

**ANÁLISE DOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR E
GENES DE REPARO EM TUMORES DE PACIENTES
COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO PARA A SÍNDROME DE
LI-FRAUMENI E LI-FRAUMENI *LIKE***

JULIANA PIRES BADKE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Isabel Alves de Souza
Waddington Achatz**

Co-Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Badke, Juliana Pires

Análise dos genes supressores de tumor e genes de reparo em tumores de pacientes com diagnóstico clínico para a Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like* / Juliana Pires Badke – São Paulo, 2012.

125p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz

Descritores: 1. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI. 2. GENES SUPRESSORES DE TUMOR. 3. REPARO DE ERRO DE PAREAMENTO DE DNA. 4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

DEDICATÓRIA

A todos que direta ou indiretamente
contribuíram para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, Cristina e Roberto, pelo apoio incondicional durante essa fase da minha vida, por me incentivarem e por estarem sempre disponíveis a me ouvir e me ajudar nos momentos em que eu mais precisei. Sem o suporte de vocês eu não teria conseguido.

À minha irmã, Patrícia, pelas conversas bem-humoradas e por ter me feito ver os problemas de maneira mais leve.

Ao meu namorado, Cássio, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me, dando apoio, amor e por ser, além de tudo, meu melhor amigo.

À minha avó, Maria Lúcia, por te me acolhido com todo amor e carinho na sua casa durante boa parte dessa caminhada.

Ao meu tio Oscar pelas ajudas na área de informática e por ser minha inspiração e meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dr^a Maria Isabel Waddington Achatz, pela oportunidade, apoio e crescimento adquirido nestes dois anos.

Ao meu co-orientador, Dr Rafael Malagoli Rocha, pelo incentivo, paciência e por estar sempre disponível a me ajudar em todos os momentos em que eu precisei.

A toda minha família, que, mesmo de longe, sempre me apoiou e incentivou nestes dois anos.

Às minhas amigas do Departamento de Oncogenética, Andréia Veloso, Amanda Nóbrega, Christina Tarabay, Elisabeth Callegaro, Karina Santiago, Marina Cannavan e Sônia Nogueira, que sempre me apoiaram e torceram por mim. A amizade de vocês fez todos os momentos difíceis valerem a pena.

Às médicas do Departamento de Oncogenética, Simône Noronha, Rima Jbili e Maria Nirvana Formiga, pela atenção e ajuda.

Às duas novas integrantes do Departamento de Oncogenética Fernanda Fortes e Lisley Mambeli, que, apesar de chegarem quase no fim desta etapa, se fizeram presentes e me apoiaram sempre.

À Dr^a Erika Maria Monteiro Santos pelo apoio, amizade e por me ajudar a ver meus problemas de forma mais leve.

Ao Dr. Pierre Hainaut pela paciência, sugestões e por sua disponibilidade em me ajudar.

À médica patologista do Departamento de Anatomia Patológica Louise de Brot pela revisão dos tumores selecionados, ajuda na análise das minhas amostras, paciência e pela disponibilidade de me ensinar.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia Patológica, Ivan, Carlinhos, Severino e Fátima pela disposição e por me ensinarem todas as técnicas necessárias para realização deste projeto.

Aos amigos do Departamento de Anatomia Patológica Renata Fraga, Beatriz Maia, Beatriz Nunes, André Lavorato e Rodrigo Crespo pelas

conversas, momentos de diversão e por me acompanharem durante boa parte dos meus experimentos.

Aos amigos da Pós Graduação, Ribamar, Roberto, Márcia, Giovana, Silvana e Letícia pelas conversas paralelas.

Aos funcionários do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica pela ajuda na coleta dos blocos de parafina.

Aos membros da banca de qualificação pelas sugestões e críticas construtivas.

À Pós Graduação, em especial à Vanuza e à Luciana pela paciência e disponibilidade em ajudar os alunos.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa pela revisão do projeto.

A toda equipe da Biblioteca, em especial ao Jefferson, pelas conversas bem humoradas.

À Suely Francisco, pela ajuda e paciência na revisão deste projeto.

Ao SAME, pela simpatia e atenção durante a revisão dos prontuários.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

Badke JP. **Análise dos genes supressores de tumor e genes de reparo em tumores de pacientes com diagnóstico clínico para a síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) de alta penetrância. Predispõe indivíduos afetados ao alto risco para o desenvolvimento de câncer em idade precoce. Mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53* são responsáveis por 70% dos casos da LFS clássica e 22% da sua variante Li-Fraumeni *like* (LFL). Portadores de mutações germinativas do gene *TP53* podem apresentar um fenótipo de perda de função que pode ter um impacto nos padrões de alterações somáticas que fundamentam a tumorigênese nestes pacientes. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de alterações gênicas e cromossômicas nos genes *TP53* e *PTEN*, e proteicas nos genes supressores de tumor *TP53*, *TP63*, *TP73*, *RB1*, *PTEN*, *P21*, *CDKN2A*, *BRCA1* e nos genes de reparo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* em tumores de pacientes previamente diagnosticados com a síndrome de Li-Fraumeni do Hospital A. C. Camargo. Os resultados mais relevantes deste estudo foram as polissomias, amplificações e deleções encontradas na análise do FISH para os genes *PTEN* e *TP53*. Estas alterações cromossômicas podem ter ocorrido devido a alguma alteração adicional em um gene *upstream* do *TP53* e do *PTEN*. A melhor compreensão destes resultados possibilitará a definição dos mecanismos envolvidos na tumorigênese em portadores de mutações germinativas no gene *TP53*.

SUMMARY

Badke JP. **[Tumor suppressor genes and repair genes analyses in tumors from patients clinically diagnosed for the Li-Fraumeni syndrome and its variant Li-Fraumeni like]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The Li-Fraumeni syndrome (LFS) is an autosomal dominant hereditary predisposition to cancer syndrome (HPCS). It predisposes the affected individuals to a high risk of developing cancer at young age. Germline mutations in the *TP53* tumor suppressor gene are responsible for 70% among all cases from the classic LFS and 22% of the cases from its variant Li-Fraumeni like (LFL). Germline mutation carriers in the *TP53* gene can develop a loss of function phenotype that may have an impact on somatic alterations that lead to tumorigenesis in these patients. The aim of this study was to investigate genetic and chromosomal alterations in *PTEN* and *TP53* genes, and also protein alterations in the tumor suppressor genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *RB1*, *PTEN*, *P21*, *CDKN2A*, *BRCA1* and in the repair genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* on tumors from patients clinically diagnosed for LFS/LFL at Hospital A. C. Camargo. The most striking results of this study were the polysomies, amplifications and deletions found on *PTEN* and *TP53* gene FISH analysis. These chromosomal alterations may have occurred due to additional alterations that may have occurred in a gene located upstream from *TP53* and *PTEN*. A better comprehension of these results will enable the definition of the mechanisms involved in the carcinogenesis of *TP53* germline mutation carriers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia ilustrativa da análise do FISH para o gene <i>PTEN</i>	44
Figura 2	Fotomicrografia ilustrativa da análise do FISH para o gene <i>TP53</i>	47
Figura 3	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p53.....	49
Figura 4	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p63.....	51
Figura 5	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p73.....	53
Figura 6	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pten.....	55
Figura 7	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p21.....	58
Figura 8	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína brca1.....	60
Figura 9	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p14Arf.....	62
Figura 10	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p16Ink4a.....	64

Figura 11	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pRb1.....	67
Figura 12	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína mlh1.....	69
Figura 13	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína msh2.....	72
Figura 14	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína msh6.....	74
Figura 15	Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pms2.....	76
Figura 16	Via de sinalização da proteína p53.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de mutações encontrada nos tumores LFS/LFL selecionados para o estudo.....	41
Tabela 2	Análise gênica e cromossômica no FISH de <i>PTEN</i>	45
Tabela 3	Análise gênica e cromossômica no FISH de <i>TP53</i>	48
Tabela 4	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p53.....	50
Tabela 5	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p63.....	52
Tabela 6	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p73.....	54
Tabela 7	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pten.....	56
Tabela 8	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p21.....	59
Tabela 9	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína brca1.....	61
Tabela 10	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p14Arf.....	63
Tabela 11	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p16Ink4a.....	65
Tabela 12	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pRb.....	68
Tabela 13	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína mlh1.....	70
Tabela 14	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína msh2.....	71
Tabela 15	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína msh6.....	73

Tabela 16	Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pms2.....	77
------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes.....	8
Quadro 2	Diluição, anticorpos e métodos de recuperação antigênica utilizados nos marcadores, cuja detecção foi realizada de forma manual.....	34
Quadro 3	Diluições padronizadas, marca e sítio de detecção dos anticorpos do estudo detectados de forma automatizada.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Carcinoma adrenocortical
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDK4/6	Quinase dependente de ciclina 4/6
CEC	Carcinoma epidermóide
CKI	Inibidor dos complexos cicilina/ciclina quinase dependentes
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> ou hibridação genômica comparativa
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipose
HRP	Sistema de revelação por polímeros
IHQ	Imunoistoquímica
Kb	Quilobase
KD	Quilodalton
L	Litros
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i> ou perda de heterozigose
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
mL	Mililitro
Mm	Micrômetro
Mmol	Milimolar
MMR	<i>Mismatch repair</i> ou reparo do mau-pareamento
MSI	<i>Microsatellite instability</i> ou instabilidade microssatélite
MTS1	<i>Multiple tumor supressor 1</i> ou supressor de tumor múltiplo 1
NaCl	Cloreto de sódio

NH₄OH	Água amoniacal
OD	Domínio de oligomerização
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
SAM	Sítio alfa éster
SBLA	<i>Sarcoma, breast, leukemia and adrenocortical tumor syndrome</i> ou Síndrome dos tumores adrenocorticais, mama, leucemia e sarcoma.
SKY	<i>Spectral karyotyping</i> ou cariótipo espectral
SNC	Sistema nervoso central
SO	Osteossarcoma
SPHC	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer
SPM	Sarcoma de partes moles
SSC	Tampão citrato
TA	Domínio de transativação
TI	Domínio inibitório
TMA	<i>Tissue microarray</i> ou microarranjo de tecido

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Incidência do câncer no Brasil.....	1
1.2	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer.....	2
1.3	A síndrome de Li-Fraumeni	4
1.3.1	Quadro clínico	5
1.3.2	Diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni.....	6
1.4	Fatores envolvidos da etiologia da LFS.....	9
1.5	Genes supressores de tumor	10
1.5.1	O gene <i>TP53</i>	11
1.5.2	O gene <i>TP63</i>	13
1.5.3	O gene <i>TP73</i>	14
1.5.4	O gene <i>PTEN</i>	16
1.5.5	O gene <i>P21</i>	17
1.5.6	O gene <i>BRCA1</i>	18
1.5.7	O gene <i>CDKN2A</i>	19
1.5.8	O gene <i>RB1</i>	20
1.6	Genes de reparo.....	21
1.6.1	O gene <i>MLH1</i>	22
1.6.2	O gene <i>MSH2</i>	23
1.6.3	O gene <i>MSH6</i>	25
1.6.4	O gene <i>PMS2</i>	26
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos.....	30

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Seleção de amostras	32
4.2	Análise de tumores de pacientes LFS/LFL por imunoistoquímica	33
4.2.1	Técnica de imunoistoquímica.....	33
4.2.2	Variáveis de análise.....	35
4.3	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	36
4.4	Análise estatística.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Dados clínicos	39
5.1.1	Tumores provenientes de portadores de mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	39
5.1.2	Tumores provenientes de portadores sem a detecção de mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	41
5.2	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	43
5.2.1	Análise gênica e cromossômica do gene <i>PTEN</i>	43
5.2.2	Análise gênica e cromossômica do gene <i>TP53</i>	46
5.3	Imunoistoquímica (IHQ).....	48
5.3.1	Expressão proteica da proteína p53.....	48
5.3.2	Expressão proteica da proteína p63.....	51
5.3.3	Expressão proteica da proteína p73.....	52
5.3.4	Expressão proteica da proteína pten.....	54
5.3.5	Expressão proteica da proteína p21	57
5.3.6	Expressão proteica da proteína brca1	59
5.3.7	Expressão proteica da proteína p14Arf	61
5.3.8	Expressão proteica da proteína p16Ink4a	63
5.3.9	Expressão proteica da proteína pRb	66
5.3.10	Expressão proteica da proteína mlh1	68
5.3.11	Expressão proteica da proteína msh2	70
5.3.12	Expressão proteica da proteína msh6	72
5.3.13	Expressão proteica da proteína pms2	75

6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	108
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

Anexo 2 Quadro dos resultados obtidos

1 INTRODUÇÃO

1.1 INCIDÊNCIA DO CÂNCER NO BRASIL

O câncer é um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, como o Brasil (Ministério da Saúde 2011). Desde 2003, as neoplasias malignas são a segunda causa de morte na população brasileira, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Estimativas recentes mostram que nos anos de 2010 e 2111 deverão ocorrer 489.270 casos novos de câncer. Destes, são esperados 236.240 para o sexo masculino e 253.030 o para sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (Ministério da Saúde 2009). A maior parte dos tumores apresenta anormalidades em vias genéticas comuns, além de mutações somáticas em genes específicos (TABORI et al. 2007).

1.2 SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER

As síndromes genéticas hereditárias constituem um grupo de patologias muito importante, não somente por sua alta incidência (1% da população nasce com alguma anomalia genética), mas também devido ao grande número de anomalias que elas produzem. Do ponto de vista clínico, elas comprometem a qualidade de vida dos afetados, podendo causar grave incapacidade intelectual ou física. Estas enfermidades também podem possuir um caráter progressivo e levar à morte precoce do indivíduo afetado (GONZALES-LAMUÑO e FUENTES 2008).

Os pacientes portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) variam entre 5% a 10% dos pacientes com malignidade. Desta forma é importante identificar estes pacientes, pois eles necessitam de cuidados em longo prazo (RAHNER e STEINKE 2008). O agrupamento familiar de certos tipos de câncer foi formalmente descrito no século XIX pelo cirurgião francês Paul Broca, que percebeu quatro gerações afetadas na família de sua mulher com câncer de mama e gastrointestinal (EMERY et al. 2009).

A maioria dos cânceres hereditários está associada a uma ou mais mutações germinativas, que consequentemente estão presentes em todas as células do indivíduo afetado (DARBARY et al. 2009). Portanto, um dos alelos para o desenvolvimento do câncer está presente em todas as células destes indivíduos. Em muitos casos, uma mutação germinativa não é

condição suficiente para iniciar a tumorigênese. É necessária a presença de uma segunda mutação somática para iniciar a progressão tumoral. Em cânceres não hereditários também são necessários dois eventos (duas mutações somáticas) para que ocorra o desenvolvimento de tumores. Esta hipótese foi denominada hipótese do segundo evento (*second hit*). Conforme esta hipótese, indivíduos portadores de mutações germinativas só necessitam de mais um evento para que a tumorigênese seja iniciada, enquanto que indivíduos com o genótipo selvagem exigem duas mutações somáticas a fim de que ocorra a progressão tumoral (KNUDSON 2001).

Assim, o que difere uma síndrome familiar de um câncer esporádico é que nas síndromes familiares, somente um evento adicional é necessário para gerar instabilidade genômica e propiciar o desenvolvimento tumoral, enquanto que no câncer esporádico dois eventos são necessários para eliminar a funcionalidade de ambos os alelos (DARBARY et al. 2009). Entretanto, alguns tumores podem ocorrer frente à presença de genes expressados de forma inadequada, necessitando de somente uma alteração para que haja o desenvolvimento tumoral. Essa mutação é denominada de mutação dominante negativa, ou mutação de um evento único, pois o câncer se desenvolve a partir da alteração em apenas um alelo (KNUDSON 2001).

A maioria das SPHC tem herança autossômica dominante e, assim, parentes de primeiro grau de um paciente diagnosticado com uma destas síndromes possuem um risco de 50% de serem portadores da mutação causadora da doença. Cada síndrome hereditária possui um espectro

característico de tumores e genes específicos responsáveis por causá-las (RAHNER e STEINKE 2008).

Os tumores ocorrem a partir da predisposição herdada originada por mutações germinativas que aumentam o risco de câncer (ACHATZ 2008). Alguns destes tumores podem ser desenvolvidos em idade jovem (RAHNER e STEINKE 2008; DARBARY et al. 2009; EMERY et al. 2009). Por isso, a identificação de um indivíduo afetado por câncer hereditário é essencial para que este e seus familiares em risco sejam incluídos em programas de redução de risco e/ou prevenção do câncer (ACHATZ 2008).

