em rosa – é descrito apenas um subconjunto de sinais de ativação de p53), p53 é liberada da inibição mediada por MDM2, elevando significativamente os níveis e a atividade da proteína, que age de duas formas principais (em verde) induzindo várias alterações fenotípicas, sendo estas proporcionais à amplitude, duração e natureza do sinal de estresse causador da ativação (em roxo), ou seja, o estresse brando ocasiona a parada do ciclo celular e ocorre uma tentativa de reparo dos danos causados, enquanto, danos severos induzem a respostas mais extremas, que na maioria das vezes são irreversíveis como apoptose e senescência (Fonte: LEVINE; OREN, 2009, apud LEVY, 2010).

Portanto, a perda de função da p53 e a falha dos mecanismos de reparo, podem resultar na proliferação de células com DNA danificado, propagando mutações potencialmente oncogênicas (HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018). O gene TP53 é

encontrado alterado nos carcinomas de mama em aproximadamente 20–40% de todos os casos, dependendo do tamanho do tumor e do estágio da doença (BØRRESEN-DALE, 2003).

2.4.1 Mutações TP53 Associadas ao Câncer de Mama

Mutações no gene TP53 são as mais frequentes em carcinomas esporádicos, representando de 20% a 50% dos casos (NUSSBAUM, 2008) e aproximadamente 90% dos carcinomas mamários. Mutações germinativas em TP53 estão relacionadas com aumento do risco de câncer de mama e causam predisposição ao câncer familiar, estando a proliferação celular inadequada fortemente interconectada com o ciclo celular (SCHON; TISCHKOWITZ, 2018; KASHYAP et al., 2021).

As mutações em TP53 encontradas nos mais diversos tumores malignos podem ser: pontual do tipo *missense* - troca de aminoácido ou troca de sentido, *frameshift* - mutações que provocam alteração no quadro de leitura, devido a deleção e inserção (*indels*) de nucleotídeos, *nonsense* - levam a formação de códon de parada -, ou silenciosa - que possivelmente não provocam alteração na estrutura da proteína (KLUG et al., 2010; WASSERMAN et al., 2015).

As alterações do tipo *missense* são as mais prevalentes, localizadas principalmente nos éxons 5 a 8 que codificam os aminoácidos 126-306, do domínio de ligação da proteína p53 com o DNA (DE MOURA GALLO et al., 2005; PETITJEAN et al., 2007; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; WASSERMAN et al., 2015).

Em quase todos os tipos de câncer, em seis códons "*hotspots*" são encontrados aproximadamente 30% das mutações *missenses* (Figura 4. A.). Os códons 245, 248, e 273 estão localizados na interação entre a proteína p53 e o DNA alvo e os códons 175, 249 e 282 estão envolvidos na conformação da proteína (DE MOURA GALLO et al., 2005; GALIOTTO, 2011). Mutações nesses resíduos ocasionam perda parcial ou total da função da p53, o que pode resultar em diminuição da afinidade da proteína pelo DNA, incapacidade de reconhecer seus genes-alvo e transativá-lo, comprometendo a resposta ao estresse genotóxico (PETITJEAN et al., 2007; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; GALIOTTO, 2011). Referente a mutações germinativas (Figura 4.B.), além desses, outros *hotspots* são descritos, como substituições de base única nos códons 175, 220, 245, 248, 273 e 282 que afetam a estrutura 3D da proteína p53 ou sua ligação com DNA, resultando em perda de função. Nos códons 196 e 213 ocorre acúmulo de mutações *nonsense* e nos

códons 152, 209 e 241 são observados principalmente *indels* (BOUAOUN *et al.*, 2016).

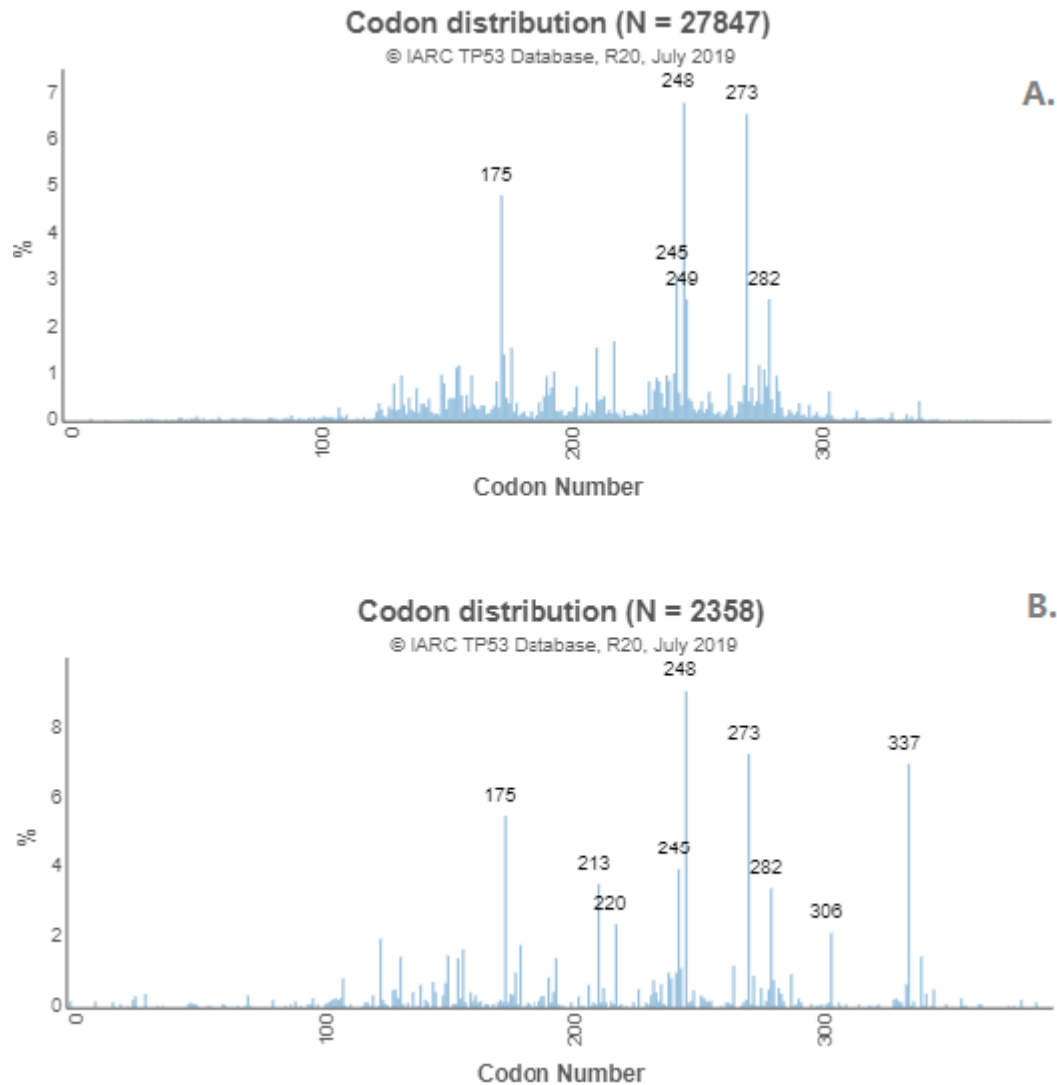


Figura 4: Histogramas exibindo a distribuição das mutações *hotspots* em TP53 por códon (%). A. Mutações somáticas e B. Mutações germinativas (Adaptado de IARC TP53 Database R20, July 2019).

Fora dos éxons 5 a 8, são encontradas um número significativo de mutações, principalmente nos códons 323 a 356 da região C-terminal, onde está localizado o domínio de oligomerização, envolvido na a formação de tetrâmeros. Nesta região, o códon 337 apresenta um elevado número de mutações *missenses* que resultam em perda de função (BOUAOUN *et al.*, 2016).

Assim como observado em diversos tipos de câncer, o câncer de mama esporádico apresenta um perfil de mutações com menos transversões G:C>T:A e mais

transições A:T>G:C. Diferentemente, no câncer de mama com mutações na linhagem germinativa do TP53, é observado alta prevalência de G:C>A:T nos sítios CpG e baixa frequência de transversões G:C>T:A e transições G:C>A:T nos sítios não CpG (DE MOURA GALLO et al., 2005; GALIOTTO, 2011).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – do inglês *single nucleotide polymorphism*) são o tipo mais comum de alteração no material genético, ocorrem quando um único nucleotídeo é substituído por outro em uma sequência de DNA em >1% da população (HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018). O TP53 é um gene altamente polimórfico, essas alterações podem afetar a função da proteína p53 e, conseqüentemente, podem afetar o risco, o fenótipo, a progressão ou a resposta ao tratamento do câncer (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009; HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018;). No entanto, o papel potencial dos SNPs no risco de câncer de mama ainda não é claro. No gene TP53 são descritos 85 SNPs, 90% destes estão localizados em íntrons, fora de sítios de *splicing* ou em éxons não codificantes (HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018).

O polimorfismo P72R é o mais extensamente estudado, está localizado no códon 72 (éxon 4), resulta em mudança de uma arginina para uma prolina; localizado em uma região rica em prolina envolvida na supressão de crescimento e com funções apoptóticas (GALIOTTO, 2011).

O códon 163 raramente apresenta mutações, mas é considerado um códon *hotspot* para TP53 em carcinomas mamários que possuem mutações germinativas em BRCA1/2 (GALIOTTO, 2011).

Portadores da síndrome de Li-Fraumeni, podem apresentar elevadas proporções de mutações germinativas em TP53, conferindo risco aumentado para câncer de mama hereditário. A mutação R337H está associada a traços de Síndrome de Li-Fraumeni parcialmente penetrantes (PASKULIN et al., 2015). Está localizada no éxon 10 do gene TP53, no domínio de tetramerização da proteína p53. Caracteriza-se por codificar uma histidina no lugar de arginina (p.Arg337His, c1010G> A) (PASKULIN et al., 2015) e, é encontrada em cerca de 0,3% da população do sul do Brasil (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016), fornecendo evidências de um efeito fundador (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; GIACOMAZZI et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo rastrear mutações no gene TP53 em pacientes com câncer de mama no município de Missal, Paraná.

3.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- Avaliar a presença de mutações no gene TP53 por meio da técnica de sequenciamento (capilar).
- Investigar a frequência e tipos de mutações no gene TP53.
- Classificar as mutações encontradas nos bancos de dados do *International Agency for Research on Cancer* - (IARC - <https://p53.iarc.fr>); Leiden Open Variation Database - LOVD TP53 (tumor protein p53 - <https://databases.lovd.nl/shared/genes/TP53>); The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TP53>); The TP53 website (<http://p53.fr>); Clinvar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?LinkName=gene_clinvar&from_uid=7157); Genome Aggregation Database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (<http://abraom.ib.usp.br/>).

4. METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto faz parte do projeto “ESTABELECIMENTO DO PERFIL DE ADOECIMENTO ONCOLÓGICO DA POPULAÇÃO DE MISSAL/PR”, realizado em colaboração entre a Prefeitura Municipal de Missal e a Universidade Federal da Integração Latino Americana (UNILA). Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/ Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Plataforma Brasil, CAAE número 79421517.9.0000.0107 (Anexo 2).

Para determinar a presença de mutações no gene TP53 em portadores de câncer de mama na cidade de Missal - Paraná, foram convidados a participar do estudo, de forma voluntária, mulheres com idade superior a 18 anos, diagnosticadas com câncer de mama, residentes no município. Das 35 pacientes portadoras de neoplasia maligna de mama, apenas 23 aceitaram participar do estudo. As participantes foram orientadas quanto à inclusão dos resultados do teste no estudo, em acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta foi realizada por meio de punção intravenosa, coletando 10 mL de sangue periférico em tubo Vacutainer® contendo Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), com o auxílio de seringas com agulhas estéreis e descartáveis. Após a coleta, cada tubo foi identificado apenas com um código numérico para manter o sigilo, a fim de evitar interferências.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Ciências Médicas (LPCM) da UNILA e armazenadas a -20°C.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO

O procedimento de isolamento e purificação do DNA genômico foi realizado a partir do kit *Invitrogen™ PureLink™* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, assim como ilustrado no fluxograma a seguir (Figura 5):

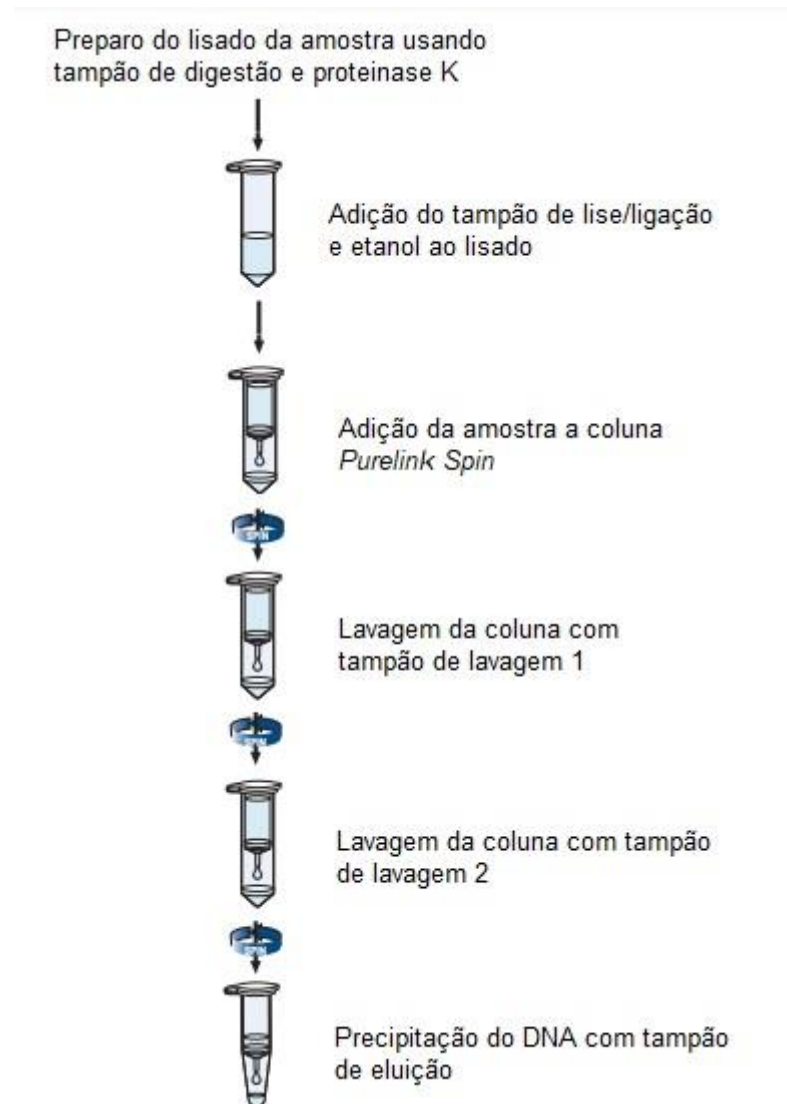


Figura 5: Fluxograma do procedimento de extração e purificação do DNA genômico utilizando kit de extração de coluna (Fonte: (INVITROGEN, 2013)).

A primeira etapa do procedimento de extração consistiu no preparo de um lisado das amostras de sangue. Para isso, as amostras foram descongeladas a 55 °C em um bloco de aquecimento, então 150 µL de sangue foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, adicionado 20 µL de Proteinase K e 20 µL Rnase A, homogeneizado em vórtex e incubado por 2 minutos à temperatura ambiente, para promover a digestão das proteínas. Posteriormente foi adicionado 200 µL de *Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer* e homogeneizado em vórtex, incubado por 10 minutos a 55 °C, para o rompimento das membranas celulares/nucleares. Então foi acrescentado 200 µL de etanol 96~100% na amostra lisada, misturado em vórtex por 5 segundos para obtenção de uma solução homogênea. O tampão de lise aumenta a atividade da proteinase K e ajuda a eliminar a contaminação de proteínas, enquanto o tampão salino promove ligação estável do DNA à

resina da coluna, utilizada na próxima etapa.

Na segunda etapa do protocolo foi realizada a etapa de purificação do DNA genômico, por meio do procedimento de centrifugação com base em coluna. Para tal, a amostra foi transferida para a *Purelink Spin Column*, centrifugada por 10.000 rpm (rotações por minuto), durante 1 minuto em temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, o tubo coletor foi descartado e a coluna com a membrana de sílica, em que o DNA permaneceu ligado, foi disposta em outro tubo coletor.

Em seguida foi efetuada a etapa de lavagem do DNA para eliminação dos componentes celulares considerados impurezas para o produto final. Para isso foi adicionado 500 µL de *Wash buffer 1* no tubo com a coluna e centrifugado a 10.000 rpm em temperatura ambiente por 1 minuto. Então, a coluna foi transferida para outro tubo coletor, foi adicionado 500 µL de *Wash Buffer 2* preparado com etanol 96~100% e centrifugado na velocidade máxima (15.000 rpm) por 3 minutos à temperatura ambiente, deste modo foram removidos os vestígios de proteína e sal. Por último, foi realizada a etapa de eluição de DNA com um tampão de baixo teor de sal que permite a estabilização do pH do DNA; a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, foi adicionado 100 µL de líquido eluição, e centrifugado por 1 minuto em velocidade máxima.