Como regra geral, o histórico significativo de câncer familiar é caracterizado por uma ou mais das seguintes características: vários parentes próximos do mesmo lado da família com o mesmo tipo de câncer ou com tipos relacionados, câncer ocorrendo em idade jovem, ou um indivíduo com dois ou mais cânceres primários (EMERY et al. 2009).

1.3 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome genética de predisposição hereditária ao câncer transmitida de forma autossômica dominante. Predispõe indivíduos afetados ao surgimento de múltiplas neoplasias com início precoce. (MALKIN et al. 1990).

A LFS possui alta penetrância. Pacientes portadores da LFS apresentam um risco de 50% de desenvolverem um tumor antes dos 40 anos de idade, comparados a 1% na população geral. Além disso, 90% dos

portadores podem desenvolver câncer até os 60 anos. Pacientes destas famílias que sobrevivem à primeira neoplasia estão propensos a desenvolver uma segunda (ACHATZ e HAINAUT 2005).

Os fatores responsáveis pelo elevado risco de câncer em pacientes com a LFS são mutações germinativas no gene supressor de tumor *TP53*, (MALKIN et al.1990). Este gene predispõe portadores ao risco elevado para o desenvolvimento de tumores malignos na infância e em adultos jovens. Setenta e cinco por cento dos pacientes com a LFS carregam uma mutação germinativa em um dos alelos do gene *TP53* (LI et al. 2008).

1.3.1 Quadro Clínico

Em 1969, Li e Fraumeni descreveram quatro famílias com um padrão autossômico dominante de sarcomas de partes moles, câncer de mama e outras neoplasias em crianças e adultos jovens (LI et al. 1988). A LFS foi inicialmente denominada SBLA (do inglês *sarcoma, breast, leukemia and adrenocortical tumor syndrome*). A caracterização preliminar do espectro tumoral da síndrome foi realizada a partir de critérios que incluíam um indivíduo portador de sarcoma em idade jovem, além de dois familiares de primeiro e/ou segundo grau portadores de osteossarcoma (SO), sarcomas de partes moles (SPM), câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, cânceres do sistema nervoso central (SNC), carcinomas adrenocorticais (ADR) e leucemias agudas (LYNCH e GUIRGIS 1979).

Posteriormente, esta síndrome foi caracterizada pela presença familiar de SPM, SO, cânceres de mama desenvolvidos antes dos 45 anos

de idade, SNC, ADR e leucemia (LI et al. 1988). Também foi descrita a ocorrência de um espectro tumoral mais amplo incluindo cânceres de pulmão, próstata, estômago cólon, pâncreas, além de tumores de células germinativas e melanoma (HARTLEY et al. 1989). Tumores de células germinativas, papilomas do plexo coróide e tumor de Wilms' também foram descritos em portadores da síndrome (HARTLEY et al. 1993).

1.3.2 Diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni

O diagnóstico inicial da LFS é clínico, baseado no relato do paciente sobre casos de câncer na família. Os critérios para a determinação do diagnóstico clínico são o clássico LFS: um probando com sarcoma identificado antes dos 45 anos de idade, além de um parente de primeiro grau com qualquer tipo de câncer antes dos 45 anos de idade e mais um caso na família, com um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer abaixo dos 45 anos de idade ou diagnosticados com sarcoma em qualquer idade (LI et al. 1988).

Um grande número de famílias apresenta um padrão tumoral que se assemelha à LFS, porém não correspondem ao critério clássico e são denominadas Li-Fraumeni Like (LFL) (ACHATZ e HAINAUT 2005). Várias definições para a LFL foram propostas visando definir o diagnóstico clínico das famílias que não apresentam a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome, mas que apresentavam tumores típicos em idade precoce (BIRCH et al. 1994). A definição proposta por BIRCH et al. em 1994 postula que, para pertencer a LFL, o probando deve ter sido diagnosticado com

qualquer câncer na infância ou sarcoma, tumor cerebral ou ADR diagnosticados antes dos 45 anos de idade, possuir parente de primeiro ou segundo grau com câncer LFS típico em qualquer idade e possuir parente de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer abaixo dos 60 anos de idade. Posteriormente, EELES (1995) e FREBOURG et al. (2001) propuseram a inclusão de critérios mais abrangentes para a variante LFL, incluindo famílias nas quais eram detectados pelo menos dois tumores típicos do espectro da síndrome ou pacientes com múltiplos tumores independentemente da história familiar.

Recentemente, o critério de Chompret foi revisto, sendo definido o critério de Chompret modificado (BOUGEARD et al. 2008). Os pesquisadores revisaram os critérios iniciais propostos pelo grupo, incluindo tumores de mama em mulheres antes dos 36 anos na ausência de mutações nos genes BRCA 1 e 2 (Quadro 1).

Para confirmar o diagnóstico clínico de LFS/LFL, é necessária a realização do teste genético para buscar a mutação germinativa no gene *TP53*. Em 75% das famílias LFS, a mutação nesse gene pôde ser detectada (VARLEY 2003; LI et al. 2008). Como 25% das famílias LFS não apresentam alterações no gene *TP53*, acredita-se que existam outros genes responsáveis pela tumorigênese na LFS (RUIJS et al. 2009).

Quadro 1 - Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni.

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 • Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos OU • 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

1.4 FATORES ENVOLVIDOS DA ETIOLOGIA DA LFS/LFL

Mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53* estão associadas à LFS/LFL (MALKIN et al. 1990). Estas mutações são responsáveis por 70% dos casos da LFS clássica e 22% da sua variante Li-Fraumeni like (LFL) (VARLEY et al. 1997). Dados recentes mostram que 29% das famílias LFL Chompret têm mutações germinativas no gene *TP53* (BOUGEARD et al. 2008) Na população brasileira, há a prevalência de uma mutação específica relacionada com esta síndrome, a mutação R337H, na qual ocorre uma transição de G para A na segunda base do códon 337. Essa mutação confere uma perda de função à proteína p53 (ACHATZ et al. 2007). Até o momento, nenhum outro gene foi confirmado como responsável pela síndrome de LFS/LFL. RUIJS et al. (2009) demonstraram que o gene *CHEK2* está envolvido na progressão tumoral de diversos pacientes, porém este gene não é um dos principais envolvidos na susceptibilidade ao câncer em pacientes portadores da LFS/LFL sem mutação em *TP53*.

Acredita-se que outros fatores estejam envolvidos na etiologia da síndrome. Mutações em outros genes supressores de tumor, além das mutações reconhecidas no gene supressor de tumor *TP53*, podem estar envolvidas (MALKIN 2011).

Genes de reparo, que possuem um papel importante na manutenção do genoma, estão envolvidos na progressão tumoral e na tumorigênese quando mutados. Os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* são classificados como genes de reparo responsáveis pelo pareamento adequado do DNA ou

MMR (mismatch repair). Mutações germinativas nestes genes foram consideradas como a principal alteração molecular causadora da Síndrome de Lynch ou Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC), na qual portadores têm alto risco para desenvolvimento de câncer colorretal e câncer de endométrio (JACOB e PRAZ 2002).

Tumores de pacientes previamente diagnosticados com a síndrome de Li-Fraumeni são importantes fontes para o estudo de tais alterações. Genes que apresentarem uma expressão proteica alterada nestes tumores podem posteriormente ser seqüenciados para verificar a ocorrência de mutação somática ou mesmo a perda de heterozigose, o que correlacionaria o gene mutado a LFS/LFL. Através da análise das alterações nesses genes, poderemos compreender melhor quais outros fatores, além de *TP53*, estão envolvidos na origem de tumores característicos dessa síndrome.

1.5 GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Os genes supressores de tumor são necessários para manutenção do genoma. Quando funcionam de maneira correta, esses genes atuam como freios do ciclo celular, da replicação do DNA e da mitose (VOGELSTEIN et al. 2000). Pertencem a um pequeno grupo de genes que controla a maior parte das vias relacionadas com a tumorigênese e são considerados pontos centrais dos mecanismos envolvidos no câncer. Frequentemente, são encontrados mutados nos diversos tipos de cânceres humanos (LANE 1992).

1.5.1 O gene *TP53*

O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17, na posição 17p13.1. Codifica a proteína p53, que é uma fosfoproteína nuclear de massa molecular de 53 kD, composta por 393 aminoácidos. Seu papel fundamental reside na regulação do ciclo celular, principalmente na transição de G0 para G1. Essa proteína é encontrada em níveis muito baixos nas células normais, porém, em células danificadas, é expressa em grandes quantidades (FRIDMAN e LOWE 2003).

A proteína p53 apresenta uma região central hidrofóbica, codificada pelos éxons 5 a 8, flanqueados por regiões hidrofílicas: uma região N-terminal ácida e uma C-terminal básica. A região N-terminal contém dois domínios complementares de ativação da transcrição. A região central é constituída de um esqueleto de duas fitas em estrutura beta sustentando um grupo flexível de voltas e hélices estabilizadas pela ligação de um átomo de zinco. A porção C-terminal final tem múltiplas funções regulatórias e exerce controle negativo sobre atividades de ligação ao DNA sequências-específicas. A região C-terminal contém os principais sinais de localização nuclear e domínios de oligomerização. A forma ativa da proteína é um tetrâmero, formado a partir da união de dois dímeros fundamentais (ACHATZ 2008).

Por possuir um papel fundamental na regulação do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA, o gene *TP53* foi denominado “guardião do genoma” (LANE 1992). Sua sequência codificante é composta por cinco regiões e se mostrou altamente conservada em vertebrados. É composta por

dez éxons codificantes. O gene contém uma região 5' extremamente longa composta pelo éxon 1 não codificante e o íntron 1, que possui aproximadamente 10kb. A sequência codificante contém cinco domínios, cada um deles responsável por funções específicas (MAY e MAY 1999).

Aparentemente, as mutações no gene *TP53* são uma alteração importante no processo da tumorigênese. Mutações somáticas neste gene são frequentes em um grande número de cânceres humanos. As frequências variam de 10% a 60%, dependendo do tumor e do grupo populacional (OLIVIER et al. 2003).

As mutações mais frequentes no gene *TP53* ocorrem a partir da alteração na sequência das bases, resultando numa proteína defeituosa. No entanto, outras alterações tais como deleções e inserções também podem ser encontradas (VARLEY 2003). A proteína normal do *TP53* tem baixa concentração celular, com meia-vida de 20 minutos. Boa parte da proteína está sob forma latente, necessitando de mecanismos para sua ativação, como hipóxia e dano ao DNA (LEVINE 1997). Está expressa em quase todos os tecidos e, uma vez ativada, regula a expressão de muitas classes de genes através de sequências específicas de ligação com o DNA ou através de interações proteína-proteína. Sua regulação resulta em efeitos antiproliferativos permitindo a preservação da integridade genômica (CADWELL e ZAMBETTI 2001).

1.5.2 O gene *TP63*

O gene *TP63* é um gene supressor de tumores da família do gene *TP53*, localizado no cromossomo 3, na posição 3q28 (VILGELM et al. 2008). É composto por 15 éxons e dois promotores que originam isoformas proteicas com funções transcricionais diferentes (DUIJF et al. 2002). As proteínas transcritas por este gene possuem três domínios funcionais principais: domínio de transativação (TA), domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de oligomerização (OD). O promotor localizado na região upstream do éxon 1 gera uma classe de proteínas denominada isoforma TA-*p63*, que contém TA na porção N-terminal. Já o promotor alternativo, localizado no íntron 3, leva à expressão da isoforma Δ Np63, que não apresenta o domínio TA N-terminal. Apesar da ausência deste domínio, proteínas Δ Np63 podem atuar como reguladoras da transcrição através de diferentes TAs presentes nas distintas porções N-terminais e C-terminais. Em cada uma destas classes, eventos de *splicing* alternativo do domínio C-terminal conferem uma maior complexidade (MANGIULLI et al. 2009). Três variantes alfa (α), beta (β) e gamma (γ), que incorporam diferentes porções C-terminal, já foram descritas (YANG et al. 1998).

As proteínas α têm maior tamanho. Incluem todos os éxons terminais e contêm o sítio alfa éster (SAM) na porção C-terminal, seguido por um domínio inibitório (TI), que é capaz de autoinibir a atividade transcricional das isoformas da classe TA. A variante β não possui o éxon 13 e, conseqüentemente, os domínios SAM e TI. As isoformas γ não possuem os éxons C-terminais 11, 12, 13 e 14. No entanto, incorporam uma sequência

adicional de função desconhecida proveniente do íntron 10. Logo, o gene *TP63* expressa ao menos seis isoformas proteicas com um arranjo complexo de similaridades e diferenças em seus domínios estruturais e atividades transcricionais (MANGIULLI et al. 2009).

O gene *TP63* é altamente expresso no núcleo basal de diferentes células da pele, do colo do útero, da língua, do esôfago, das glândulas mamárias, da próstata e do epitélio urinário (YANG et al. 1998). Tem papel fundamental no desenvolvimento da epiderme e dos apêndices embrionários, além de possuir um importante papel no desenvolvimento dos tecidos derivados da ectoderme (KOSTER e ROOP 2008).

As mutações no gene *TP63* são documentadas em diferentes doenças humanas relacionadas ao desenvolvimento embrionário (KHOKHAR et al. 2008; MANGIULLI et al. 2009). Pouco se sabe sobre as especificidades fenotípicas observadas nas diversas classes mutacionais, mas acredita-se que cada uma dessas mutações cause uma perturbação no funcionamento normal das proteínas. Apesar das mutações em *TP63* serem raramente detectadas em cânceres humanos, vários estudos mostram que *TP63* está envolvido na progressão do câncer. A perda de *TP63* foi associada à progressão tumoral agressiva e a um prognóstico ruim (KHOKHAR et al. 2008).

1.5.3 O gene *TP73*

O gene *TP73*, assim como o gene *TP63*, é um supressor de tumores pertencente à família do gene *TP53*. Está localizado no cromossomo 1, na

posição 1q36.3 (ZAWACKA-PANKAU et al. 2010). O gene *TP73* tem alto grau de semelhança com *TP53*. Ambos possuem uma sequência de aminoácidos em comum no domínio de ligação ao DNA e desta forma devem ter funções redundantes na regulação da expressão gênica. A proteína p73 pode ativar genes regulados por *TP53*, bem como inibir o crescimento celular e induzir apoptose. O *TP73* é ativado por danos ao DNA através de diferentes mecanismos (ANSELMO et al. 2009).

O gene *TP73*, por meio de seus promotores e do *splicing* alternativo de seus éxons, é responsável pela transcrição de 17 proteínas diferentes (YU et al. 2007). A maioria dos *splicings* alternativos ocorrem na extremidade 3' e envolvem os éxons 10 a 13. As isoformas proteicas transcritas possuem diferentes estruturas C-terminais. Até o momento, as seguintes isoformas já foram descritas: α , β , γ , delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ), theta (θ), eta (η) e $\eta 1$. Porém, as funções específicas de cada uma dessas variantes ainda não foram descritas (STIEWE e PÜTZER 2002). Uma análise realizada por YANG et al. (2000) revelou um transcrito (ΔN -p73) que não possui o domínio de transativação N-terminal. Além disso, essa isoforma é derivada de um promotor alternativo (YANG et al. 2000).

Análises realizadas em células cancerígenas mostraram a presença de proteínas com a região N-terminal truncada. Essas são transcritas por variantes de *splice* com o éxon 2 ausente ou com ambos os éxons 2 e 3 ausentes. Entretanto, a contribuição desses transcritos para a tumorigênese ainda não está clara (STIEWE e PÜTZER 2002).

1.5.4 O gene *PTEN*

O gene *PTEN*, também conhecido por *MMAC1*, é um supressor tumoral localizado no cromossomo 10, na posição 10q23.3 (MYERS et al. 1997). O gene *PTEN* codifica um polipeptídeo de 403 aminoácidos, tendo em sua parte amino terminal um domínio fosfatase e outro domínio C2, que medeia a sinalização com as demais proteínas de membrana. Em sua parte carboxi-terminal, onde ocorre a maior parte das mutações ($\geq 43\%$), encontra-se uma sequência PEST responsável pela regulação da estabilidade proteica e um domínio PDZ (CHOW e BAKER 2006).

Mutações germinativas no gene *PTEN* foram descritas a partir da análise molecular da síndrome de Cowden, uma doença autossômica dominante, que tem como características clínicas múltiplos hamartomas, lesões mucocutâneas e predisposição ao desenvolvimento de câncer de mama, tireoide, endométrio e próstata (KWABI-ADDO et al. 2001).

PTEN regula negativamente a via PI3K/AKT. Altos níveis proteicos de *PTEN* levam a baixos níveis de Akt fosforilado, o que induz a célula à apoptose. Ao contrário, a inativação de *PTEN* leva ao aumento da atividade de Akt e, conseqüentemente, à sobrevivência celular (MYERS et al. 1997; DAHIA et al. 1999). O gene *PTEN* também pode afetar outras vias de sinalização, como as vias de adesão focal e a ativação da proteína quinase mitogenética (GU et al. 1998).