Concluídas as etapas, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro *NanoDrop (ThermoScientific)* com alíquotas de 1 µL do DNA extraído. Para garantir a pureza do DNA, avaliou-se os parâmetros de absorbância, $A_{260}/A_{230} \geq 1,7$ para verificar a contaminação por sais, polissacarídeos e compostos orgânicos; e $A_{260}/A_{280} = 1,8$ a 2,0 para medir contaminação por proteínas. Feito isso, as amostras foram armazenadas no banco de amostras mantido pelo LPCM.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de reação da Cadeia da Polimerase foi realizada para amplificação dos éxons 5, 6, 7, e 11 do gene TP53. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo para detecção de mutações TP53 por sequenciamento direto, da *International Agency for Research on Cancer (IARC)* (http://p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf).

As amplificações foram realizadas com um volume total de 15,0 µL de PCR mix, contendo: 1,5 µL PCR buffer sem MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), 0,6 µL MgCl₂ (25 mM), 3,0 µL de dNTPmix (2 mM), 0,6 µL de cada primer (10 µM), 0,15 µL de Taq DNA Polimerase

(5 U/uL), 7,05 µL de água milliQ e 1,5 µL de DNA molde. Na Tabela 1 contém as informações sobre os iniciadores específicos utilizados para amplificar as regiões de interesse do gene TP53 durante a reação de PCR, incluindo o tamanho do fragmento amplificado. No Apêndice 1 pode ser observado um esquema da sequência referência NG_017013.2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/383209646>) de TP53 e a posição em que os iniciadores se ancoram para a amplificação das regiões de interesse.

Tabela 1: Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação das regiões de interesse do gene TP53 e nas reações de sequenciamento.

Éxon	Primer (IARC code)	Seq primer (5' → 3')	Direção	Tamanho do Fragmento
5	312-F (P-312)	TTCAACTCTGTCTCCTTCCT	Senso	248 bp
	312-R (P-271)	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	Antisenso	
6	239-F (P-239)	GCCTCTGATTCCTCACTGAT	Senso	181 bp
	239-R (P-240)	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	Antisenso	
7	237F (P-237)	AGGCGCACTGGCCTCATCTT	Senso	177 bp
	237-R (P-238)	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC	Antisenso	
11	(P-E11Le)	AGACCCTCTCACTCATGTGA	Senso	245 bp
	(P-E11Re)	TGACGCACACCTATTGCAAG	Antisenso	

Os PCR mix foram levados a um termocilador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler*, com os seguintes parâmetros de amplificação (Figura 6): desnaturação inicial de 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores e extensão a 72°C por 1 minuto, reduzindo

0,5°C da temperatura de anelamento a cada 3 ciclos. Seguido de 30 ciclos adicionais de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos, mantendo a 10 °C.

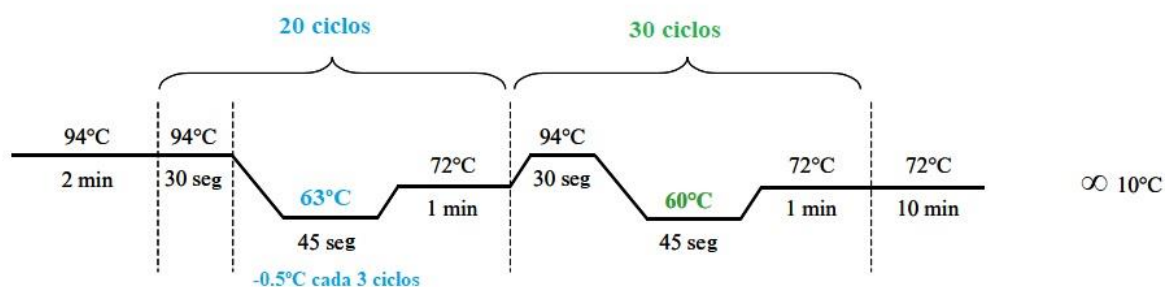


Figura 6: Parâmetros de amplificação utilizados na PCR para éxons 5, 6, 7, e 11 do gene TP53.

Os produtos de PCR tiveram suas amplificações confirmadas por meio da visualização dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com 1,5 g de agarose dissolvido 150 mL de tampão TBE (*Tris-Borato-EDTA*) 1X. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal com tampão TBE 1X a 130V por 40 minutos. No gel foi aplicado 3 µL de produto de PCR misturado com 3 µL de azul de bromofenol com gel red. Um marcador de peso molecular 1 Kb DNA *Ladder* (*Invitrogen*) foi adicionado para permitir a confirmação, por comparação, do tamanho da banda amplificada. A visualização do gel foi realizada em transluminador da marca *Locus* modelo *L-Pix Touch*.

4.5 SEQUENCIAMENTO

4.5.1 Purificação

Para a eliminação dos reagentes não incorporados da PCR, foram purificados 5 µL de produtos do PCR com 2 µL de reagente enzimático *ExoSap-IT™* (*Applied Biosystems*), em um termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler*, com a ciclagem de: 30 minutos a 37 °C para digestão do excesso de primers e desfosforilação dos nucleotídeos, 15 min a 80 °C para inativação das enzimas, por último 10 °C por 1 minuto.

4.5.2 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com o Kit de Sequenciamento *BigDye™ v3.1 (Applied Biosystems)* conforme especificações do fabricante. Este método consiste na adição de dideoxiribunucleotídeos trifosfatados (ddNTPs) marcados, que competirá com os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), que quando incorporados bloquearam a adição do nucleotídeo seguinte, gerando fragmentos de diferentes tamanhos.

Com o volume final de 10 µL, a reação foi realizada utilizando um mix contendo: 4,2 µL de H₂O *MiliQ*, 2 µL de 5X *Sequencing Buffer*, 2 µL *primer forward* ou *reverse* (Tabela 1 e Apêndice 1), 0,3 µL *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e 1,5 µL de produto de PCR purificado. As amostras foram acondicionadas em uma placa de sequenciamento de 96 poços, selada com um filme adesivo protetor e levada ao termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler*, programado para 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minuto.

4.5.3 Precipitação

Para a precipitação, em cada poço da placa com reação de sequenciamento, foram adicionados 32,5 µL do mix de precipitação, contendo EtOH/EDTA (2,5 µL 125mM EDTA + 30 µL de etanol 100%). Este foi homogeneizado de 3x a 4x no vórtex e mantido por 15 minutos em temperatura ambiente, sem contato com direto luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 25 minutos em uma velocidade de 5000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, foi retirado o filme adesivo protetor, o sobrenadante foi descartado, a placa foi invertida em um papel toalha para enxugar o excesso de etanol e centrifugada por 1 minuto na velocidade de 300 rpm.

Posteriormente, adicionou-se 30 µL de etanol 70% em cada poço, então a placa foi selada e novamente centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm a 4°C, ao final da centrifugação o sobrenadante foi descartado, a placa foi invertida em um papel toalha e centrifugada 300 rpm durante 1 minuto. Logo após, a placa, coberta por um papel alumínio, foi incubada em um termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* por 15 minutos a 37°C para evaporação completa do etanol.

Em seguida, o DNA foi ressuspendido em 10 µL de formamida Hi-di, homogeneizada em vórtex, levado ao termociclador por 95 °C por 1 minuto, para desnaturação. Finalmente, a placa foi injetada em um sequenciador automático de 8

capilares (*ABI PRISM® 3500 GeneticAnalyzer, AppliedBiosystems*), baseado no método de Sanger.

4.5.4 Análise e interpretação dos dados

Após a eletroforese capilar, os cromatogramas gerados foram analisados semi-automaticamente por inspeção visual de sequências importadas no *software* de análise de sequência *Chromas*, no qual foi realizado o *trimming* para remover bases de baixa qualidade. Cada sequência foi alinhada com os dados sequência referência, NG_017013.2, do *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/383209646>), no programada *Bioedit* e as variações foram anotadas. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As variantes foram classificadas a partir dos bancos de dados International Agency for Research on Cancer - (IARC - <https://p53.iarc.fr>); Leiden Open Variation Database - LOVD TP53 (tumor protein p53 - <https://databases.lovd.nl/shared/genes/TP53>); The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TP53>); TP53 website (<http://p53.fr>); Clinvar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?LinkName=gene_clinvar&from_uid=7157); Aggregation Database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (<http://abraom.ib.usp.br/>); para análise do tipo de variação genética e obtenção dados de frequência e funcionalidade de cada alteração específica.

5. RESULTADOS

Das 35 pacientes portadoras de neoplasia maligna de mama, apenas 23 aceitaram participar do estudo (Tabela 2). Três mulheres sem parentesco apresentaram variações no gene TP53, sendo que uma delas apresentou duas alterações diferentes no mesmo éxon. Ainda, uma das variantes foi observada em duas mulheres (Tabela 3). A prevalência geral dessas variantes foi de 13% (3/23).

As amostras 80 (primer 239), 99 (primer 312), 127 (primer 312) e 130 (primer 312) foram excluídas das análises devido a problemas na amplificação do DNA ou na eletroforese capilar, que podem ser decorrentes de fatores como impurezas na amostra de DNA, desnaturação incompleta do DNA, concentração de amostra de DNA insuficiente ou excessiva, ou mutação nos sítios de ligações dos primers.

Tabela 2: Características de história pessoal, história familiar, tipo de câncer e presença de mutação nos éxons 5, 6, 7 e 11 do gene TP53 das moradoras do município de Missal, portadoras de neoplasia maligna de mama. Os portadores de mutação estão nas linhas em destaque.

Nº da amostra	Tipo de Câncer	Idade	Idade de Diagnóstico	Descendência	História familiar de câncer	Mutação no gene TP53**
16	Mama	49	40	Alemã	Parente de 3º grau não especificado - Mama Parente de 3º grau não especificado - Ossos	Não
23	Mama	64	50	Alemã		Não
57	Mama	62	54	Brasileira		Não
63	Mama	50	48	Brasileira	Pai - Cérebro (74 anos) Irmã - Intestino (55 anos)	Não
64	Mama	47	44	Alemã	Tio - Leucemia (50 anos) Tio - Rim (70 anos)	Não
66	Mama	42	33	Brasileira	Parente de 3º grau não especificado - Fígado (60 anos)	Não
71	Mama, Pele e Linfoma	57	50	Alemã	Pai - Boca e esôfago (63)	Não
73	Útero e mama	70	48	Brasileira	Tia – Mama	Não
77	Mama	73	71	Alemã		Não
79	Mama	54	50	Alemã	Parente de 1º grau não especificado - Mama (65 anos) Parente de 1º grau não especificado - Fígado (54 anos)	Não

80	Mama	42	34	Italiana	Avô(ó) - Intestino (63 anos) e esôfago (59) Pai - Pele e fígado (41 anos) Mãe - Mama (51 anos) Tio - não informado	Não
81	Mama	74	53	Alemã	Cônjuge - Pele (75 anos) 2º grau não especificado - Osso (77 anos) Sobrinho - Leucemia (21 anos)	Não
94	Mama	44	41	Brasileira	Tia - Mama (50 anos) Tia - Pulmão Tia - Intestino Tio - Bexiga (57 anos)	Não
99	Mama	72	70	Alemã	Pai - rosto (60 anos)	Não
102	Mama	75	56	Alemã		Não
104	Mama	46	36	Alemã	Avô - Pele Parente de 3º grau não especificado - Seio (60 anos) Tio - Pulmão (67 anos)	Não
108	Mama	72	59	Alemã	Pai - Fígado	Sim
109	Mama	57	Acima de 50	Alemã		Não
127	Mama	89	86	Alemã		Sim
130	Mama	79	70	Alemã		Sim
132	Mama	25	22	Alemã	Avô - Garganta (70 anos) Pai - Leucemia (37 anos) Primo/a - Cérebro (30 anos)	Não

133	Mama	43	36	Alemã	Tia - Mama (55 anos) Tia - Mama (60 anos)	Não
-----	------	----	----	-------	--	-----

Tabela 3: Caracterização da localização, tipo de alteração e efeito das variações genéticas encontradas nos éxons analisados do gene TP53.

Amostra	Localização			Nomenclatura da variante			Tipo de Variante	Consequência Molecular
	Éxon	Coordenada genômica (GRCh38)	Domínio	cDNA	Alteração na proteína	ID dbSNP		
127; 130	6	17: 7674932	Ligação ao DNA	C.599del	p.Asn200fs	rs1131691011	Deleção	<i>Frameshift</i>
108	7	17: 7674218	Ligação ao DNA	C.745A>G	p.Arg249Gly	rs587782082	Variante de nucleotídeo único	<i>Missense</i>
108	7	17: 7674217	Ligação ao DNA	C.746G>A	p.Arg249Lys	rs587782329	Variante de nucleotídeo único	<i>Missense</i>

FONTE: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

As pacientes 127 e a 130, sem parentesco, são portadoras da mesma alteração patogênica: uma deleção de um único par de bases na posição do nucleotídeo 599, localizado no éxon 6, que causa uma variação do tipo *frameshift* (p.Asn200fs) (Figuras 7 e 8), associada a Síndrome hereditária de predisposição ao câncer. Essa alteração causa a mudança do aminoácido asparagina para uma isoleucina (NCBI, 2013).

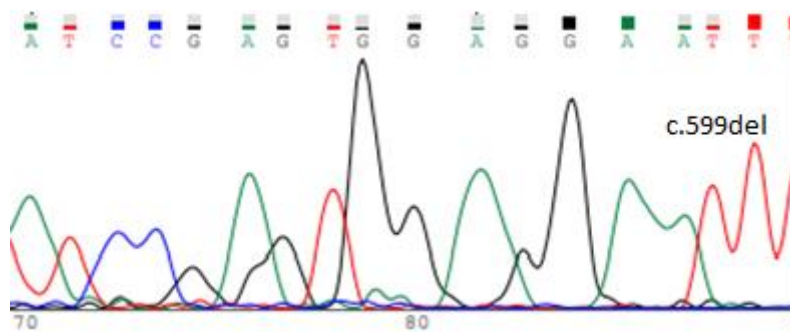


Figura 7: Eletroferograma mostrando variante encontrada na amostra 127 do primer 239.

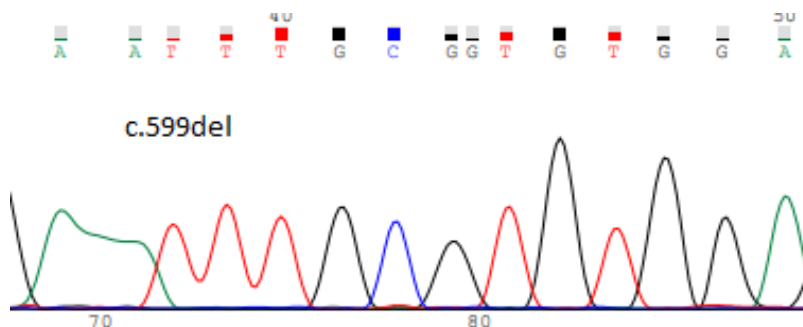


Figura 8: Eletroferograma mostrando a variante encontrada na amostra 130 do primer 239.

No éxon 7, foram encontrados dois SNP do tipo *missense*, com significado incerto, na probanda 108. A variante c.745A>G possui substituição de uma adenina por uma guanina na posição do nucleotídeo 745, o que causa a troca de uma arginina por uma glicina no códon 249 (p.Arg249Gly), relacionado com a síndrome de Li-Fraumeni e síndrome da predisposição do câncer hereditário (NCBI, 2017). Enquanto a outra variante, c.746G>A, apresenta a substituição de uma guanina por adenina na posição do nucleotídeo 746, que consequentemente, no códon 249 (p.Arg249Lys), tem a troca de uma arginina por uma lisina. Esta variação, por sua vez, está associada com a síndrome da predisposição do câncer hereditário (NCBI, 2018).

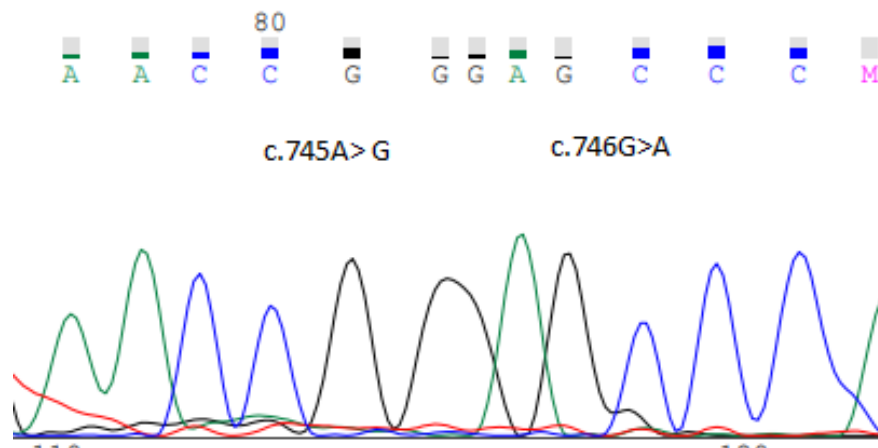


Figura 9: Eletroferograma mostrando as variantes encontradas na amostra 108 do primer 237.

No apêndice 2, as variantes encontradas são caracterizadas a partir dos bancos de dados *International Agency for Research on Cancer* (IARC); *TP53 website*; ClinVar. Ressalta-se que estas variantes não estão presentes nos bancos de dados populacionais *Genome Aggregation Database* (gnomAD); Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM), *Leiden Open Variation Database* – (LOVD TP53); *The Human Gene Mutation Database* (HGMD).