1.5.5 O gene *p21*

O gene *p21*, também chamado de *CDKN1A*, está localizado no cromossomo 6, na posição 6p21.22. O gene *p21* é inibidor dos complexos ciclina/ciclina quinase dependentes (CKI). Outros membros desta mesma família são os genes *p27* e *p57* (WALDMAN et al. 1995; GARTEL e TYNER 2002; GRAVINA et al. 2009). Essa família de CKIs contém uma região conservada na porção N-terminal, responsável pela inibição dos complexos ciclina/Cdk. A porção C-terminal é variável em tamanho e função. O *p21*, além do sítio que se liga aos complexos ciclina/Cdk, possui outro na porção C-terminal que se adere ao *PCNA*. Esse, por sua vez, possui um papel importante na replicação do DNA e nos diferentes tipos de reparo desta molécula. Através dessa interação direta com *PCNA*, o *p21* é capaz de bloquear a síntese de DNA polimerase δ (GARTEL e TYNER 2002).

A expressão de *p21* é regulada por mecanismos dependentes e independentes da família p53. O promotor de *p21* é composto por dois sítios conservados, que se ligam a p53. Ao menos uma dessas interações é necessária para a resposta de *TP53* após danos ao DNA (GARTEL e TYNER 2002; CHO et al. 2010). O gene *p21* é o principal mediador de *TP53* na regulação da transição do ciclo celular de G1 para S e de G2 para M (CHO et al. 2010).

Como consequência da exposição a certos fatores de stress, *p21* é altamente expresso. Essa elevada expressão leva à parada irreversível do crescimento celular nos estágios iniciais da diferenciação e envelhecimento

celular através de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais.

Alguns estudos sugerem que mutações em *p21* podem contribuir para a oncogênese (GRAVINA et al. 2009). Sua proteína pode ser considerada como antagonista ao câncer, uma vez que ela atua contra a proliferação celular. Porém, seu papel nos cânceres humanos é controverso, já que esse gene possui propriedades que evitam a apoptose de células normais e cancerígenas. Logo, *p21* age como supressor de tumores no organismo, mas também é considerado prejudicial durante a quimioterapia por evitar a apoptose (GARTEL e TYNER et al. 2002).

1.5.6 O gene *BRCA1*

O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17, na posição 17q21. É composto por 5500 pares de bases distribuídas em 22 éxons, que codificam uma proteína de 1863 aminoácidos (MIKI et al. 1994). Essa proteína é expressa em diferentes tecidos, principalmente durante as fases S e G2 do ciclo celular. Esse produto proteico está ligado a diversos processos envolvidos no reparo em resposta aos danos no DNA, dentre eles: reparo de quebra da dupla-fita através da recombinação homóloga e reparo de danos oxidativos. Além disso, estudos mostram que este produto proteico também está envolvido na manutenção da estabilidade cromossômica, possivelmente devido à sua função durante a recombinação. É mais provável que *BRCA1* participe como um sensor ou transdutor em vez de fator de reparo efetivo (CARVALHO et al. 2007).

Estudos recentes demonstraram que, além da sua função no reparo do DNA, o gene *BRCA1* possui um papel importante no desenvolvimento das mamas. Tais estudos revelaram que esse gene regula a diferenciação das células-tronco negativas para o receptor de estrógeno em células progenitoras luminais estrógeno-positivas (LIU et al. 2008; WICHA 2009). O tecido das mamas de pacientes com mutações em *BRCA1* é constituído por células progenitoras luminais expandidas, sugerindo que tal gene atua na regulação das células-tronco progenitoras das mamas. A perda de função de *BRCA1* pode resultar na expansão da população das células-tronco progenitoras mamárias, o que pode ser o início da futura tumorigênese (WICHA 2009).

A ocorrência de um alelo mutado do gene *BRCA1* é suficiente para predispor o paciente ao câncer. Porém, é necessária a perda do segundo alelo para que a tumorigênese ocorra. A maioria das mutações deletérias (cerca de 70%) leva à formação de uma proteína truncada, devido a uma terminação prematura na transcrição gênica. Essas mutações estão associadas ao aumento da susceptibilidade ao câncer (CARVALHO et al. 2007).

1.5.7 O gene *CDKN2A*

O gene *CDKN2A* está localizado no cromossomo 9, na posição 9p21.22, no locus MTS1 (do inglês *multiple tumor suppressor 1*), que codifica duas proteínas: p16 e p19, estruturalmente não relacionadas, mas ambas envolvidas na inibição do ciclo celular. O gene, em questão, é constituído de

três éxons (éxon 1 - constituído por 126 pares de bases; o exon 2 - constituído por 307 pares de bases e o éxon 3 - constituído por 11 pares de bases) e codifica uma proteína de 16 KD com atividade de inibidora da quinase dependente de ciclina 4/6 (CDK4/6). A proteína p16Ink4a se associa a CDK4/6, inibindo sua ação catalítica e impedindo a formação do complexo ciclina D-CDK4/6. O gene *CDKN2A* atua, portanto, como um regulador negativo do ciclo (BARTSCH et al. 1995; GARDIE et al. 1998).

Pesquisas demonstraram que o gene *CDKN2A* possui duas ORF (do inglês, *open reading frames*), o éxon 1 α e o éxon 1 β , que codificam 2 transcritos distintos. O éxon 1 α codifica para a proteína p16Ink4a enquanto o éxon 1 β codifica a proteína p19ARF, também denominada p14Arf em seres humanos (GARDIE et al. 1998). A proteína p14 se liga à *MDM2* na fase G1 do ciclo celular, atuando na degradação da proteína p53 via ubiquitina (CHIN et al. 1998).

Inativação e mutações no gene *CDKN2A* são observadas em diversos tipos de cânceres humanos, dentre eles, leucemias linfoides agudas de célula T (GARDIE et al. 1998), carcinomas renais (DIAKOUMIS et al. 1998) e melanomas esporádicos (BARTSCH et al. 1995).

1.5.8 O gene *RB1*

O gene *RB1*, o primeiro gene supressor de tumores descrito, está localizado no cromossomo 13, na posição 13q14.2. É o principal gene envolvido no tumor infantil retinoblastoma (KANBER et al. 2009). Codifica uma fosfoproteína (pRb) envolvida no controle do ciclo celular (BARBOSA et

al. 2009). A pRb hipofosforilada atua como um cofator transcrricional e, através do recrutamento de enzimas remodeladoras da cromatina, reprime a proliferação e as atividades transcripcionais de um grupo de fatores de transcrição do tipo E2F. A fosforilação promovida por CDKs resulta na ativação de promotores dependentes de E2F. Ademais, pRb possui um papel importante na manutenção da embriogênese e na sustentação de células-tronco trofoblásticas (KANBER et al. 2009).

As alterações genéticas mais frequentes resultantes da inativação de *RB1* envolvem rearranjos cromossômicos como deleções e translocações, trocas de nucleotídeos como substituições, deleções, inserções, duplicações, deleções de éxons, perda de heterozigozidade e hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene (BARBOSA et al. 2009). Tais mutações podem reduzir o nível da expressão proteica normal ou produzir uma proteína truncada inativada parcialmente (ABOUZEID et al. 2009). A junção desses eventos com outras alterações genéticas podem contribuir para a progressão tumoral (PARSAM et al. 2009).

1.6 GENES DE REPARO

Genes de reparo possuem um papel importante na manutenção do genoma. São responsáveis por restaurar os diversos danos ocorridos ao DNA. Altos níveis de danos no DNA somados a deficiências no reparo desta molécula podem levar ao surgimento de diversos tipos de câncer. Estudos

mostraram que mutações em tais genes contribuem para a elevação do risco de surgimento de inúmeras neoplasias (CONDE et al. 2009).

O reparo aos danos causados no DNA segue vias específicas comuns aos genes em estudo: reparo de quebra de dupla-fita, da excisão de nucleotídeos, do mau pareamento de bases ou reparo da excisão de bases. Grupos de proteínas específicas para cada uma dessas vias reconhecem esses danos, os reparam e induzem a parada do ciclo celular em pontos de checagem (ZHANG et al. 2009).

1.6.1 O gene *MLH1*

O gene *MLH1* está localizado no cromossomo 3, na posição 3p21.3 e é composto por 19 éxons de 57,36 kb (SILVA et al. 2009). Pertence ao grupo dos genes de reparo do mau pareamento (MMR, do inglês *mismatch repair*). Este grupo de genes está envolvido no reparo do DNA no estágio pós replicativo. Além corrigir o mau pareamento, genes MMR também retificam pequenas voltas que podem ocorrer no DNA durante a replicação. Eles são de suma importância para a manutenção da integridade genômica (ZHANG et al. 2009).

A proteína *mlh1* é uma proteína nuclear composta por 756 aminoácidos com peso molecular de 84,6 KD. É composta por um domínio ATPase e dois domínios de interação, um responsável pela ligação aos homólogos MutS (*MSH2*, *MSH3*, *MSH6*) e outro pela ligação a *PMS2*, *MLH3* e *PMS1*. *Mlh1* não possui atividade enzimática conhecida. Forma, também, um heterodímero com *PMS2* conhecido como MutL. Esse se liga às

heteroduplexes Muts α (composta *MSH2* e *MSH6*) ou MutS β (composta por *MSH2* e *MSH3*), que reconhecem as lesões ao DNA. O heterodímero formado por mlh1 é responsável por recrutar proteínas necessárias para o reparo do DNA (JACOB e PRAZ 2002; MEYER et al. 2009).

Mutações no gene *MLH1* estão correlacionadas com o aparecimento precoce de câncer colorretal, câncer de endométrio e câncer de ovário (MEYER et al. 2009). O ponto principal para o desenvolvimento de câncer colorretal é a instabilidade de microssatélites (MSI) em *MLH1*. A MSI foi observada em aproximadamente 15% dos cânceres de cólon esporádicos e acredita-se que esteja presente em todos os tumores colorretais de pacientes diagnosticados com a síndrome de Lynch (VILKIN et al. 2009). Alterações epigenéticas, eventualmente, ocorrem durante o desenvolvimento tumoral. A metilação da região promotora de *MLH1* é observada em um grande número de tumores (STEELE et al. 2009; VILKIN et al. 2009). Mutações de ponto e deleções em *MLH1* também podem ser identificadas (SAMOWITZ et al. 2008; MEYER et al. 2009).

1.6.2 O gene *MSH2*

O gene *MSH2* está localizado no cromossomo 2, na posição 2p21. É composto por 16 éxons, nos quais foram encontradas mutações consideradas patogênicas. Porém, é difícil prever precisamente as consequências de todas essas mutações. *MSH2*, assim como *MLH1*, pertence ao grupo de genes conhecido como MMR, que está envolvido no reparo do DNA devido ao mau pareamento (MITCHELL et al. 2002).

A proteína msh2 é considerada o fator central no mecanismo de reparo do mau pareamento do DNA (MANTHEY et al. 2009). Forma heterodímeros ao se ligar à msh6 ou msh3. Os complexos msh2-msh6 e msh2-msh3 são necessários para os processos de reparo do mau pareamento de pares de bases e de pequenas inserções/deleções (STUDAMIRE et al. 1999; MANTHEY et al. 2009). O complexo msh2-msh3 é responsável pela retirada de porções não homólogas do DNA durante o processo de recombinação genética (STUDAMIRE et al. 1999). No decorrer deste processo, msh2 atua tanto na estabilização de intermediários de DNA dupla-fita, facilitando a remoção de caudas não homólogas dessas moléculas, quanto no bloqueio de um mecanismo alternativo de remoção destas caudas não homólogas. Com isso, a proteína em análise contribui para reparar a instabilidade genômica que surge devido às várias quebras cromossômicas (MANTHEY et al. 2009).

Mutações germinativas neste gene estão associadas à síndrome de Lynch, a qual é uma síndrome autossômica dominante de susceptibilidade ao câncer de alta penetrância. Predis põe os indivíduos portadores de mutações a um risco elevado para o desenvolvimento de câncer colorretal e de endométrio, além de câncer de intestino, estômago, ovário, ureter e trato hepatobiliar em menores extensões. A maioria dessas malignidades está associada à instabilidade de microssatélites. Outras alterações incluem mutações nonsense, missense e SNPs (BUJALKOVA et al. 2008).

1.6.3 O gene *MSH6*

O gene *MSH6* está localizado no cromossomo 2, na posição 2p15-16. Consiste de 11 éxons e é transcrito como um mRNA de 4245 pb, que codifica uma proteína de 153 KD composta por 1360 aminoácidos (JACOB e PRAZ 2002; SUCHY et al. 2002). Sua região promotora é composta por um grande conteúdo GC e acredita-se que haja múltiplos sítios de iniciação da transcrição (SZADKOWSKI e JIRICNY 2002; GAZZOLI e KOLODNER 2003). A expressão do mRNA de *MSH6* é encontrada em todos os tecidos, mas aparentemente essa molécula é mais expressa nos testículos, timo e útero (ACHARYA et al. 1996).

A proteína msh6 é requerida para ativar as mudanças conformacionais necessárias para o reparo celular. Assim como mlh1 e msh2, msh6 pertence ao sistema MMR de reparo celular (CHARAMES et al. 2000; SZADKOWSKI e JIRICNY 2002). Forma o heterodímero MutS α juntamente com a proteína msh2. Esse heterodímero reconhece e repara o mau pareamento de bases e pequenas inserções/deleções, sendo também responsável pelo recrutamento do complexo MutL α (CHARAMES et al. 2000, SUCHY et al. 2002; SZADKOWSKI e JIRICNY 2002). Como msh6 livre é degradada, um aumento no nível de MutS α somente será detectado quando ambas as proteínas forem expressas em níveis elevados similares (SZADKOWSKI e JIRICNY 2002).

Alterações no gene *MSH6* causam defeitos no mecanismo de reparo de bases por mau pareamento (ACHARYA et al. 1996). Mutações germinativas nesse gene estão associadas com a síndrome de Lynch,

embora em baixa proporção (CHARAMES et al. 2000, GAZZOLI e KOLODNER 2003). As mutações podem ser alterações da janela de leitura ou missense e tendem a ocorrer em regiões gênicas diferentes (CHARAMES et al. 2000). Pacientes portadores dessas alterações são caracterizados pelo aparecimento tardio de tumores típicos da síndrome, apresentando mais comumente os seguintes cânceres extra-colônicos: câncer de ovário e carcinoma de endométrio (CHARAMES et al. 2000, SUCHY et al. 2002).

1.6.4 O gene *PMS2*

O gene *PMS2* está localizado no cromossomo 7, na posição 7p22 (JACOB e PRAZ 2002; PELTOMÄKI 2005). É formado por 33kb e 14 éxons. Codifica uma proteína composta por 862 aminoácidos. Um pseudogene foi descrito nesta mesma região e devido à sua homologia, que se estende tanto na sequência intrônica quanto na exônica, deve-se ter cuidado ao analisar mutações em *PMS2*, já que elas podem ser confundidas com polimorfismos do pseudogene (JACOB e PRAZ 2002).

A pms2 é uma proteína de reparo ao DNA pertencente ao grupo MMR. Forma um heterodímero com mlh1 chamado MutL α , que é essencial para a correção do mau pareamento dos pares de bases e das inserções/deleções que ocorrem no DNA (KONDO et al. 2001; PELTOMÄKI 2005). A afinidade de mlh1 por pms1 é mais elevada que por pms2. Contudo, em células humanas, a expressão de *PMS2* é cerca de dez vezes maior que a de *PMS1*, o que explica a predominância do heterodímero MutL α quando comparada com MutL β (RÄSCHLE et al. 1999; KONDO et al.

2001; PELTOMÄKI 2005). Pms2 também pode estar envolvida na apoptose, tendo assim outra atividade independentemente de sua interação com mlh1 durante o ciclo celular (PELTOMÄKI 2005).

A desregulação da expressão gênica de *PMS2* pode interromper o mecanismo de reparo MMR nas células de mamíferos. Esse fato é considerado um mecanismo de tumorigênese adicional pelo qual as células podem desenvolver instabilidades genéticas e adquirir resistência a terapias citotóxicas de combate ao câncer (GIBSON et al. 2006). A inativação desse gene está associada ao alto grau de instabilidades microsatélites, que é observado em alguns tipos de tumores. Isso demonstra que *PMS2* é de extrema importância na manutenção da estabilidade do genoma (PELTOMÄKI 2005). Mutações germinativas estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer colorretal, principalmente em pacientes portadores da síndrome de Turcot. Dessa forma, *PMS2* possui um papel importante durante a tumorigênese, principalmente quando associado a outras variações germinativas ou somáticas (PELTOMÄKI 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Mutações germinativas no gene *TP53* não são detectadas em todos os pacientes LFS/LFL. Como mutações germinativas em nenhum outro gene foram identificadas como responsáveis pela LFS/LFL, é possível que a função da p53 nesses pacientes seja inativada por outros mecanismos que não mutações na região codificante do gene *TP53*. Desta forma, o fenótipo tumoral pode ser causado por diferentes alterações genéticas não relacionadas à via de p53.