6. DISCUSSÃO

Dentre as 23 mulheres portadoras de câncer de mama de Missal-PR submetidas ao sequenciamento do TP53 no presente trabalho, 60,89% apresentam parentes com algum tipo de câncer. Contudo, das três portadoras de mutação da amostra, todas de ascendência alemã e com idade de diagnóstico de câncer de mama após os 55 anos de idade, apenas uma relata possuir algum parente portador de câncer.

Ainda, as três variações (c.599del, c.745A>G e c.746G>A) que foram encontradas nos éxons analisados do gene TP53 estão associadas com o desenvolvimento de câncer de mama (NCBI, 2013; NCBI, 2017; NCBI, 2020), sendo a frequência de mutações observada (13%) semelhante a outros estudos realizados na população brasileira em pacientes com tumores malignos mamários (LEVY, 2010; MOURA-GALLO et al., 2004; GALIOTTO, 2011).

Dentre as alterações encontradas, espera-se que c.599del resulte em perda de função por truncamento prematuro de proteínas ou diminuição significativa de "mRNA" (Apêndice 2). Dessa forma, a variação é considerada causadora de doença, sendo associada ao fenótipo de carcinoma de ovário pelo banco de dados *The TP53 Website* e a Síndrome de predisposição hereditária ao câncer pelo ClinVar. Esta alteração foi descrita pela primeira vez como uma mutação germinativa no banco de dados do ClinVar, enquanto que no conjunto de dados do IARC TP53 Database (IARC) e do *The TP53 Website* é descrita apenas como mutação somática. Apesar de não ser considerada um *hotspot* para câncer, esta variação é referida como muito frequente nos dados fornecidos pelo *The TP53 Website*. Em relação às predições *in silico* do IARC todas as isoformas são alteradas, porém, não interfere significativamente no *splicing*. Não há evidência funcionais descritas no ClinVar para esta variação (NCBI, 2013).

A variante c.745A>G é caracterizada pela substituição de uma arginina no códon 249 por uma glicina, um aminoácido com diferença físico-química moderada. De acordo com o IARC, esta variante está localizada em códon *hotspot* do câncer, no domínio de ligação ao DNA da proteína p53, em uma posição de aminoácido altamente conservada em espécies de vertebrados. Diversos estudos indicam que a variante em questão afeta a função da proteína TP53 (KATO et al., 2003; BERGE et al., 2013; BALLY et al., 2015; GIACOMELLI et al., 2018; KOTLER et al., 2018). Em ensaios funcionais baseados em levedura é relacionada com a perda da capacidade de transativação (KATO et al., 2003). Com base na análise *in silico* esta alteração é considerada deletéria (NCBI, 2020), já os

bancos de dados IARC e do TP53 *Website* trazem outras informações como a análise *Sift* que prevê se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína, sendo nesse caso prejudicial. Considerada de significância clínica incerta, o banco de dados ClinVar associa esta variante à síndrome de Li-Fraumeni e à diferentes tipos de câncer (listados no Apêndice 2), no entanto o TP53 *Website* associa apenas a Síndrome Mielodisplásica. Essa alteração foi relatada como uma mutação somática 53 vezes em vários tumores no banco de dados IARC, e como de origem germinativa no banco de dados ClinVar.

A variante c.746G>A acarreta na substituição de uma arginina por uma lisina, aminoácidos com propriedades semelhantes, considerado uma substituição conservadora de aminoácidos, ainda assim, em análise *Sift* é considerada uma alteração prejudicial. Dados *in silico* também predizem que se trata de uma alteração deletéria (NCBI, 2017). O códon alterado está localizado em uma posição altamente conservada nas espécies de vertebrados, no domínio de ligação da proteína p53 ao DNA, devido a isso é previsível que afete a capacidade de transativação em todas as isoformas de p53 (KATO et al., 2003; IARC, 2021). Essa alteração foi relatada apenas uma vez em linhagem germinativa, em contrapartida, foi relatada 29 vezes como uma alteração somática no banco de dados IARC TP53. Diversos fenótipos são associados com esta mutação, incluindo a Síndrome hereditária de predisposição ao câncer.

Ressalta-se que estas variantes não estão presentes nos bancos de dados populacionais *Genome Aggregation Database* (gnomAD); Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM), *Leiden Open Variation Database* – (LOVD TP53); *The Human Gene Mutation Database* (HGMD).

A frequência de variações relativamente baixa, pode estar relacionada com as características das pacientes analisadas, uma vez que mutações germinativas no gene TP53 estão, principalmente, relacionadas a LFS e apenas 2 das mulheres analisadas se enquadram nos critérios para rastreamento desta síndrome (Quadro 1) (ACHATZ, 2008). Outro fator importante que pode implicar nos resultados encontrados, está relacionado com as regiões gênicas investigadas, embora os éxons escolhidos para esta pesquisa apresentem alta frequência de mutações, este gene possui 10 éxons codificantes, dos quais apenas 4 foram analisados.

Apesar do câncer de mama ser uma das principais mortes por câncer no mundo e do gene TP53 ser um dos principais genes atuantes no processo da carcinogênese, são poucos os estudos de variações genéticas na população brasileira envolvendo este gene e câncer mama. Os estudos brasileiros focam principalmente na

variante R337H, que por sua vez é a principal variante relacionada com a Síndrome de Li-Fraumeni, esta variante não foi analisada no presente projeto. Embora essa variante apresente um percentual relativamente alto para uma doença rara, é notável a necessidade de mais estudos que investiguem os principais códons *hotspot* fora do espectro de LFS. Os iniciadores utilizados nesta pesquisa abrangem quase todos os códons *hotspots* do TP53 (Figura e 4 Apêndice 1), excetuando os códons 337 (éxon 10), 273 e 282 (ambos éxon 8). Das três mutações encontradas, duas estão localizadas em um códon *hotspot*.

Moura-Gallo (2004), através de análises moleculares dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene TP53, identificou 24 mutações em 120 pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama do Rio de Janeiro. Nenhuma dessas mutações foram evidenciadas nesta pesquisa, porém, semelhantemente a esta, foram encontradas duas mutações em um mesmo caso. Este estudo corroborou com relação de mutações no gene TP53 como indicadores de tumores de mama mais agressivos.

Casey e colaboradores (1996) buscaram determinar o *status* dos éxons codificantes 2 a 11 do gene TP53 em coortes de indivíduos com câncer de mama, ovário e pulmão. Dos 93 indivíduos portadores de câncer de mama, 24 apresentaram mutações, sendo 19% das variações localizadas fora de regiões consideradas *hotspots*, incluindo a variante c.599del. Os autores alertam que um número substancial de mutações pode não ser detectada em análises restritas aos códons *hotspots*.

No presente estudo, aproximadamente 26% das mulheres submetidas ao sequenciamento genético do gene TP53 tinham idade inferior a 40 anos quando receberam o diagnóstico de câncer de mama, 57% entre 40 e 59 anos e apenas 17% acima de 60 anos. Na América Latina é observada uma alta taxa de incidência de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa. Devido as características genômicas desse tipo de câncer ainda serem desconhecidas, foi criado o projeto PRECAMA (*Molecular Subtypes of Premenopausal Breast Cancer in Latin American Women*), que se trata de um estudo caso-controle multicêntrico e busca determinar os fatores genéticos específicos da população latino-americana, ainda tem o intuito de determinar a prevalência de síndromes hereditárias de câncer de mama conhecidas na América Latina e a identificação de pacientes com fenótipos específicos de câncer de mama hereditário. Infelizmente, até o momento, o Brasil não está entre os países inclusos na pesquisa. Em um projeto piloto foram analisados 126 casos, no qual foi observado que o gene TP53 foi o gene que apresentou mais variações genéticas, a maioria do tipo *missense*. Também foi constatado elevado índice de truncamento de proteína, sendo G:C>T: A o tipo de mutação TP53 mais frequente. A carga

geral de mutação condiz com esperado, comparado com dados em outras populações, porém espera-se que estudos posteriores demonstrem padrões mutacionais diferentes (OLIVIER et al., 2019).

As pacientes 127 e 130, portadoras da mesma mutação, foram diagnosticadas com câncer de mama aos 86 e 70 anos, respectivamente. Ambas as pacientes não possuem história familiar de câncer (Tabela 3). Contudo, a paciente 108, portadora de duas mutações, foi diagnosticada aos 59 anos de idade e possui histórico de câncer na família. As variantes, c.745A>G e c.746G>A, encontradas neste paciente estão relacionadas com a síndrome hereditária de predisposição ao câncer que, de acordo com o banco de dados ClinVar, está associada ao Carcinoma hepatocelular (Apêndice 2), tipo de câncer que seu pai apresenta.

Variações na linhagem germinativa em TP53 são condizentes com a síndrome de Li-Fraumeni, associada a um alto risco de câncer ao longo da vida e de câncer de mama de início precoce (GUHA; MALKIN, 2017). Entretanto, nenhuma das pacientes portadoras de mutação apresenta um fenótipo clínico de LFS. Nesses casos, quando o único critério para LFS é uma variante TP53, Weitzel e colaboradores (2018) sugerem a exclusão de DNA tumoral circulante e hematopoiese clonal de potencial indeterminado relacionada ao envelhecimento, tratamentos citotóxicos, malignidade hematológica subjacente ou pré-malignidade. De acordo com o autor, o teste de tecidos auxiliares não linfóides é necessário para confirmar ou refutar o estado da linhagem germinativa analisada. Contudo, é importante ressaltar que quando analisadas amostras de material genético isolado de sangue periférico ou saliva, as variantes somáticas são mais facilmente detectadas com sequenciamento de próxima geração em comparação com o sequenciamento de Sanger (COFFEE et al., 2017; WEITZEL et al., 2018).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A frequência de mutações encontrada está dentro do esperado, corroborando com outros estudos semelhantes, o que pode indicar que o número elevado de neoplasias malignas de mama identificadas no Município de Missal não está relacionado apenas com alterações nos éxons no gene TP53 analisados.
- ✓ Este estudo rastreou os éxons 5, 6, 7, e 11, que são as regiões onde a maioria das mutações já descritas estão localizadas. Alterações fora destas regiões podem ter sido perdidas e pesquisas futuras são importantes para determinar a frequência de mutações em todo o gene TP53 nesta população.
- ✓ É importante ressaltar que, para a confirmação dos achados, será necessário estudo subsequentes de tecidos auxiliares, como por exemplo análise de tecidos normais.
- ✓ Uma vez encontradas mutações de origem germinativa no gene TP53, recomenda-se teste molecular dos familiares para determinar se a variante patogênica foi transmitida.
- ✓ As variantes de TP53 são as mais frequentes encontradas em tumores e apresentam desafios na interpretação da linha germinativa. Este estudo demonstra a importância da análise de variações genéticas em diferentes bancos de dados, uma vez que podem apresentar dados discrepantes.

8. REFERÊNCIAS

- ACHATZ, M. I. A. D. S. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like : impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53** Tes. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The inherited p53 mutation in the Brazilian population. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 12, 2016.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BALLY, C. et al. Comparison of TP53 mutations screening by functional assay of separated allele in yeast and next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, v. 39, n. 11, p. 1214–1219, 2015.
- BERGE, E. O. et al. Functional characterisation of p53 mutants identified in breast cancers with suboptimal responses to anthracyclines or mitomycin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2790–2797, 2013.
- BERLINER, J. L., & FAY, A. M. (2007). Risk Assessment and Genetic Counseling for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. **Journal of Genetic Counseling**, 16(3), 241–260.
doi:10.1007/s10897-007-9090-7
- BØRRESEN-DALE, Anne-Lise. TP53 and breast cancer. **Human mutation** 21.3 (2003): 292-300.
- BOUAOUN, L. et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. **Japanese Journal of Radiological Technology**, v. 37, n. 9, p. 865–876, 2016.
- CAI, Y. et al. A systematic review of recommendations on screening strategies for breast cancer due to hereditary predisposition : Who , When , and How ? **Cancer Medicine**, p. 1–12, 2021.
- COFFEE, B. et al. Detection of somatic variants in peripheral blood lymphocytes using a next generation sequencing multigene pan cancer panel. **Cancer Genetics**, v. 211, p. 5–8, 2017.
- DANTAS, É. L. R. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263–269, 2009.
- DE MOURA GALLO, C. V. et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 589, n. 3, p. 192–207, 2005.
- DORLING, L. et al. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 428–439, 20 jan. 2021.

FENTIMAN, I. S.; D'ARRIGO, C. Pathogenesis of breast carcinoma. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, n. 1, p. 35–40, 2004.

FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; LEVINE, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, n. 7, p. 1083–1093, 1989.

GALIOTTO, D. **Frequência de mutações no gene TP53 em tumores de mama em pacientes de Santa Catarina**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 6–12, 2014.

GIACOMELLI, A. O. et al. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer HHS Public Access Author manuscript. **Nat Genet**, v. 50, n. 10, p. 1381–1387, 2018.

GUHA, T.; MALKIN, D. Inherited TP53 mutations and the Li-fraumeni syndrome. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2017.

GUIMARAES, D. P.; HAINAUT, P. TP53: A key gene in human cancer. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 83–93, 2002.

HU, C. et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 440–451, 20 jan. 2021.

HUSZNO, J.; GRZYBOWSKA, E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 16, n. 1, p. 34–40, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019a. v. 4

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer** Rio de Janeiro: INCA, , 2020.

INVITROGEN. **PureLink ® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA** PureLink Genomic DNA Kits: For purification of genomic DNA. [s.l: s.n.].

IPARDES. **CADERNO ESTATÍSTICO MUNICÍPIO DE MISSAL** Missal Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social, , 2021. Disponível em: <www.ipardes.gov.br>

JEGGO, P. A.; PEARL, L. H.; CARR, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 35–42, 2016.

JINDAL, B. et al. Role of p53 as a prognostic marker in breast carcinoma and its

correlation with tumor size, tumor grade and lymph node metastasis. **Indian Journal of Pathology and Oncology**, v. 7, n. 3, p. 378–383, 2020.

KASHYAP, D. et al. Oncogenic and Tumor Suppressive Components of the Cell Cycle in Breast Cancer Progression and Prognosis. p. 1–28, 2021.

KASTENHUBER, E.; LOWE, S. Putting p53 in context Edward. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062–1078, 2017.

KATO, S. et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 14, p. 8424–8429, 2003.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KONY, Sabine J., et al. Radiation and genetic factors in the risk of second malignant neoplasms after a first cancer in childhood. **Lancet**. 1997 Jul 12;350(9071):91-5. doi: 10.1016/S0140-6736(97)01116-1. PMID: 9228960.

KOTLER, E. et al. A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. **Molecular Cell**, v. 71, n. 1, p. 178- 190.e8, 2018.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells [19]. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261–263, 1979.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009.

LEVY, C. B. **Análise de mutações no gene TP53 em casos de câncer de mama e estudo da proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor**. [s.l.] Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.

LINZER, Daniel IH; LEVINE, Arnold J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 17, no. 1 (1979): 43-52.

LYNCH, Julie A.; VENNE, Vickie; BERSE, Brygida. Genetic tests to identify risk for breast cancer. In: Seminars in oncology nursing. WB Saunders, 2015. p. 100-107.

MAI, P. L. et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation-carriers in the NCI LFS cohort. **Cancer**, v. 122, n. 23, p. 3673–3681, 2016.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, n. 1, p. 23–31, 2015.

MARTÍN M, HERRERO A, E. I. El cáncer de mama ; Breast cancer. **Arbor Ciencia, Pensamiento y Cultura**, v. 191, n. 773, p. 3, 2015.

MOURA-GALLO, C. V. DE et al. 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. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 2, p. 167–175, 2004.

NAROD, S. A. Which Genes for Hereditary Breast Cancer? **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 471–473, 20 jan. 2021.

NUSSBAUM, R. L. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA, A. M.; ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: The Gatekeepers and the Caretakers. **Pathology Patterns Reviews**, v. 124, n. suppl_1, p. S16–S28, 1 dez. 2005.

OLIVIER, M. et al. Li-Fraumeni and Related Syndromes: Correlation between Tumor Type, Family Structure, and TP53 Genotype. **Cancer Research**, v. 63, n. 20, p. 6643–6650, 2003.

OLIVIER, M. et al. Molecular features of premenopausal breast cancers in Latin American women: Pilot results from the PRECAMA study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–19, 2019.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Uses. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 1, 2010.

PASKULIN, D. D. et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p. Arg337His, R337H) Founder mutation: clues from haplotyping of short tandem repeats on chromosome 17p. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–11, 2015.

PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2157–2165, 2007.

POLYAK, K. Breast cancer: Origins and evolution. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.

PREFEITURA DE MISSAL. O Município, 2016. Disponível em: <https://www.missal.pr.gov.br/municipio/historia>. Acessado em: 25 de março de 2021.

RAMAMURTHY, C.; CHERTOCK, Y.; HALL, M. J. Randomized Controlled Trials in Hereditary Cancer Syndromes. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 729–750, 2017.

RANA, H. Q. et al. Genotype–phenotype associations among panel-based TP53+ subjects. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 2478–2484, 2019.

RUIJS, M. W. G. et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: Mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 6, p. 421–428, 2010.

SALMON, A. et al. Rapid Development of Post-radiotherapy Sarcoma and Breast Cancer in a Patient with a Novel Germline “De-Novo” TP53 Mutation. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 7, p. 490–493, 2007.

SCHON, K.; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast

cancer: TP53. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 2, p. 417–423, 2018.

SEMP, V. B. **ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE P53 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E SUPEREXPRESSÃO DE HER2**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2014.