Estudos experimentais em linhagens celulares demonstram que células carreadoras de um alelo mutante de *TP53* têm respostas alteradas frente aos danos ao DNA. No entanto, não se sabe como esse defeito no reparo aos danos do DNA pode participar da tumorigênese em portadores de mutação. Além disso, não há dados que sugiram deficiências nas funções de p53 em pacientes LFS/LFL sem mutação germinativa no gene *TP53*.

A hipótese de trabalho deste projeto é que a perda de função do *TP53* pode ter um impacto nos padrões de alterações somáticas que fundamentam a tumorigênese em pacientes portadores de mutações germinativas neste gene. A razão para os padrões específicos de alterações nesses pacientes é baseada em duas considerações. Primeiro, a deficiência na função de p53 pode predispor esses pacientes à rápida aquisição de defeitos genéticos e epigenéticos em genes relacionados à tumorigênese. Assim, portadores de mutações germinativas no gene *TP53* teriam um

fenótipo alterado, isto é, uma característica genética que torna indivíduos propensos a adquirir e acumular mutações. Em segundo lugar, pode-se propor que deficiências na função de p53 podem levar as células a adquirir alterações na expressão gênica e/ou alteração na atividade dos componentes da via de sinalização que regulam ou complementam a função de p53.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a presença de alterações proteicas detectadas através de exame imunoistoquímico nas proteínas p53, p63, p73, pten, p21, p14Arf, p16Ink4a, brca1, pRb, mlh1, msh2, msh6, pms2, bem como verificar a presença de alterações cromossômicas através do método de FISH (hibridação *in situ* fluorescente) nos genes supressores de tumor *PTEN* e *TP53* em tumores de pacientes do Hospital A. C. Camargo previamente diagnosticados com a síndrome de Li-Fraumeni e sua variante Li-Fraumeni *like*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Analisar a expressão proteica de p53, p63, p73, pten, p21, p14Arf, p16Ink4a, brca1, pRb, mlh1, msh2, msh6, pms2 através da técnica de imunoistoquímica (IHQ).
- 2 Analisar alterações numéricas de *PTEN* e *TP53* e seus respectivos cromossomos através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

- 3 Estabelecer possíveis relações entre os achados encontrados através das técnicas de FISH e IHQ nos tumores de pacientes com diagnóstico clínico com os encontrados nos tumores de pacientes com diagnóstico molecular para a síndrome de Li-Fraumeni.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS

Amostras de tumores provenientes de pacientes com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like* foram incluídas a partir da revisão do banco de dados do departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo. Estes pacientes foram selecionados mediante o diagnóstico clínico realizado durante a consulta de aconselhamento genético pela Dra. Maria Isabel Waddington Achatz. Todos foram submetidos ao diagnóstico molecular por sequenciamento direto das regiões codificantes do gene *TP53* (éxon 2 ao éxon 11, além dos sítios de splicing). Tumores tanto de portadores de mutações germinativas quanto daqueles pacientes sem a mutação germinativa foram incluídos. Os pacientes cujos tumores foram selecionados através da consulta ao banco de dados tiveram suas informações cruzadas com o arquivo do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo para verificar a existência de blocos de parafina para posterior análise por imunoistoquímica e FISH.

O número de pacientes diagnosticados clinicamente com a Síndrome de Li-Fraumeni e de sua variante, Li-Fraumeni *like*, testados para mutações germinativas no gene *TP53* é 319, sendo que 160 destes já desenvolveram ao menos um tumor maligno. Porém, nem todos foram operados nesta instituição. Em uma primeira análise, foram selecionadas 59 amostras

provenientes de 43 pacientes. Entretanto, ao realizar a busca dos blocos de parafina no arquivo do departamento de Anatomia Patológica, foram encontrados somente 40 provenientes de 29 pacientes. Logo, 19 tumores foram excluídos deste estudo. Todos os tumores foram revisados pela médica patologista do Departamento de Anatomia Patológica, Dra Louise de Brot.

4.2 ANÁLISE DE TUMORES DE PACIENTES LFS/LFL POR IMUNOISTOQUÍMICA

4.2.1 Técnica de Imunoistoquímica

As seguintes proteínas foram analisadas nos tumores selecionados: p53, p63, p73, p14Arf, p16Ink4a, p21, pten, brca1, rb1, mlh1, msh2, msh6, pms2. Para estudar as proteínas de interesse foi confeccionada uma lâmina pela técnica de *tissue microarray* (TMA), o que permite reunir mais de 300 amostras em um mesmo bloco, permitindo que a reação de imunoistoquímica seja realizada em uma única lâmina. Alguns blocos de parafina continham tumores muito pequenos e, por essa razão, optou-se por fazer cortes inteiros desses casos.

A reação de imunoistoquímica para a detecção das proteínas mlh1, msh2, msh6 e pms2 foi realizada segundo protocolo previamente estabelecido (ROCHA et al. 2009) (Quadro 2). Cortes de 3 µm de espessura do material incluído em parafina foram aplicados em lâminas de vidro cobertas com silano SuperFrost Plus (#EP-SFPLUS) e deixadas por 24

horas em estufa 60°C para desparafinização. Em seguida, foram mergulhadas numa solução tampão citrato 10mM pH 6.0. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% para evitar que o sistema de revelação por polímeros (HRP) apresentasse reação de fundo com a peroxidase endógena nas etapas seguintes. Posteriormente, foi feita uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

Quadro 2 - Diluição, anticorpos e métodos de recuperação antigênica utilizados nos marcadores cuja detecção foi realizada de forma manual.

Anticorpo	Marca/Clone	Diluição padronizada	Recuperação antigênica	Marcação	Sistema de detecção
MIh1	BD G168-728	1/1000	Panela de pressão/EDTA /TRIS pH 9	Nuclear	Novolink Polymer (Novocastra)
Msh2	Calbiochem Fe11	1/800	Panela de pressão/EDTA /TRIS pH 9	Nuclear	Novolink Polymer (Novocastra)
Msh6	BD 44	1/300	Panela de pressão/EDTA /TRIS pH 9	Nuclear	Novolink Polymer (Novocastra)
Pms2	BD A16-4	1/500	Banho-Maria/Citrato pH6,0	Nuclear	Novolink Polymer (Novocastra)

As lâminas foram incubadas com as diluições padronizadas dos anticorpos de interesse, em tampão PBS contendo BSA 1% (Sigma, #A9647, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após essa fase, uma nova incubação foi realizada com o sistema de detecção Novolink Polymer (Novocastra) por 30 minutos a 37°C. A revelação foi feita incubando as lâminas em solução substrato de DAB 60mg (Sigma, d-5637, EUA), 1mL de DMSO, 1mL de H₂O₂ 6% e 100mL de PBS, por 5 min a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram contracoradas

com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, imersas em água amoniaca (NH₄OH 0,5%) e lavadas com água destilada. Por fim, as lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan neu lamínulas (Merck, #1.07961, Alemanha).

A reação de imunoistoquímica para a detecção das proteínas p53, p63, p73, pten, p14Arf, p16Ink4a, p21, rb1 e brca1 foi realizada de forma automatizada no aparelho BenchMark XT da marca Ventana® segundo as diluições abaixo demonstradas (Quadro 3).

Quadro 3 - Diluições padronizadas, marca e sítio de detecção dos anticorpos do estudo detectados de forma automatizada.

Proteína	Diluição padronizada	Marca/Clone	Marcação
p53	1:4000	DAKO D0-7	Nuclear
p63	1:250	Novocastra 7/jul	Nuclear
p73	1:100	Abcam EP436Y	Nuclear
p14	1:50	Abcam DCS-240	Nuclear
p16	1:400	Neomarkers 16PO7	Nuclear
p21	1:25	DAKO SX118	Nuclear
brca-1	1:100	DAKO GLK2	Citoplasmática
pten	1:50	Cascade 6H2.1	Citoplasmática
pRb	1:300	Abcam 51b7	Nuclear

4.2.2 Variáveis de análise

Proteínas com expressão nuclear foram avaliadas como proposto por Allred (1999): através da combinação entre a intensidade de marcação imunoistoquímica e a proporção de células marcadas, resultando em um escore máximo de oito. O escore total é obtido através da soma do escore de proporção de células marcadas com o escore de intensidade de

marcação. Escores totais entre 0 e 2 são considerados negativos e escores totais acima de 2 são considerados positivos.

As proteínas com expressão citoplasmática foram avaliadas conforme descrito por Liu et al. (2008), em relação à quantidade e intensidade de imunorreatividade no citoplasma: (1) Porcentagem de células marcadas: 1 = menos de 15%; 2 = 15-50%; 3 = mais de 50%. (2) Intensidade: 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa. O escore final foi dado pela multiplicação da quantidade pela intensidade de imunorreatividade no citoplasma. Casos com um escore final menor que 4 foram considerados negativos. Já os que possuíram escore maior ou igual a 4, foram considerados positivos.

As lâminas foram analisadas por dois observadores em momentos diferentes. Os dados discordantes foram revistos e reavaliados em consenso.

4.3 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada utilizando os kits Vysis PathVysion DNA Probe KitTM (Abbott[®]) para os ensaios de FISH. A sonda de *TP53* é da marca Kreateck e a de *PTEN*, da marca Vysis. No primeiro dia, após o processo de desparafinização em três lavagens com xilol 100% de 10 minutos cada, as lâminas foram tratadas com duas lavagens com etanol 100% de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em três banhos de água destilada de 2 minutos cada. Logo depois, as lâminas ficaram imersas em solução de HCl 0.2N por 20 minutos. Posteriormente, as

lâminas foram pré-tratadas com tampão Citrato pH 6,0 a 80°C em banho-maria por 1 hora. Após o pré-tratamento, as lâminas passaram por um processo de digestão enzimática com pepsina pronta para uso por 8 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em solução de 2X SSC (NaCl 0,3mmol/L e citrato de sódio 0,03mmol/L) por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em 3 séries de lavagem com álcool 75%, 80% e 100% por 2 minutos cada. Após a desidratação, as lâminas secaram ao ar. Depois disso, ocorreu a aplicação da sonda ao abrigo da luz (10µl em cada lâmina) e as lâminas foram incubadas no hibridizador para denaturação (a 90 °C por 10 minutos para *TP53* e a 80°C por 5 minutos para *PTEN*) e hibridização (a 37°C por 20 horas para ambos os genes).

No segundo dia, as lâminas foram incubadas em solução de UREA 1,5M/0,1 x SCC pré-aquecida a 45°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução SCC 2X por 2 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, as lâminas passaram por um processo de desidratação em 3 séries de álcool 75%, 80% e 100% por 2 minutos cada. As lâminas secaram ao ar. Depois de secas, as lâminas foram montadas com 15µl de contraste DAPI (SSC 2X/0,03 ug/mL 4',6-diaminido-2-fenilindole diidrocloreto) cada uma para a identificação dos núcleos. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência pela médica patologista do Departamento de Anatomia Patológica Dra. Louise de Brot e pelo biólogo molecular e pesquisador do Departamento de Anatomia Patológica Dr. Rafael Malagoli Rocha.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram organizadas por proporções em porcentagens de acordo com os resultados obtidos a partir das análises da IHQ e de FISH. Devido ao número reduzido de casos, não foi possível realizar cálculo do valor de p. Os resultados numéricos serão expostos de forma descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS

No total, foram analisados 40 tumores, incluindo 13 tumores provenientes de nove pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* e 27 tumores de 20 pacientes com definição clínica da síndrome de Li-Fraumeni (LFS/LFL), nos quais não foi possível detectar a mutação germinativa no gene *TP53* pelo método de sequenciamento direto das regiões codificantes. Comparamos as proporções de tumores positivos versus negativos nos dois subgrupos (com e sem mutação germinativa no gene *TP53*). Devido ao pequeno tamanho da amostra bem como sua heterogeneidade de tipos tumorais, nenhuma tentativa foi feita para analisar estatisticamente os resultados. Todavia, nossas análises fornecem observações iniciais que serão úteis para a construção de estudos comparativos em um grupo maior de pacientes, em que será possível obter resultados com poder estatístico adequado.

5.1.1 Tumores provenientes de portadores de mutações germinativas no gene *TP53*

Os tipos histológicos avaliados no grupo dos pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* foram: (1) uma neoplasia cortical de adrenal, ocorrido em um paciente do sexo feminino aos seis meses de

idade, (2) um carcinoma epidermóide (CEC) de couro cabeludo ocorrido em um paciente do sexo feminino aos 62 anos, (3) três carcinomas ductais invasivos de mama ocorridos em um paciente do sexo feminino aos 59 anos, em um paciente do sexo feminino aos 36 anos e em um paciente do sexo feminino aos 39 anos, (4) um carcinoma ductal *in situ*, ocorrido em um paciente do sexo feminino aos 60 anos, (5) um osteossarcoma de fêmur, ocorrido em um paciente do sexo masculino aos 18 anos, (6) um sarcoma pleomórfico de alto grau em região de coxa, ocorrido em um paciente do sexo feminino aos 32 anos, (7) um carcinoma pouco diferenciado de peritônio, ocorrido em um paciente do sexo feminino aos 62 anos, (8) um adenocarcinoma *in situ* de pulmão, anteriormente classificado como carcinoma bronquíolo-alveolar, ocorrido em um paciente do sexo feminino aos 61 anos. Três amostras de metástases de um leiomiossarcoma e de dois carcinomas ductais invasivos de mama também foram incluídas na amostragem (Tabela 1). A idade média de acometimento tumoral nesse grupo foi de 44 anos.

A maioria dos tumores incluídos no grupo dos portadores de mutação germinativa no gene *TP53* é proveniente de pacientes do sexo feminino (12/13), sendo o câncer de mama o tumor mais representado (4/12). Dentre os cânceres de mama, três foram classificados como carcinoma ductal invasivo e todos eram negativos para os receptores de estrógeno e progesterona e positivos para o marcador C-erbB-2. O carcinoma ductal *in situ*, é negativo para os receptores de estrógeno e progesterona.

Tabela 1 - Número de mutações encontradas nos tumores LFS/LFL selecionados para o estudo.

Sítio de acometiment o tumoral	Tipo histológico	p.R337H	p.T125T	Del exon 5-11	IVS8 +1G>A	Total
Mama	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1	0	0	0	1
Mama	Carcinoma ductal invasivo	3	0	0	0	3
Ossos	Osteossarcoma de fêmur	0	0	1	0	1
Partes moles	Sarcoma pleomórfico de alto grau	1	0	0	0	1
Adrenocortical	Neoplasia adrenocortical	0	0	0	1	1
Peritônio	Carcinoma pouco diferenciado	0	1	0	0	1
Pele	Carcinoma epidermoide de couro cabeludo	1	0	0	0	1
Pulmão	Adenocarcinoma <i>in situ</i>	1	0	0	0	1
Ossos	Metástase de carcinoma ductal invasivo de mama	1	0	0	0	1
Pulmão	Metástase de leiomiossarcoma	1	0	0	0	1
Ovário	Metástase de carcinoma	1	0	0	0	1
Total		10	1	1	1	13

5.1.2 Tumores provenientes de portadores sem a detecção de mutações germinativas no gene *TP53*

Vinte e sete tumores provenientes dos 20 pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53* foram selecionados. Incluíram-se cinco tumores colorretais (5/27), sete tumores de mama (quatro carcinomas ductais invasivos e três carcinomas ductais *in situ*) (7/27), três carcinomas papilífero da tireoide (3/27), dois lipossarcomas mixoides (2/27), dois tumores ósseos (um sarcoma de Ewing e um sarcoma fusocelular) (2/27), dois carcinomas adrenocorticais (2/27), um melanoma *in situ*, um adenocarcinoma acinar da próstata, um GIST (tumor estromal

gastrointestinal), uma neoplasia intraepitelial vaginal (correspondendo a 1/27 cada um), além de duas metástases (linfonodo e ossos) (2/27). A idade média de acometimento tumoral nesse grupo foi de 43 anos.

Nesse grupo, assim como o ocorrido para o grupo de portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, a maioria dos tumores foi proveniente de mulheres (22/27), sendo o câncer de mama o tumor mais representado (7/22). Dentre esses, seis são positivos para os receptores de estrógeno e progesterona. Já para o marcador C-erbB-2, três tumores foram positivos e três negativos. Nenhum dos tumores de mama foi considerado triplo negativo (para os receptores de estrógeno, progesterona e C-erbB2).

Dentre os sítios de acometimento tumoral, o mais frequente foi a mama (11/40), seguido por ossos (5/40), cólon, sigmoide e retossigmoide (5/40), partes moles (3/40), tireoide (3/40), adrenocortical (3/40), pele (2/40), pulmão (2/40), peritônio e retroperitônio (2/40), ovário (1/40), próstata (1/40), vagina (1/40) e linfonodo (1/40).

Dentre os três sarcomas de partes moles, dois são lipossarcomas mixoides e um é sarcoma pleomórfico de alto grau em região de coxa. Já dentre os três sarcomas ósseos, um é sarcoma de Ewing, outro é osteossarcoma e, por fim, um é sarcoma fusocelular.

5.2 ANÁLISE GÊNICA E CROMOSSÔMICA POR HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

5.2.1 Análise gênica e cromossômica do gene *PTEN*

A hibridação *in situ* fluorescente para o gene *PTEN* foi realizada nos 40 tumores disponíveis. Encontraram-se alterações cromossômicas em sete tumores (7/40): dois carcinomas ductais invasivos de mama, um carcinoma ductal *in situ* de mama, um adenocarcinoma *in situ* de pulmão, um adenocarcinoma tubular de cólon, um carcinoma adrenocortical e uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma. Em quatro tumores, foi encontrada polissomia do cromossomo 10, sendo que cada núcleo apresenta, em média, três cromossomos (Figura 1A). Em dois tumores observou-se polissomia do cromossomo 10, com deleção do gene *PTEN* (Figura 1C). Em um tumor, um carcinoma ductal *in situ* de mama, foi verificada a amplificação do gene *PTEN* (Figura 1B). Em seis dos tumores analisados, o FISH de *PTEN* foi inconclusivo. Nos 27 tumores remanescentes, o FISH de *PTEN* não apresentou alterações.

Dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, quatro (4/13) apresentaram alterações cromossômicas em *PTEN* (Tabela 2). Três deles acometeram a mesma paciente: um carcinoma ductal *in situ* diagnosticado aos 60 anos, um adenocarcinoma *in situ* de pulmão e uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma, ambos diagnosticados aos 61 anos. O tumor remanescente é um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 36 anos.

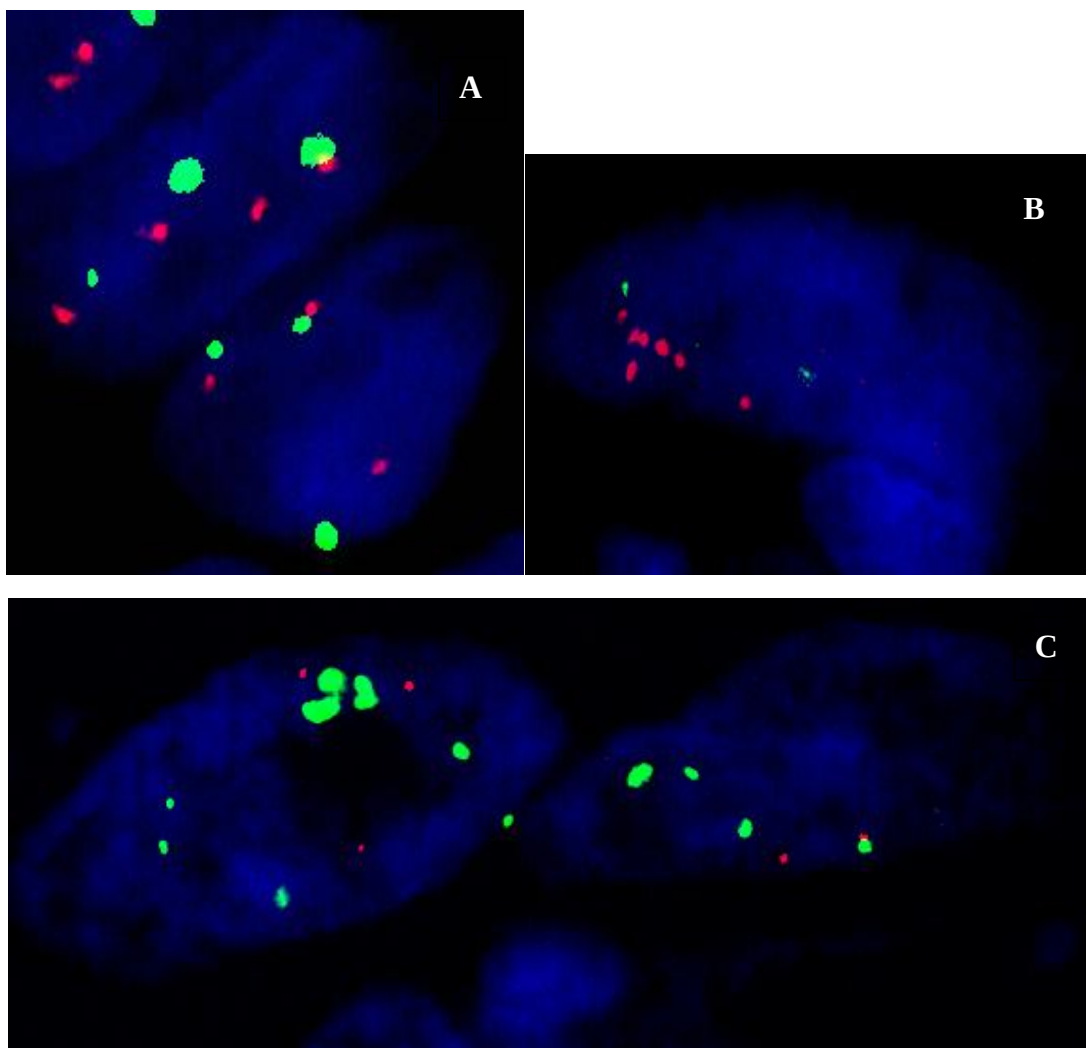


Figura 1 – Fotomicrografia ilustrativa da análise de FISH para o gene *PTEN*, onde o sinal verde representa o centrômero do cromossomo 10 e o sinal vermelho representa o gene *PTEN*. A) Polissomia do cromossomo 10, como podemos verificar pela presença de três sinais verdes e três vermelhos em um carcinoma ductal invasivo de mama. B) Amplificação do gene *PTEN*, com a presença de dois sinais verdes e sete sinais vermelhos em um carcinoma ductal *in situ*. C) Polissomia do cromossomo 10 com deleção do gene *PTEN*, como podemos verificar pela presença de um número maior de sinais verdes em comparação com sinais vermelhos em um carcinoma ductal invasor de pulmão. As figuras B e C correspondem a tumores ocorridos na mesma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53*.

Os quatro tumores alterados são provenientes de duas pacientes com a mesma mutação germinativa em *TP53*, a mutação p.R337H. Essa ocorre no códon 337, onde há a troca de uma arginina por uma histidina. Dos quatro tumores de mama ocorridos em pacientes portadoras de mutação germinativa em *TP53*, dois apresentaram alterações cromossômicas em *PTEN* (2/4), sendo uma amplificação do gene e outra polissomia do cromossomo 10. Os dois tumores pulmonares apresentaram polissomia do cromossomo 10 com deleção do gene *PTEN*.

Tabela 2 - Análise gênica e cromossômica no FISH de *PTEN*.

Tipo de alteração	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Polissomia	1 (1/13)	3 (3/27)	4
Polissomia com deleção	2 (2/13)	0	2
Amplificação	1 (1/13)	0	1
Sem alterações	5 (5/13)	22 (22/27)	27
Inconclusivo	4 (4/13)	2 (2/27)	6
Total	13	27	40

Já dentre os 27 tumores originados em pacientes negativos para mutação germinativa no gene *TP53*, somente três apresentaram alterações cromossômicas em *PTEN* (3/27): um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 27 anos, um adenocarcinoma tubular de cólon diagnosticado aos 68 anos e por fim um carcinoma adrenocortical diagnosticado aos 20 anos. Todos os tumores apresentaram polissomia do cromossomo 10 (Tabela 2).

5.2.2 Análise gênica e cromossômica do gene *TP53*

A análise de FISH para o gene *TP53* foi realizada em todos os tumores disponíveis. Encontraram-se alterações cromossômicas em seis amostras (6/40). As alterações encontradas foram polissomia do cromossomo 17 (Figura 2A), presente em três tumores; deleção do gene *TP53* (Figura 2B), presente em um adenocarcinoma mucinoso de cólon e polissomia do cromossomo 17 com deleção do gene *TP53* (Figura 2C), presente em dois tumores. Em seis tumores, o FISH de *TP53* foi inconclusivo. Nas demais 28 amostras, o FISH não demonstrou nenhuma alteração cromossômica.

Dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, três apresentaram alterações cromossômicas em *TP53* (3/13), sendo que todos foram originados na mesma paciente. Essa paciente é portadora da mutação p.R337H. Dois destes tumores, um adenocarcinoma *in situ* de pulmão e uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma diagnosticados aos 61 anos, apresentaram polissomia do cromossomo 17. O tumor remanescente com alteração no FISH de *TP53* é um carcinoma ductal *in situ* diagnosticado aos 60 anos cuja alteração foi polissomia do cromossomo 17 com deleção do gene *TP53* (Tabela 3).

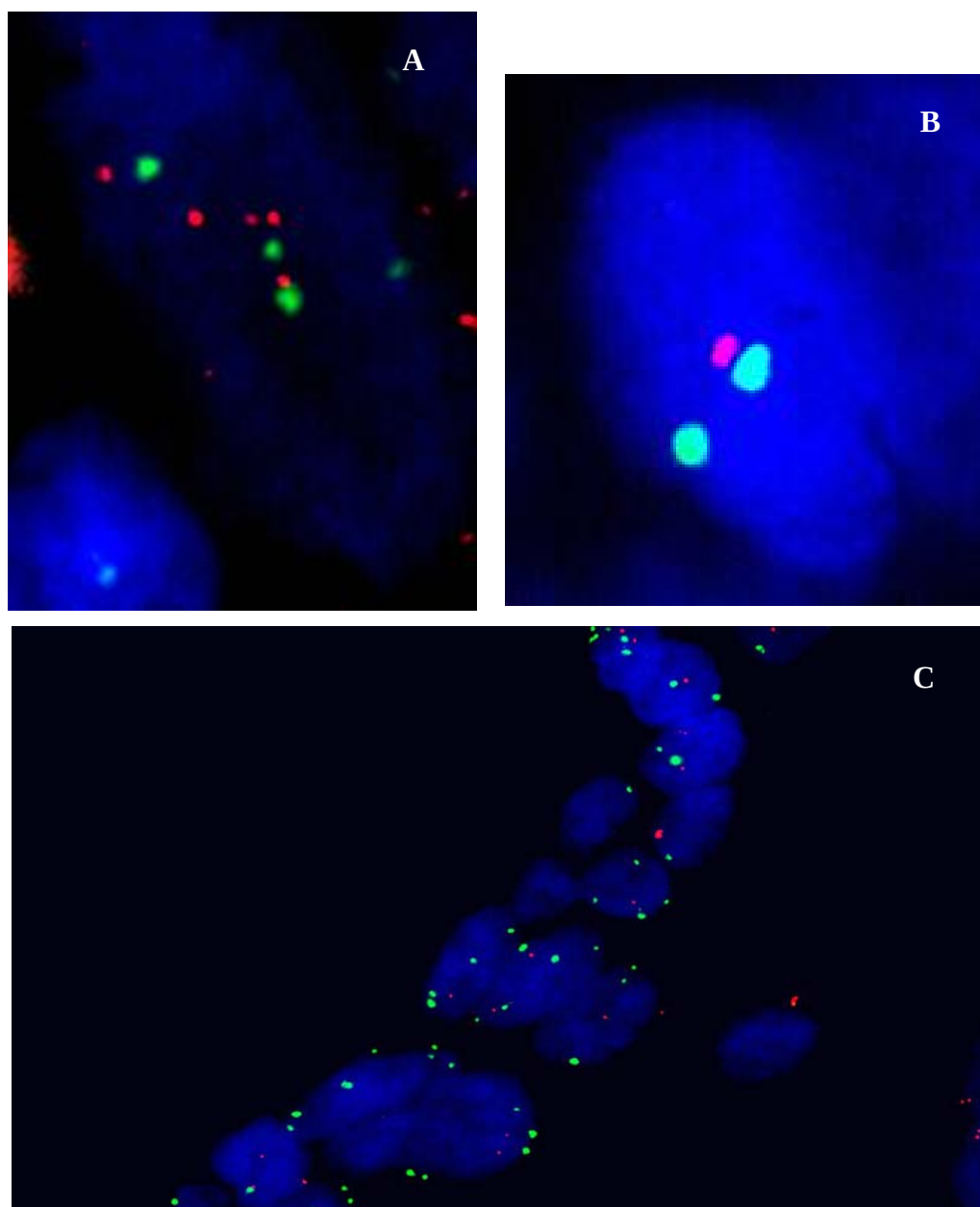


Figura 2 – Fotomicrografia ilustrativa da análise de FISH para o gene *TP53*.

O sinal verde representa o centrômero do cromossomo 17 e o sinal vermelho representa o gene *TP53*. A) Polissomia do cromossomo 17, como se pode verificar pela presença de quatro sinais verdes e quatro vermelhos em um adenocarcinoma *in situ* de pulmão. B) Deleção do gene *TP53*, que pode ser verificada pela presença de dois sinais verdes e um vermelho em um adenocarcinoma mucinoso de cólon. C) Polissomia do cromossomo 17 com deleção do gene *TP53*, como se pode verificar pela presença de um maior número de sinais verdes em comparação com sinais vermelhos em um carcinoma ductal *in situ* de mama.

Tabela 3 - Análise gênica e cromossômica no FISH de *TP53*.

Tipo de alteração	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Polissomia	2 (2/13)	1 (1/27)	3
Polissomia com deleção	1 (1/13)	1 (1/27)	2
Deleção	0	1 (1/27)	1
Sem alterações	6 (6/13)	22 (22/27)	28
Inconclusivo	4 (4/13)	2 (2/27)	6
Total	13	27	40

No que diz respeito aos 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53*, somente três apresentaram alguma alteração cromossômica no gene *TP53* (3/27). As alterações encontradas foram deleção do gene *TP53* em um adenocarcinoma mucinoso de cólon diagnosticado aos 68 anos, polissomia do cromossomo 17 em um carcinoma adrenocortical diagnosticado aos 20 anos e polissomia do cromossomo 17 com deleção do gene *TP53* em um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 27 anos (Tabela 3). Dentre os sete tumores de mama originados em pacientes sem mutação germinativa no gene *TP53*, apenas um apresentou alteração cromossômica em *TP53* (1/7).

5.3 IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)

5.3.1 Expressão proteica da proteína p53

Em 14 das 40 amostras analisadas, foi possível verificar a presença da proteína p53 no núcleo das células, sendo esses casos classificados

como positivos (Figura 3A). Em 25 amostras, a detecção nuclear da proteína p53 não pode ser verificada (25/40), sendo essas classificadas como negativas (Figura 3B). Em uma amostra, a IHQ foi inconclusiva (1/40).

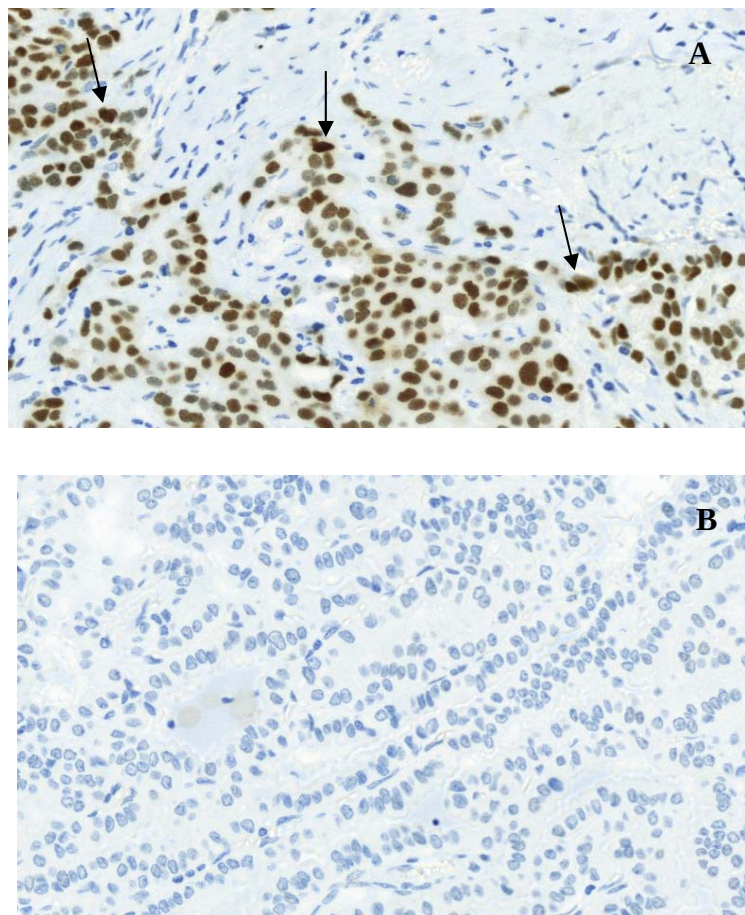


Figura 3 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p53, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 32 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar a marcação nuclear da proteína p53 (setas). B) Corte histológico de um carcinoma papilífero da tireoide diagnosticado aos 61 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína p53.

Dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, nove foram classificados como positivos para a expressão proteica de p53 (9/13): os quatro carcinomas mamários originados nesse grupo, um sarcoma de partes moles, um CEC, um adenocarcinoma *in situ* de pulmão e duas metástases (uma pulmonar e uma ovariana). Todos os tumores positivos para expressão proteica de p53 são provenientes de pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H. Os demais tumores foram classificados como negativos para a expressão proteica de p53 (4/13) (Tabela 4).

Já dentre os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, apenas cinco foram classificados como positivos para a presença nuclear da proteína p53 (5/27): dois carcinomas mamários (ambos ductais invasivos) e três adenocarcinomas colorretais. Esses cinco tumores ocorreram em pacientes com idades entre 30 e 60 anos. Nos demais 21 tumores, a IHQ para a detecção de p53 foi negativa (21/27). Em um tumor a IHQ foi inconclusiva (1/27) (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p53.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	9 (9/13)	5 (5/27)	14
Negativo	4 (4/13)	21 (21/27)	25
Inconclusivo	0	1 (1/27)	1
Total	13	27	40

5.3.2 Expressão proteica da proteína p63

Todos os 40 casos disponíveis foram submetidos ao experimento de IHQ para a detecção nuclear desta proteína. Em 39 dos 40 casos disponíveis não foi possível verificar a presença da proteína p63 no núcleo das células, sendo esses classificados como negativos para a expressão proteica de p63 (Figura 4A).

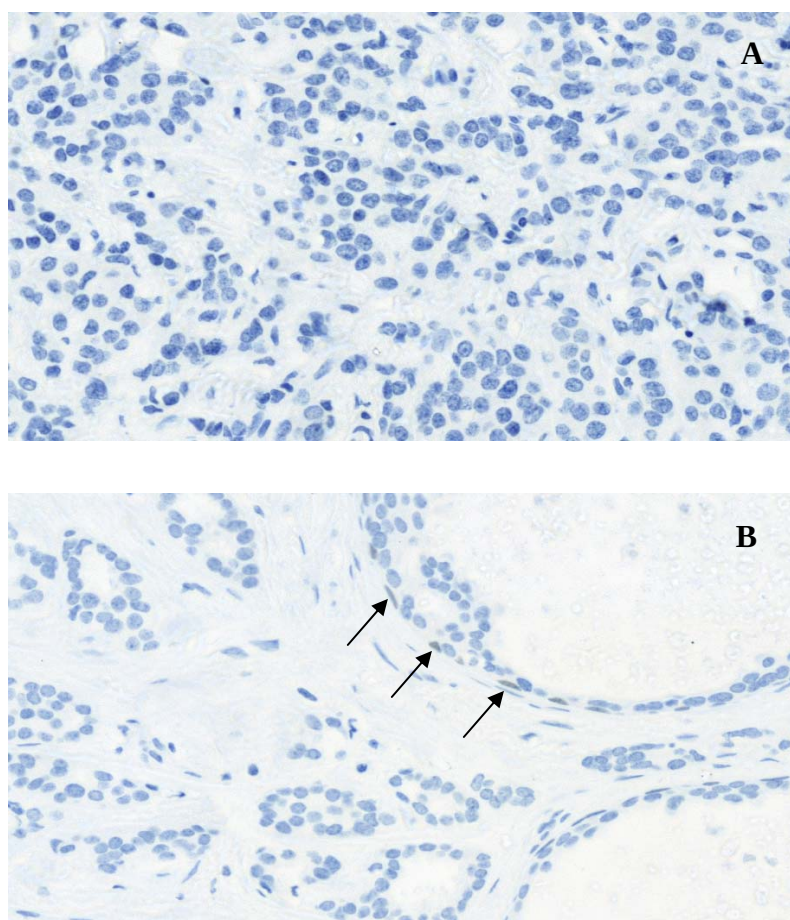


Figura 4 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p63, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 32 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar ausência de marcação nuclear da proteína p63. B) Controle positivo endógeno da reação. Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 53 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar marcação positiva fraca de alguns núcleos das células mioepiteliais (setas).

Dentre os 13 tumores provenientes de portadores de mutação germinativa em *TP53*, todos foram negativos para a expressão proteica de p63. Já quanto aos os 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, 26 foram classificados como negativos para a expressão da proteína p63 (26/27). Em um caso (1/27), a IHQ para a detecção de p63 foi inconclusiva (Tabela 5). Em nenhum caso verificou-se a presença nuclear de p63. Portanto, nenhum caso foi classificado como positivo para a expressão proteica de p63.

Tabela 5 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p63.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	13 (13/13)	26 (26/27)	39
Inconclusivo	0	1 (1/27)	1
Total	13	27	40

5.3.3 Expressão proteica da proteína p73

Todas as amostras foram submetidas ao experimento para a detecção nuclear da proteína. Em cinco dos 40 tumores disponíveis houve marcação nuclear, indicando a presença da proteína p73. Esses casos foram classificados como positivos para a presença da proteína p73 (Figura 5A). Trinta e duas amostras (32/40) foram classificadas como negativas para a proteína p73, pois não houve marcação nuclear nesses tumores (Figura 5B). Em três amostras (3/40) a IHQ foi inconclusiva.

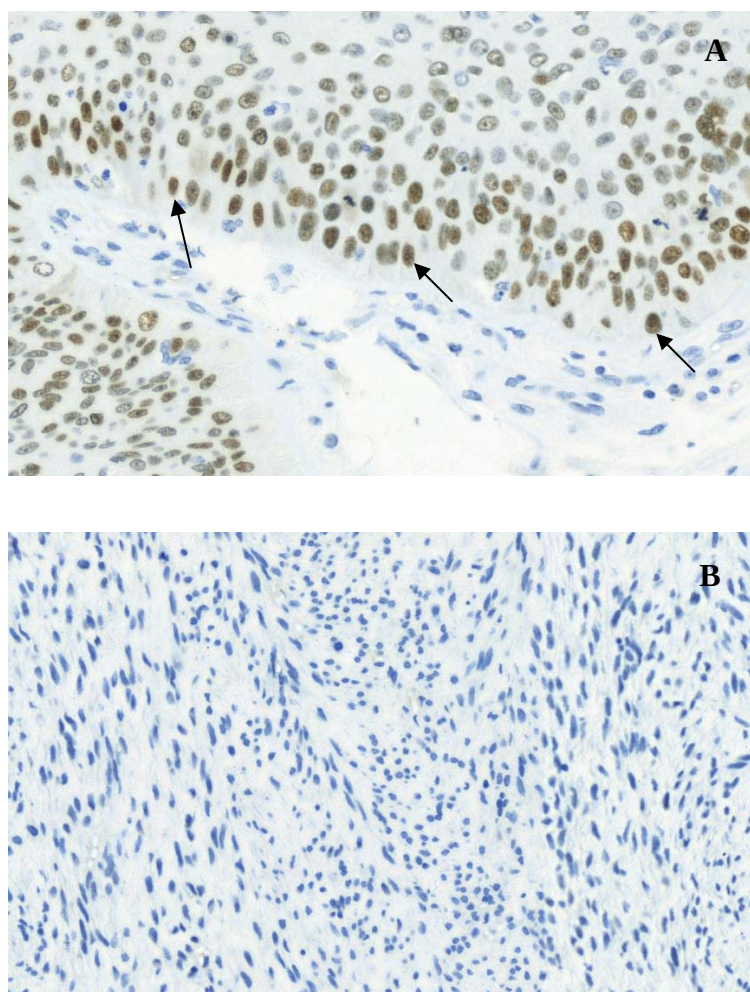


Figura 5 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p73, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma intraductal de mama diagnosticado aos 44 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação nuclear da proteína p73 (setas). B) Corte histológico de uma metástase de leiomiossarcoma diagnosticada aos 61 anos em uma paciente portadora da mutação p.R337H no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína p73.

Dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, três foram classificados como positivos para expressão proteica de p73 (3/13). Um foi originado em uma paciente portadora da mutação germinativa p.T125T em *TP53* e os outros dois, em

pacientes portadoras da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53*. A maioria dos tumores desse grupo foi classificada como negativo para a expressão proteica de p73 (9/13). Dentre esses, sete são provenientes de pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*, um de uma paciente portadora da mutação germinativa IVS8+1G>A em *TP53* e outro de um paciente portador de uma deleção entre os éxons 5 a 11 do gene *TP53*. Em um tumor, a IHQ foi inconclusiva devido a material insuficiente para análise (1/13) (Tabela 6).

Analisando os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, dois foram classificados como positivos para a expressão proteica de p73 (2/27) e 23 foram classificados como negativos (23/27). Em dois tumores, a IHQ foi classificada como inconclusiva devido à ausência de material para análise (2/27) (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p73.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	3 (3/13)	2 (2/27)	5
Negativo	9 (9/13)	23 (23/27)	32
Inconclusivo	1 (1/13)	2 (2/27)	3
Total	13	27	40

5.3.4 Expressão proteica da proteína pten

Todas as 40 amostras disponíveis foram submetidas ao experimento de IHQ para detecção citoplasmática da proteína pten. Vinte e uma amostras

(21/40) apresentaram marcação citoplasmática para a proteína pten e, por isso, foram classificadas como positivas para a expressão desta (Figura 6A).

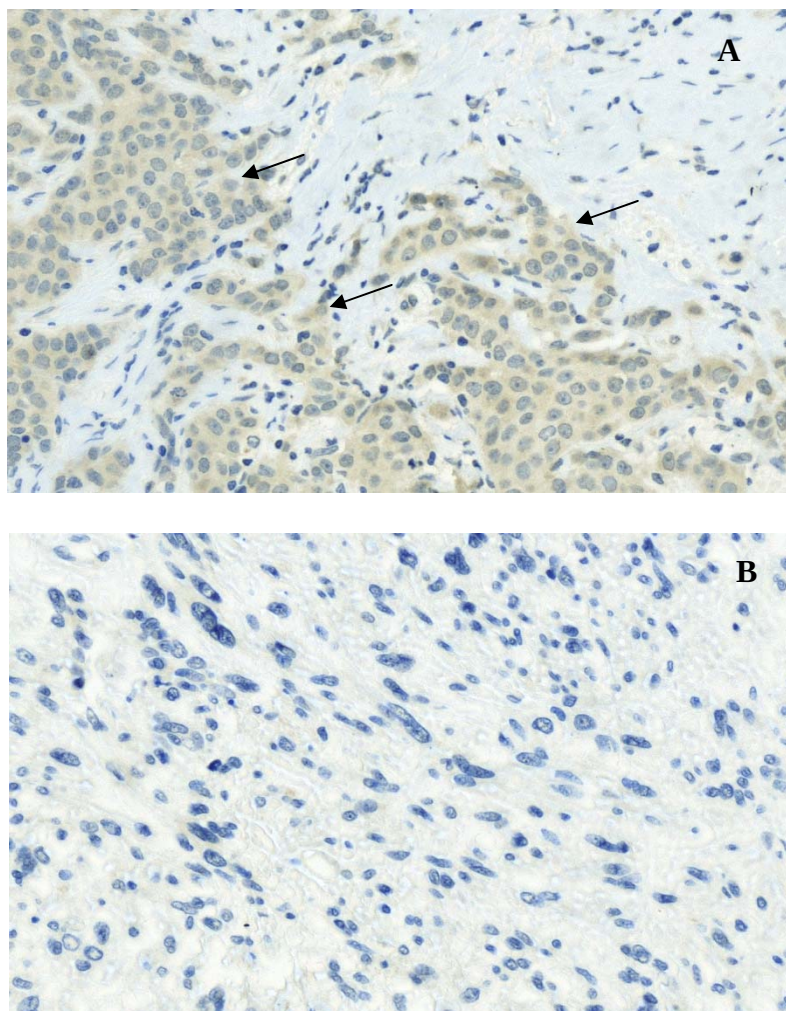


Figura 6 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pten aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 27 anos uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação citoplasmática da proteína pten (setas). B) Corte histológico de um osteossarcoma de fêmur diagnosticado aos 18 anos em um paciente portador da mutação Del ex 5-11 no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína pten.

Em 14 amostras (14/40), não foi possível detectar a presença citoplasmática da proteína pten. Sendo assim, esses casos foram classificados como negativos para a expressão proteica de pten (Figura 6B).

Para cinco amostras (5/40), a IHQ de pten foi inconclusiva devido a material insuficiente para análise.

Entre as 13 amostras positivas para mutação germinativa no gene *TP53*, cinco foram classificadas como positivas para a expressão proteica de pten (5/13), uma proveniente de uma paciente portadora da mutação germinativa p.T125T em *TP53*, outra de uma paciente portadora da mutação germinativa IVS8+1G>A no gene *TP53* e as demais, provenientes de pacientes portadoras da mutação germinativa p.R337H em *TP53*. Cinco amostras foram classificadas como negativas para a expressão proteica de pten (5/13), quatro tumores originados em pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* e um em um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11 do gene *TP53*. Para três amostras do grupo em análise (3/13), a IHQ de pten foi considerada inconclusiva (Tabela 7).

Considerando as 27 amostras negativas para mutação germinativa em *TP53*, 16 foram classificadas como positivas para a expressão proteica de pten (16/27), nove foram classificadas como positivas (9/27) e duas como inconclusivas (2/27) (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pten.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	5 (5/13)	16 (16/27)	21
Negativo	5 (5/13)	9 (9/27)	14
Inconclusivo	3 (3/13)	2 (2/27)	5
Total	13	27	40

5.3.5 Expressão proteica da proteína p21

Todas as amostras foram submetidas ao experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína. Em seis dos 40 tumores disponíveis (6/40) verificou-se marcação nuclear da proteína p21. Esses casos foram denominados como positivos para a expressão de p21 (Figura 7A). Trinta e um tumores foram classificados como negativos para a expressão da proteína p21 (31/40), pois não houve marcação nuclear (Figura 7B). Em quatro tumores (4/40) a IHQ para p21 foi inconclusiva devido a material insuficiente para análise.

Dentre os 13 tumores positivos para mutações germinativas no gene *TP53*, dois foram nomeados como positivos para a expressão proteica de p21 (2/13), ambos provenientes da mesma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H em *TP53*. Nove tumores foram classificados como negativos para a expressão da proteína p21 (9/13), sendo que seis foram originados em pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*, um em uma paciente portadora da mutação germinativa p.T125T em *TP53*, um em uma paciente portadora da mutação IVS8+1G>A em *TP53* e outro em um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11 do gene *TP53*. A IHQ de p21 foi inconclusiva para dois tumores (2/13) (Tabela 8).