TEIXEIRA, L. A.; PORTO, M. A.; NORONHA, C. P. **O Câncer no Brasil: Passado e Presente**. Rio de Janeiro: Outras Letras, 2012. v. 1

UNGERLEIDER, N. A. et al. Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2018.

VIEIRA, S. C. **Câncer de mama: Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia - Regional Piauí - 2017**. Teresina: EDUFPI, 2017.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, 2002.

WASSERMAN, J. D. et al. Prevalence and functional consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: A children's oncology group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 6, p. 602–609, 2015.

WEITZEL, J. N. et al. Somatic TP53 variants frequently confound germline testing results. **HHS Public Access**, v. 20, n. 8, p. 809–816, 2018.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D. P.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: Cancer implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 2, p. 95–107, 2009.

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – REGIÃO DE INICIADORES E AMPLICONS NO GENE TP53

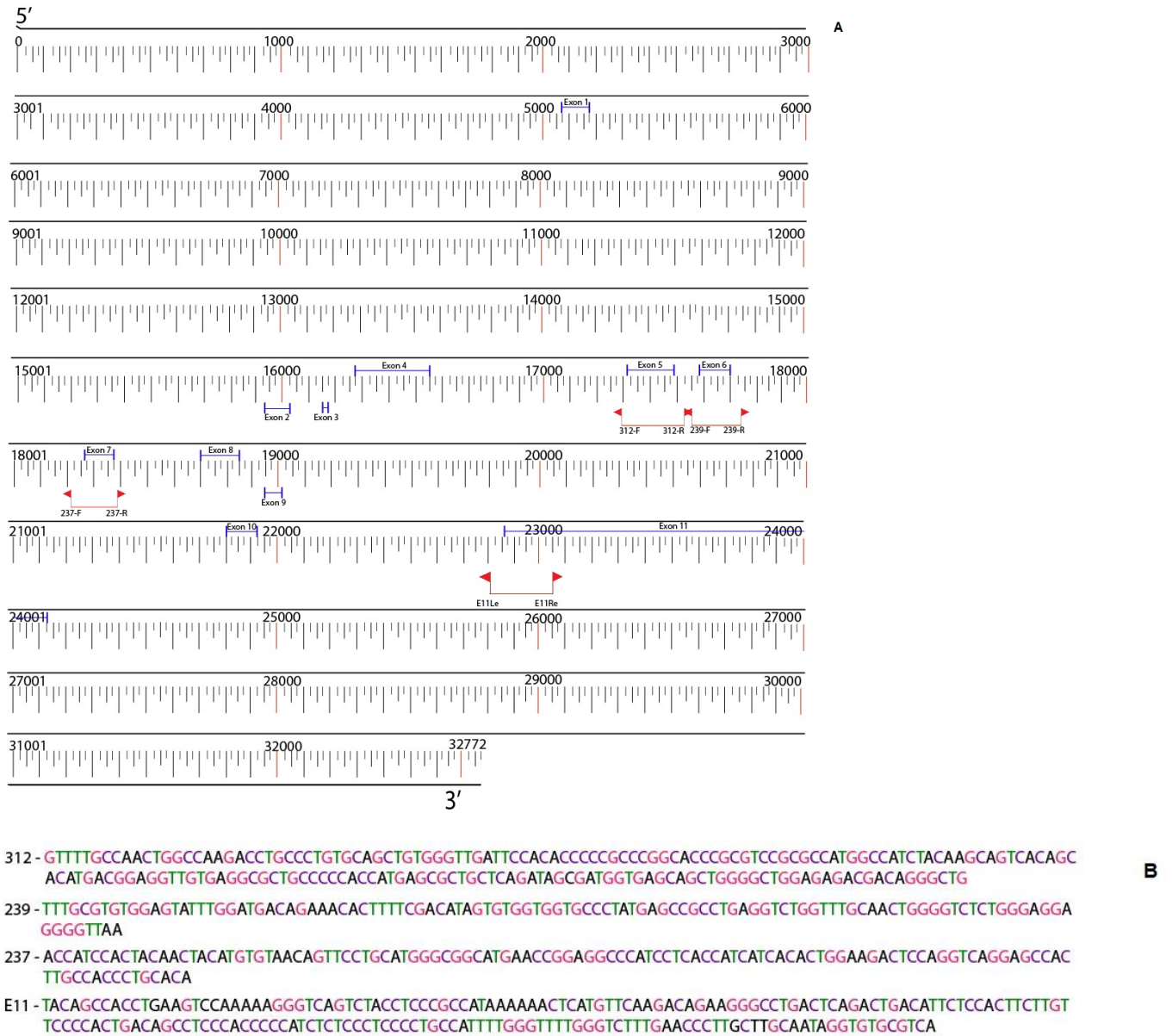


Figura 10: Esquema das regiões dos iniciadores e dos amplicons utilizados para análise do gene TP53.
A. sequência referência NG_017013.2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/383209646>) do gene TP53, os éxons e a posição em que os iniciadores se ancoram para a amplificação das regiões de interesse. **B.** Sequência de nucleotídeos das regiões de interesse dos éxons 5 (primer 312), 6 (primer 239), 7 (primer 237) e 11 (primer E11) (FONTE: elaboração própria).

APÊNDICE 2 – CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES

Quadro 2 - Quadro de Caracterização das variantes obtidas por sequenciamentos dos éxons 5, 6, 7 e 11 do gene TP53 de portadoras de câncer de mama de Missal, PR.

	Alteração	c.599del (p.Asn200fs)	c.745A> G (p.Arg249Gly)	c.746G>A (p.Arg249Lys)
CLINVAR	Condição	Síndrome hereditária de predisposição ao câncer	Adenocarcinoma de estômago, carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, adenocarcinoma de pâncreas, síndrome de Li-Fraumeni, uterina Carcinossarcoma, ovarianos Neoplasias, meduloblastoma, Glioblastoma, Adenocarcinoma pulmonar, síndrome da predisposição do câncer hereditário, Carcinoma de esôfago, Carcinoma de células escamosas do pulmão, Adenocarcinoma da próstata, Neoplasia maligna do corpo do útero, Cistadenocarcinoma seroso do ovário, Câncer de células pequenas do pulmão, Carcinoma hepatocelular.	Síndrome hereditária de predisposição ao câncer, Carcinossarcoma Uterino, Adenocarcinoma de estômago, Meduloblastoma, Cistadenocarcinoma seroso de ovário, Carcinoma de células escamosas da pele, Carcinoma de esôfago, Neoplasia maligna do corpo do útero, Glioblastoma, Adenocarcinoma de pulmão, Carcinoma de células escamosas do pulmão, Carcinoma hepatocelular, Adenocarcinoma pancreático, Câncer de pulmão de pequenas células, Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, Adenocarcinoma de próstata.
	Significância clínica	Patogênica	Significância incerta / Provavelmente patogênica	Significância incerta / Provavelmente patogênica

	Origem da mutação	Germinativa	Germinativa / somática	Germinativa / somática
	Frequência	Não descrito	Não descrito	Não descrito
	Consequência Funcional	Não descrito	Não descrito	Não descrito
	Acesso	VCV000428870	VCV000376654	VCV000142241
The TP53 website	Condição	Carcinoma de Ovário	Síndrome Mioledisplásica	Carcinoma Adrenocortical
	Significância clínica	Não descrito	Provavelmente patogênico	Provavelmente patogênico
	Origem da Mutação	Somática	Somática	Somática
	Frequência	Muito frequente	Frequente	Frequente
	Atividade da Proteína	Truncamento (atividade nula)	Inativação	Inativação
	Splicing	Não descrito	Nenhum defeito de splicing previsto	Nenhum defeito de splicing previsto
	Sift	Não descrito	Prejudicial	Prejudicial
	Acesso	UMD_3693	UMD_4926	UMD_4936
IARC TP53 Database	Hotspot do câncer	Não	Sim	Sim
	Origem da Mutação	Somática	Somática	Germinativa / somática

	Alteração em Isoformas	Todas	Todas	Todas
	Sift	Não descrito	Prejudicial	Prejudicial
	Função estrutural	Não descrito	Não funcional	Não funcional
	Função residual	Parcialmente exposto	Escondido	Escondido
	<i>Splicing</i>	Alteração não significativa	Sítio de Quebra / Alteração não significativa	Sítio de Quebra / Novo sítio alteração não significativa
	Sítio CpG	Não	Não	Não
	Sítio de <i>Splicing</i>	Não	Não	Não

10. ANEXOS

ANEXO 1 - CRITÉRIOS CNN PARA TESTES GENÉTICOS

CRITÉRIOS DE TESTE PARA GENES DE SUSCETIBILIDADE DE MAMA DE ALTA PENETRÂNCIA E / OU CÂNCER DE OVÁRIO

(Pode incluir BRCA1, BRCA2, CDH1, PALB2, PTEN e TP53, entre outros)

O teste é clinicamente indicado nos seguintes cenários:

1. Indivíduos com qualquer parente de sangue com uma variante patogênica/provável patogênica conhecida em um gene de susceptibilidade ao câncer;
2. Indivíduos que atendem aos critérios abaixo, mas tiveram resultados negativos com testes anteriores limitados (por exemplo, análise de duplicação de exclusão de gene único e/ou ausência) interessados em realizar o teste de múltiplos genes;
3. História pessoal de câncer:
 - Câncer de mama com pelo menos um dos seguintes critérios:
 - Diagnosticado com idade ≤ 45 anos; ou
 - Diagnosticado aos 46-50 anos com:
 - História familiar desconhecida ou limitada; ou
 - Um segundo câncer de mama diagnosticado em qualquer idade; ou
 - ≥ 1 parentes de sangue próximos com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata em qualquer idade;
 - Diagnosticado na idade ≤ 60 anos com câncer de mama triplo-negativo;
 - Diagnosticado em qualquer idade com:
 - Ascendência judaica Ashkenazi; ou
 - ≥ 1 parente de sangue próximo com câncer de mama com idade ≤ 50 anos ou câncer de próstata de ovário, pancreático, metastático, intraductal / cribriforme ou de alto ou muito alto risco (consulte as Diretrizes da NCCN para câncer de próstata) em qualquer idade; ou
 - ≥ 3 diagnósticos totais de câncer de mama em paciente e / ou parentes de sangue próximos
 - Diagnosticado em qualquer idade com câncer de mama masculino
 - Câncer epitelial de ovário (incluindo câncer de trompas ou câncer peritoneal) em qualquer idade
 - Câncer pancreático exócrino em qualquer idade
 - Câncer de próstata em qualquer idade com:
 - Metastático, histologia g intraductal / cribriforme ou grupo de alto ou muito alto risco (consulte as Diretrizes da NCCN para câncer de próstata)
 - Qualquer grupo de risco NCCN (consulte as Diretrizes da NCCN para câncer de próstata) com o seguinte histórico familiar:
 - Ascendência judaica Ashkenazi; ou

- ≥ 1 parente próximo com câncer de mama na idade ≤ 50 anos ou câncer de próstata ovariano, pancreático, metastático ou intraductal / cribriforme em qualquer idade; ou
- ≥ 2 parentes próximos com câncer de mama ou de próstata (qualquer grau) em qualquer idade

- Uma mutação identificada no teste genômico do tumor que tem implicações clínicas se também identificada na linha germinativa
- Indivíduo que atende aos critérios de teste de síndrome de Li-Fraumeni (LFS) ou critérios de teste de síndrome de Cowden / síndrome de tumor hamartoma PTEN;
- Para ajudar na tomada de decisão de terapia sistêmica, como para câncer de mama metastático HER2-negativo

4. História familiar de câncer

- Um indivíduo afetado ou não afetado com um parente de primeiro ou segundo grau que atende a qualquer um dos critérios listados acima (exceto indivíduos que atendem aos critérios apenas para tomada de decisão de terapia sistêmica).
 - Se o parente afetado tiver câncer de pâncreas ou câncer de próstata (metastático, intraductal / cribriforme ou Diretrizes da NCCN para câncer de próstata - grupo de alto ou muito alto risco), apenas os parentes de primeiro grau devem receber o teste, a menos que indicado para outros parentes com base na história familiar adicional.
- Um indivíduo afetado ou não afetado que de outra forma não atende aos critérios acima, mas tem uma probabilidade $> 5\%$ de uma variante patogênica BRCA1/2 com base em modelos de probabilidade anteriores (por exemplo, Tyrer-Cuzick, BRCAPro, CanRisk)

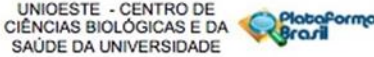
O teste pode ser considerado nos seguintes cenários (com educação pré-teste apropriada e acesso ao gerenciamento pós-teste):

1. Vários cânceres de mama primários, diagnosticados pela primeira vez entre as idades de 50 e 65 anos
2. Um indivíduo judeu Ashkenazi
3. Um indivíduo afetado ou não afetado que de outra forma não atende a nenhum dos critérios acima, mas com uma probabilidade de 2,5% a 5% de variante patogênica BRCA1 / 2 com base em modelos de probabilidade anteriores (por exemplo, Tyrer-Cuzick, BRCAPro, CanRisk).

Há uma probabilidade baixa ($< 2,5\%$) de que o teste terá resultados de utilidade clínica documentada nos seguintes cenários:

1. Mulheres diagnosticadas com câncer de mama com idade > 65 anos, sem nenhum parente próximo com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata
2. Homens com diagnóstico de câncer de próstata localizado com Gleason Score < 7 e nenhum parente próximo com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata.

ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABELECIMENTO DO PERFIL DE ADOECIMENTO ONCOLÓGICO DA POPULAÇÃO DE MISSAL/PR

Pesquisador: Maria Leandra Tenendo

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 79421517.9.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.756.891

Apresentação do Projeto:
Representação

Objetivo da Pesquisa:
Representação

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Representação

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Representação

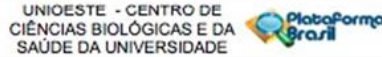
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Representação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Atendeu às solicitações anteriores

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Endereço: UNIVERSITÁRIA Bairro: UNIVERSITÁRIO UF: PR Município: CASCAVEL Telefone: (45)3220-3272 CEP: 85.819-110 E-mail: oco.ppg@unioeste.br				

Página 01 de 03



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Continuação do Parecer: 2.756.891

Informações Básicas do Projeto	Arquivo	Data	Assinatura	Situação
Outros	TLIC_cranica.pdf	11/01/2018 11:33:21	Maria Leandra Tenendo	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Avaliação	TLIC.pdf	11/01/2018 11:28:42	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Cadastro_digital_individual.jpeg	23/10/2017 21:46:32	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Cadastro_digital_domicilio.jpeg	23/10/2017 21:46:08	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Questionario_frequencia_alimentar.pdf	23/10/2017 21:44:42	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	WHOQOL.pdf	23/10/2017 21:43:49	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Escala_HAD.pdf	23/10/2017 21:43:34	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Atencao_primaria.pdf	23/10/2017 21:43:02	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Roteiro_entrevista_Anamnese.pdf	23/10/2017 21:40:49	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Outros	Uso_dados.pdf	23/10/2017 21:36:31	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Declaração_pesquisadores.pdf	23/10/2017 21:36:01	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Declaração do Patrocinador	Convenio.pdf	23/10/2017 09:41:51	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	23/10/2017 09:41:02	Maria Leandra Tenendo	Acerto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_.pdf	23/10/2017 09:38:48	Maria Leandra Tenendo	Acerto

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: UNIVERSITÁRIA
Bairro: UNIVERSITÁRIO
UF: PR **Município:** CASCAVEL
Telefone: (45)3220-3272

CEP: 85.819-110
E-mail: oco.ppg@unioeste.br

Página 02 de 03

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REALIZAÇÃO DE TESTE GENÉTICO**TÍTULO DO PROJETO:** Estabelecimento do Perfil de Adoecimento Oncológico da População de Missal

Este projeto pretende identificar mutações (alterações) gênicas em pacientes e em seus familiares com suspeita da Síndrome Hereditária de Câncer, residentes em Missal e assistidos pelo Sistema Único de Saúde.

Para participar da pesquisa, será realizada a retirada de 10 ml de sangue por uma punção de uma veia do braço. O local da punção pode apresentar leve dor ou inchaço que regredem espontaneamente. No laboratório de pesquisa em Ciências Médicas da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, o sangue será utilizado para extração de DNA e análises celulares e de genes relacionados ao câncer hereditário que forem prevalentes na população de Missal. O material ficará estocado em freezer por tempo indeterminado e não será disponibilizado para outras pesquisas sem sua prévia autorização.

A sua identidade e as informações obtidas durante a pesquisa serão confidenciais e somente membros da equipe terão acesso durante o processo, entretanto, você não é obrigado a continuar participando do projeto e pode a qualquer momento pedir para que os seus dados não façam parte da pesquisa. Também poderá requisitar, particularmente, seus dados referentes à análise do seu DNA e orientação adicional, fornecidas pelo pesquisador. Ademais, não haverá qualquer custo por você estar participando deste trabalho, portanto não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação.

Assim, declaro que fui esclarecido:

- Sobre as características da Síndrome Hereditária do Câncer;
- Sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios, limitações do teste genético, resultados do exame ao qual serei submetido, por profissional habilitado;
- Sobre a minha liberdade em retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao acompanhamento médico e continuidade do meu tratamento;
- Sobre o não recebimento de nenhum tipo de remuneração financeira;
- Sobre a segurança de que minha identidade será preservada, que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais e que o DNA do meu sangue armazenado no laboratório será utilizado apenas para este projeto;

Concordo em participar deste estudo.

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente: _____

Local de Nascimento: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Fone para contato: (45) 3529-2761