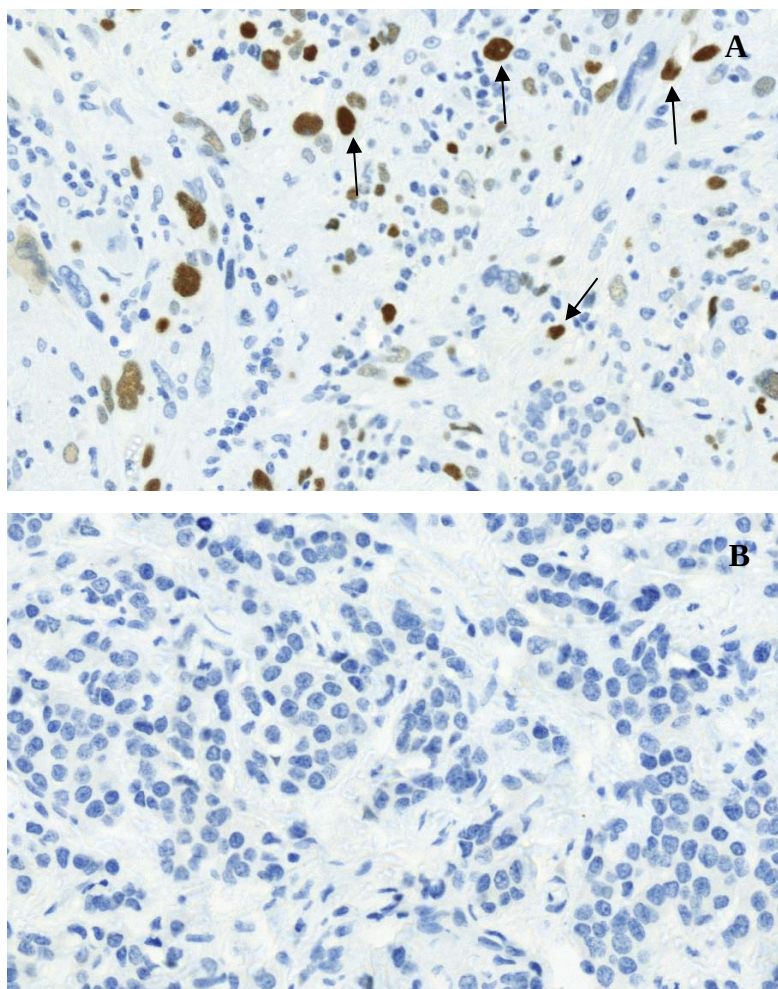


Figura 7 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p21 aumento de 40x. A) Corte histológico de uma metástase de leiomiossarcoma diagnosticada aos 61 anos em uma paciente portadora da mutação p.R337H no gene *TP53*, onde se pode observar marcação nuclear da proteína p21 (setas). B) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 27 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína p21.

Dentre os 27 tumores negativos para mutações germinativas em *TP53*, quatro foram classificados como positivos para a expressão da proteína p21 (4/27), 22 como negativos (22/27) e um como inconclusivo (1/27) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p21.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	2 (2/13)	4 (4/27)	6
Negativo	9 (9/13)	22 (22/27)	31
Inconclusivo	2 (2/13)	1 (1/27)	3
Total	13	27	40

5.3.6 Expressão proteica da proteína brca1

Todas as 40 amostras foram submetidas ao experimento de IHQ para a detecção citoplasmática da proteína brca1. Em 34 amostras disponíveis (34/40) foi possível verificar a presença da proteína brca1 no citoplasma das células, sendo tais amostras classificadas como positivas para a expressão de brca1 (Figura 8A). Somente duas amostras (2/40) foram classificadas como negativas para a proteína brca1, pois nestas não foi possível verificar a presença citoplasmática da proteína (Figura 8B). Em quatro amostras (4/40) a IHQ para brca1 foi inconclusiva.

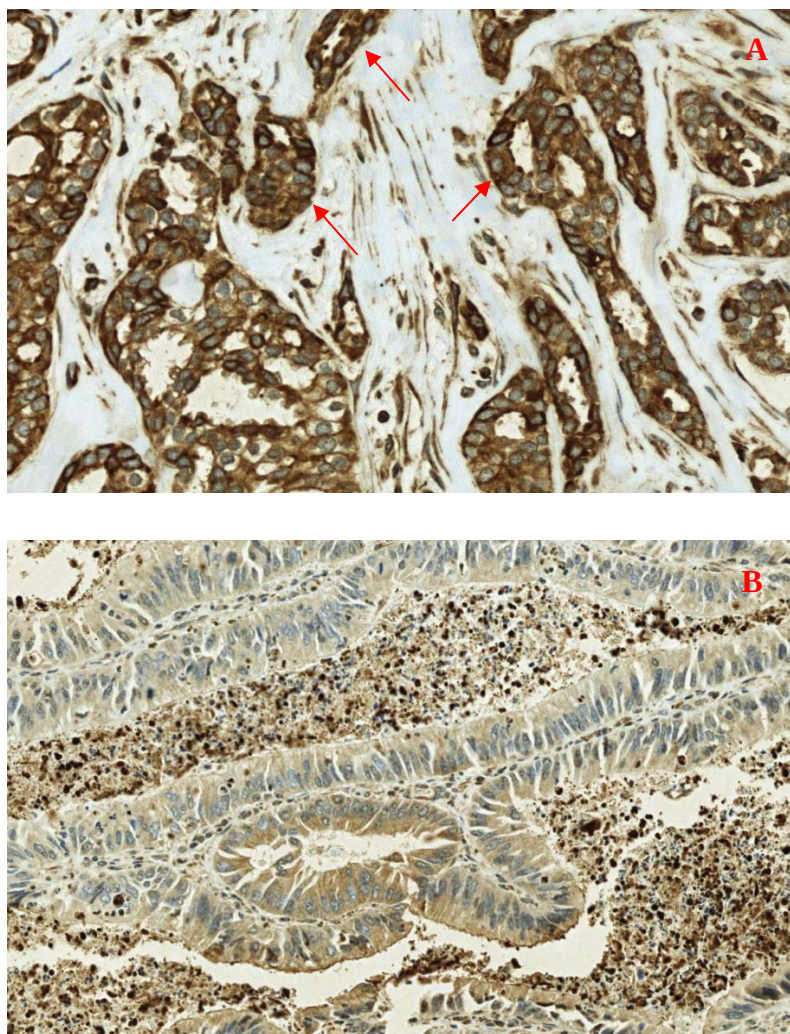


Figura 8 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína brca1, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 32 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação citoplasmática da proteína brca1 (setas). B) Corte histológico de um adenocarcinoma moderadamente diferenciado de sigmoide diagnosticado aos 48 anos em uma paciente sem mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína brca1.

Considerando somente as 13 amostras provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 10 foram classificadas como positivas para a expressão proteica de brca1 (10/13). Dentre essas, sete tumores foram originados em pacientes portadores da mutação

germinativa p.R337H no gene *TP53*, um em uma paciente portadora da mutação germinativa p.T125T em *TP53*, outro em uma paciente portadora da mutação germinativa IVS8+1G>A em *TP53* e por fim um em um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11 no gene *TP53*. Somente um tumor, proveniente de uma paciente portadora da mutação p.R337H em *TP53*, foi classificado como negativo para a proteína brca1 (1/13). Para duas amostras a IHQ para detecção de brca1 foi inconclusiva (2/13) (Tabela 9).

No que diz respeito aos 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53*, 24 foram classificados como positivos para a expressão da proteína brca1 (24/27), um foi classificado como negativo para a expressão proteica de brca1 (1/27) e em dois a IHQ para a detecção citoplasmática de brca1 foi inconclusiva (2/27) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína brca1.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	10 (10/13)	24 (24/27)	34
Negativo	1 (1/13)	1 (1/27)	2
Inconclusivo	2 (2/13)	2 (2/27)	4
Total	13	27	40

5.3.7 Expressão proteica da proteína p14Arf

Todas as 40 amostras disponíveis foram submetidas ao experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína p14Arf. Trinta e sete tumores tiveram perda de expressão proteica de p14Arf. Nesses tumores não foi possível verificar a presença da proteína p14Arf no núcleo das células, e por

isso, estes foram classificados como negativos para expressão proteica desta proteína (Figura 9A). Em nenhuma amostra foi possível detectar a presença nuclear de p14Arf. Portanto, nenhuma amostra foi classificada como positiva para a expressão proteica de p14Arf.

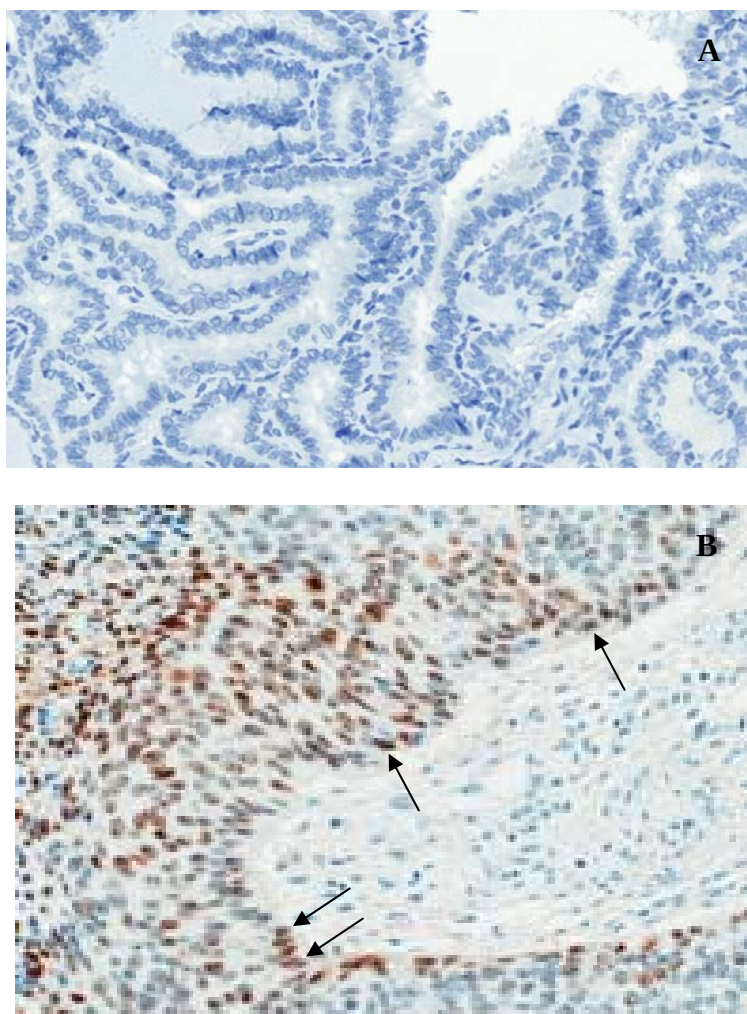


Figura 9 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p14Arf, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma papilífero da tireoide diagnosticado aos 61 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar ausência de marcação nuclear para a proteína p14Arf. B) Controle positivo da reação. Corte histológico de um adenocarcinoma epidermoide de vulva, em que é possível observar a presença nuclear da proteína p14Arf (setas).

Dentre os 13 tumores originados em pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, classificaram-se 11 como negativos para a expressão para a proteína p14Arf (11/13). Nos dois tumores remanescentes, a IHQ foi considerada inconclusiva (2/13). Com relação aos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, a IHQ para a proteína p14Arf revelou que 26 tumores foram negativos para a expressão dessa proteína (26/27) e um tumor foi classificado como inconclusivo (1/27) (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p14Arf.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	11 (11/13)	26 (26/27)	37
Inconclusivo	2 (2/13)	1 (27)	3
Total	13 (100%)	27 (100%)	40

5.3.8 Expressão proteica da proteína p16Ink4a

Todas as 40 amostras disponíveis foram submetidas ao experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína p16Ink4a. Em 19 casos (19/40) verificou-se a presença da proteína p16Ink4a no núcleo das células. Esses casos foram classificados como positivos para a expressão proteica de p16Ink4a (Figura 10A). Em 17 amostras (17/40) não foi possível verificar a marcação nuclear da proteína p16Ink4a. Por esse motivo, tais amostras foram classificadas como negativas para a expressão proteica de p16Ink4a (figura 10B). Quatro amostras (4/40) não continham material suficiente para

a análise da expressão proteica de p16Ink4a. Por isso, a IHQ para p16Ink4a foi classificada como inconclusiva nesses casos.

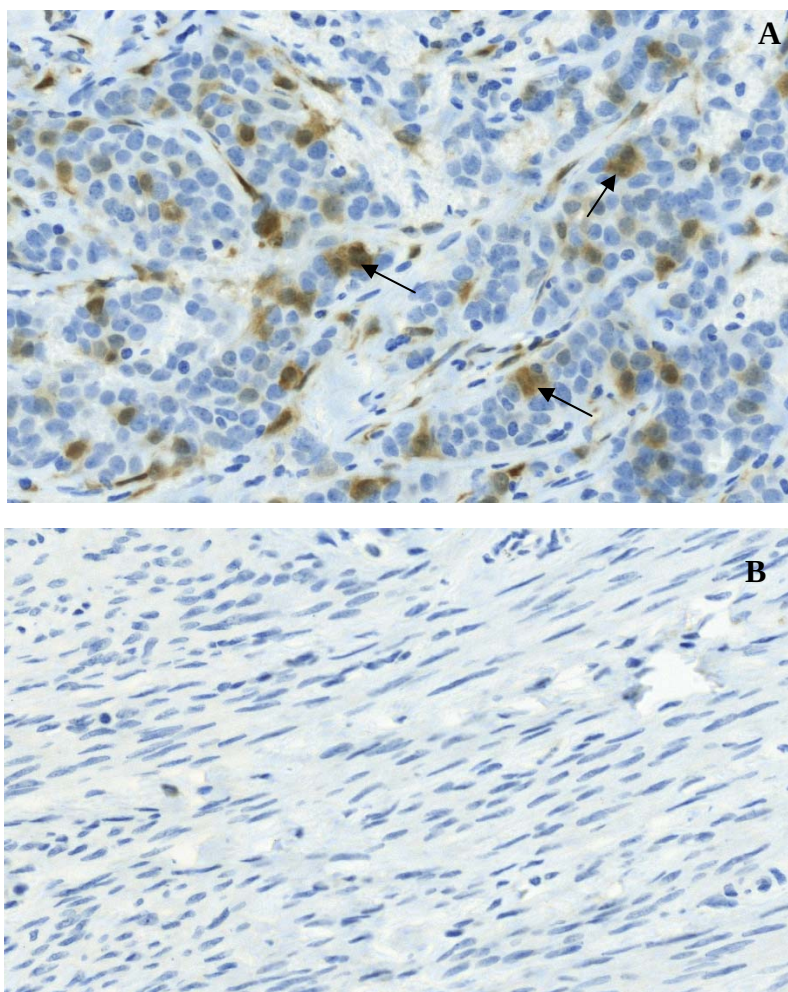


Figura 10 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína p16Ink4a, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 61 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação nuclear da proteína p16Ink4a (setas). B) Corte histológico de um sarcoma fusocelular de parede torácica diagnosticado aos 44 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína p16Ink4a.

Dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*, quatro foram classificados como positivos para a expressão da proteína p16Ink4a (4/13), dois originados em pacientes

portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*, um caso ocorreu em uma paciente portadora da mutação germinativa p.T125T em *TP53* e outro caso em um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11 (del ex 5-11) no gene *TP53*. Seis tumores foram negativos para a expressão proteica de p16Ink4a (6/13), cinco provenientes de pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* e um de uma paciente portadora da mutação IVS8+1G>A no gene *TP53*. Em três amostras, a IHQ foi inconclusiva (3/13) (Tabela 11).

Já dentre as amostras provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53*, 15 foram positivas para a marcação nuclear de p16Ink4a (15/27). Onze amostras foram classificadas como negativas para a expressão proteica de p16Ink4a (11/27). A IHQ para detecção de p16Ink4a foi inconclusiva para somente uma amostra (1/27) (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína p16Ink4a.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	4 (4/13)	15 (15/27)	19
Negativo	6 (6/13)	11 (11/27)	17
Inconclusivo	3 (3/13)	1 (1/27)	4
Total	13	27	40

5.3.9 Expressão proteica da proteína pRb

As 40 amostras disponíveis para esse estudo foram submetidas ao experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína pRb. Em somente uma amostra verificou-se a proteína pRb no núcleo das células neoplásicas (1/40). Essa foi classificada como positiva para a expressão proteica de pRb (Figura 11A). Trinta e sete amostras foram negativas para a expressão proteica de pRb (36/40), pois nesses casos não foi possível verificar a presença nuclear dessa proteína (Figura 11B). A IHQ para detecção da proteína pRb foi inconclusiva em duas amostras devido à ausência de material suficiente para a análise (2/40).

Nenhum dos 13 tumores provenientes dos pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* foi classificado como positivo para pRb. Para dois tumores originados na mesma paciente portadora da mutação p.R337H, a IHQ para a proteína pRb foi inconclusiva (2/13). Os demais 11 tumores desse grupo foram negativos para a expressão proteica de pRb (11/13) (Tabela 12).

Referindo-se aos 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53*, somente um foi classificado como positivo para a expressão proteica de pRb (1/27). Os demais 26 tumores foram negativos para a IHQ de pRb (26/27) (Tabela 12).

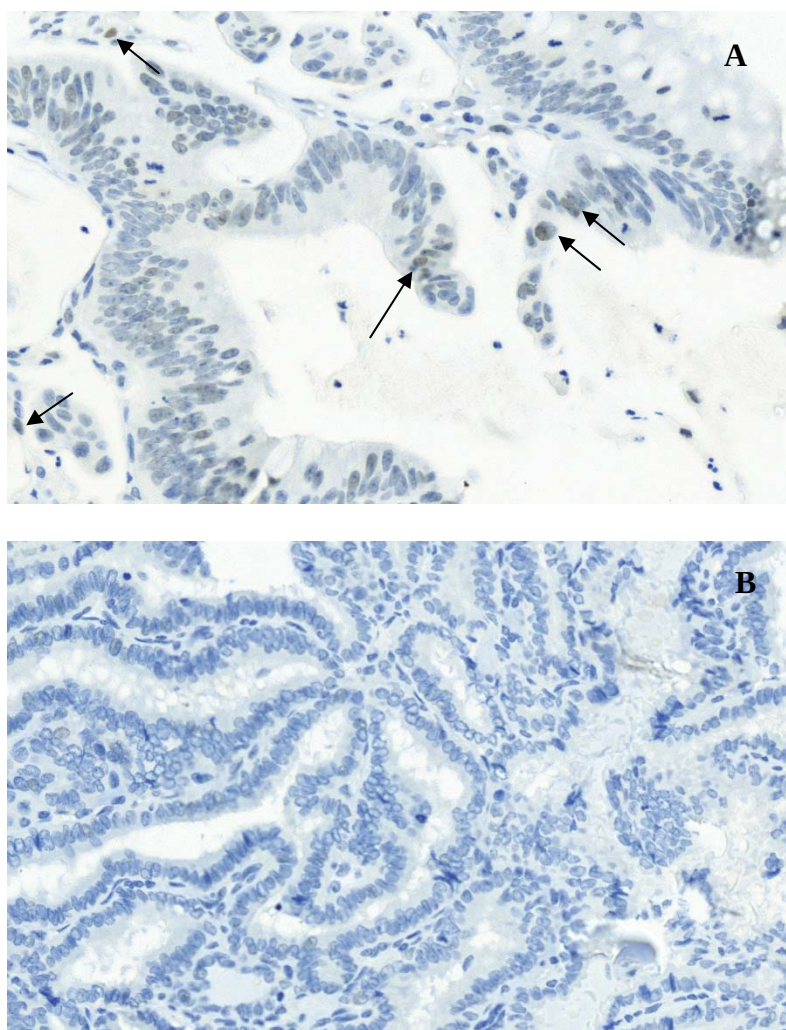


Figura 11 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pRb, aumento de 40x. A) Corte histológico de um adenocarcinoma tubular de cólon diagnosticado aos 68 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, em que pode observar marcação nuclear da proteína pRb (setas). B) Corte histológico de um carcinoma papilífero da tireoide diagnosticado aos 61 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar ausência de marcação para a proteína pRb.

Tabela 12 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pRb.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	0	1 (1/27)	1
Negativo	11 (11/13)	26 (26/27)	37
Inconclusivo	2 (2/13)	0	2
Total	13	27	40

5.3.10 Expressão proteica da proteína mlh1

A IHQ para a detecção nuclear de mlh1 foi realizada nos 40 tumores disponíveis. Em 25 foi possível detectar a proteína mlh1 no núcleo das células neoplásicas (25/40). Portanto, esses tumores foram classificados como positivos para a expressão proteica de mlh1 (Figura 12A). Em 11 tumores a proteína mlh1 não foi detectada (11/40) e, por isso, esses foram negativos para a expressão da proteína mlh1 (Figura 12B). A IHQ para mlh1 foi classificada como inconclusiva em quatro tumores (4/40), pois não havia material suficiente para a análise.

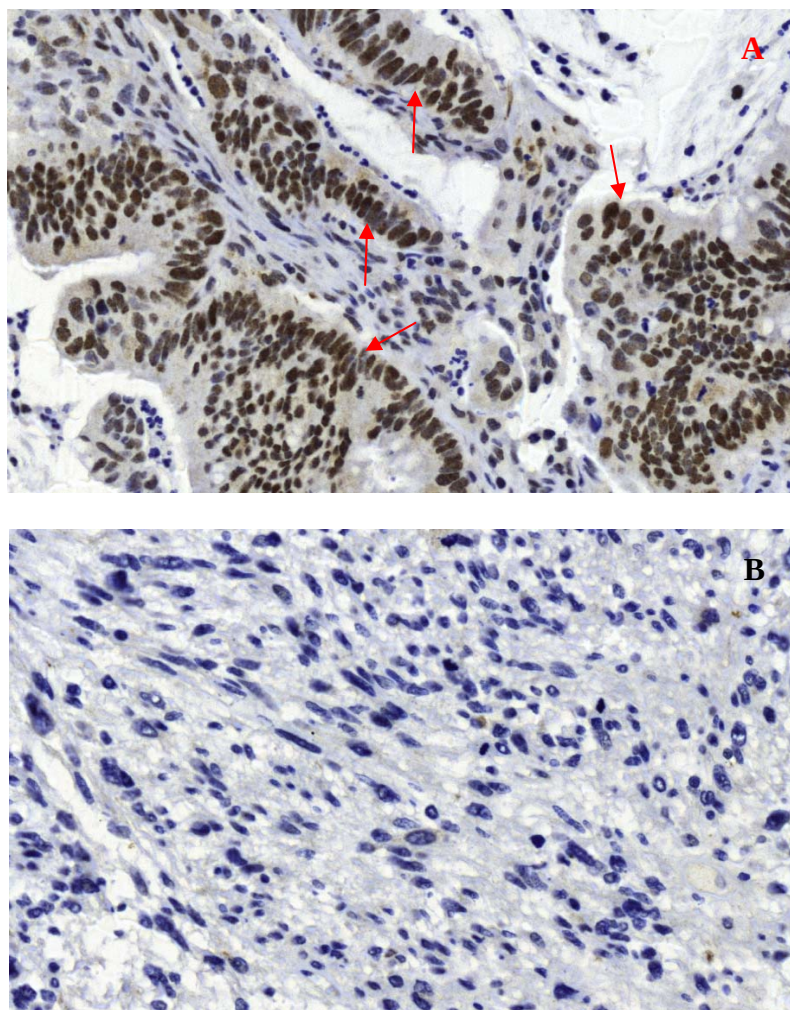


Figura 12 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína mlh1, aumento de 40x. A) Corte histológico de um adenocarcinoma tubular de cólon diagnosticado aos 68 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação nuclear da proteína mlh1 (setas). B) Corte histológico de um sarcoma pleomórfico de alto grau diagnosticado aos 32 anos em uma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53*, em que pode observar ausência de marcação para a proteína mlh1.

Com relação aos 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*, nove foram positivos para a expressão de mlh1 (9/13). Em três tumores, dois originados em pacientes portadores da mutação p.R337H e um em uma paciente portadora da mutação p.T125T,

houve perda da expressão proteica de mlh1 (3/13). A IHQ para a proteína mlh1 foi inconclusiva em um tumor desse grupo (1/13) (Tabela 13).

Dentre os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 16 foram positivos para a expressão de mlh1 (16/27). Houve perda de expressão da proteína mlh1 em oito tumores (8/27). Para três tumores desse grupo, a IHQ de mlh1 foi inconclusiva (3/27) (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise proteica por IHQ para a detecção da proteína mlh1.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	9 (9/13)	16 (16/27)	25
Negativo	3 (2/13)	8 (8/27)	11
Inconclusivo	1 (1/13)	3 (3/27)	4
Total	13	27	40

5.3.11 Expressão proteica da proteína msh2

A IHQ para a detecção da proteína msh2 foi realizada em todos os 40 tumores disponíveis para análise. Vinte e seis amostras (26/40) foram classificadas como positivas para a expressão proteica de msh2, pois nessas foi possível verificar a presença nuclear da proteína msh2 (Figura 13A). Em doze dos 40 casos, não foi possível observar a presença nuclear da proteína msh2 e, por isso, esses casos foram classificados como negativos para a expressão proteica de tal marcador (Figura 13B). Em duas amostras (2/40) não havia material suficiente para análise e, por esse

motivo, a IHQ para a detecção da proteína msh2 foi classificada como inconclusiva.

Dentre os 13 tumores originados em pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 10 foram positivos para a expressão proteica de msh2 (10/13). Em três tumores, um proveniente de uma paciente portadora da mutação p.T125T, outro de uma paciente portadora da mutação p.R337H e um de um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11, houve perda da expressão proteica de msh2 (3/13) (Tabela 14).

Dezesseis dentre os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53* foram classificados como positivos para a expressão da proteína msh2 (16/27). Em nove tumores desse grupo, houve perda da expressão proteica de msh2 (9/27). A IHQ para a detecção do marcador msh2 foi inconclusiva em duas amostras (2/27) (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise proteica por IHQ para a detecção da proteína msh2.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	10 (10/27)	16 (16/27)	26
Negativo	3 (3/27)	9 (9/27)	12
Inconclusivo	0	2 (2/27)	2
Total	13	27	40

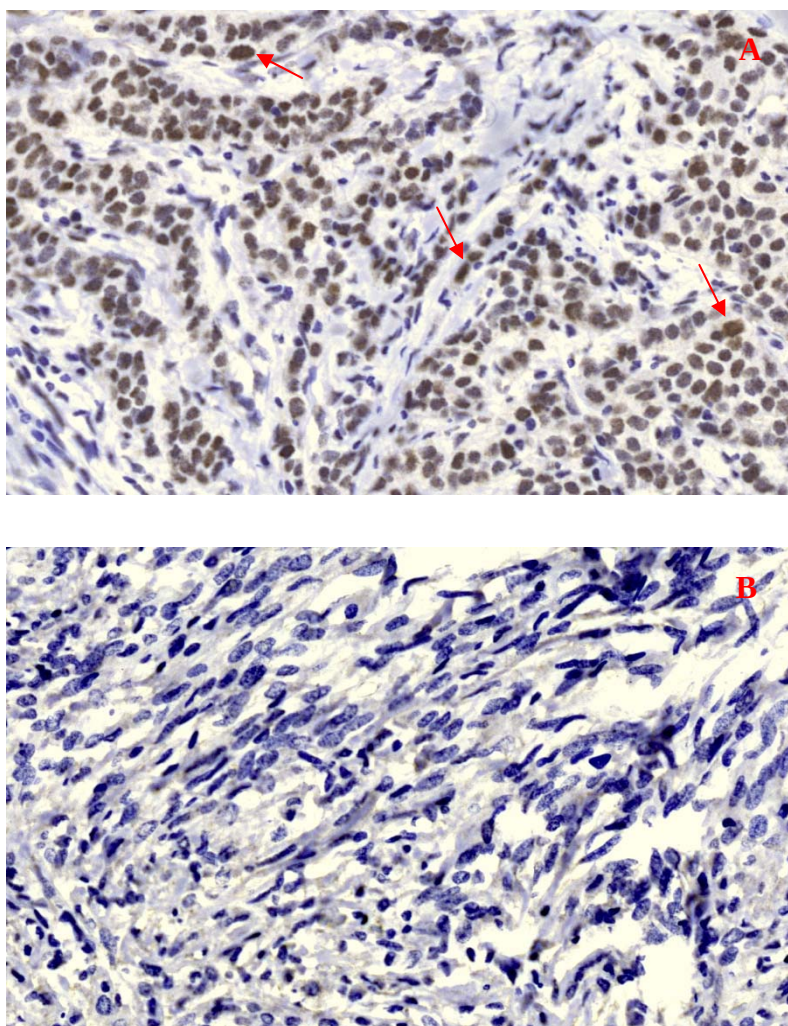


Figura 13 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína msh2, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 32 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, em que se pode observar marcação nuclear da proteína msh2 (setas). B) Corte histológico de um GIST de retroperitônio diagnosticado aos 52 anos em um paciente não portador de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar ausência de marcação para a proteína msh2.

5.3.12 Expressão proteica da proteína msh6

A IHQ para a detecção nuclear de msh6 foi realizada nos 40 tumores disponíveis para esse estudo. Em 28 amostras observou-se a presença nuclear da proteína msh6 (28/40). Por isso, esses casos foram classificados

como positivos para a expressão proteica de msh6 (Figura 14A). Oito amostras foram negativas para a expressão proteica de msh6 (8/40) (Figura 14B). Nessas amostras não foi possível verificar a presença nuclear da proteína msh6. Em quatro amostras a IHQ para a detecção de msh6 foi classificada como inconclusiva devido a material insuficiente para análise (4/40).

Onze dentre os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* foram positivos para a expressão proteica de msh6. Somente um tumor, originado em uma paciente portadora da mutação p.R337H, teve perda da expressão proteica de msh6 (1/13). Em um tumor, a IHQ para a detecção de msh6 foi inconclusiva (1/13) (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise proteica por IHQ para a detecção da proteína msh6.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	11 (11/13)	17 (17/27)	28
Negativo	1 (1/13)	7 (7/27)	8
Inconclusivo	1 (1/13)	3 (3/27)	4
Total	13	27	40

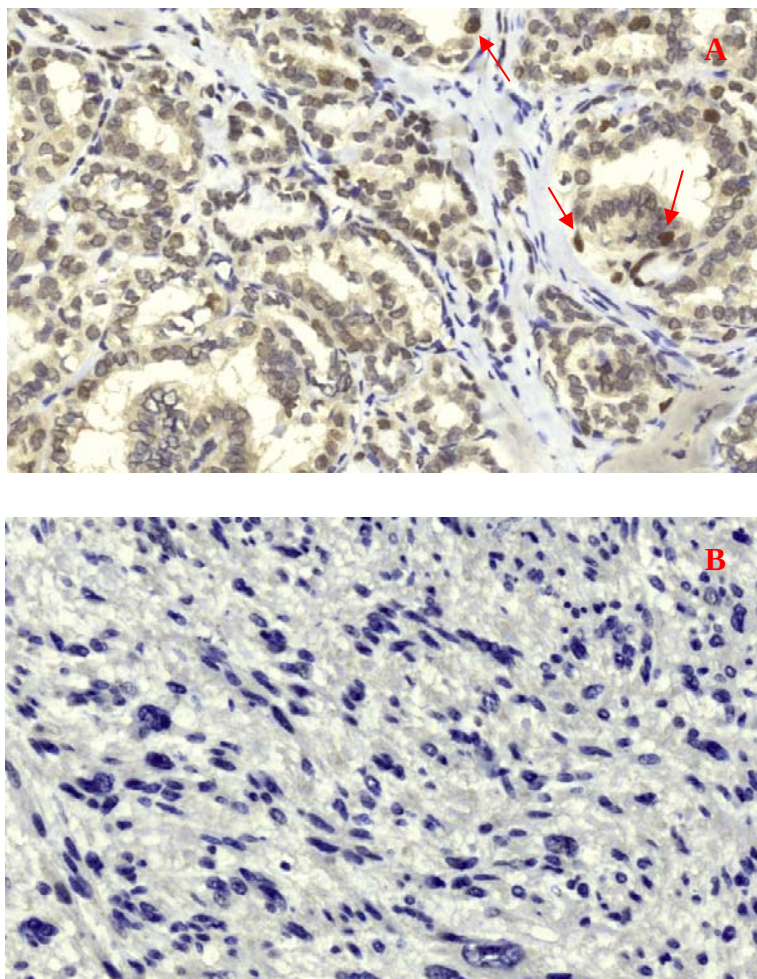


Figura 14 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína msh6, aumento de 40x. A) Corte histológico de um carcinoma papilífero da tireoide diagnosticado aos 61 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode observar marcação nuclear da proteína msh6 (setas). B) Corte histológico de um sarcoma pleomórfico de alto grau diagnosticado aos 32 anos em uma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53*, em que se pode observar ausência de marcação para a proteína msh6.

Já dentre os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa em *TP53*, 17 foram positivos para a expressão de msh6 (17/27) e sete tiveram perda da expressão proteica desse marcador

(7/27). Para três tumores a IHQ de mhs6 foi considerada inconclusiva (3/27) (Tabela 15).

5.3.13 Expressão proteica da proteína pms2

A IHQ para a detecção nuclear de pms2 foi realizada nas 40 amostras disponíveis. Vinte e um tumores foram classificados como positivos para a expressão proteica de pms2 (21/40), pois nesses foi possível observar a presença da proteína pms2 no núcleo das células neoplásicas (Figura 15A). Em 16 tumores, não se observou a presença nuclear da proteína pms2 (16/40). Por essa razão, essas amostras foram classificadas como negativas para a expressão proteica de pms2 (Figura 15B). A IHQ para detecção de pms2 foi inconclusiva em três tumores (3/40), uma vez que nesses não havia material suficiente para a análise.

Avaliando somente os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*, oito mantiveram a expressão proteica de pms2 (8/13), logo, foram positivos para esse marcador. Cinco tumores desse grupo foram negativos para a expressão proteica de pms2 (5/13) (Tabela 14). Dentre os tumores negativos, três são de pacientes portadores da mutação p.R337H, um é de uma paciente portadora da mutação p.T125T e outro é de um paciente portador de deleção entre os éxons 5 a 11 do gene *TP53*.

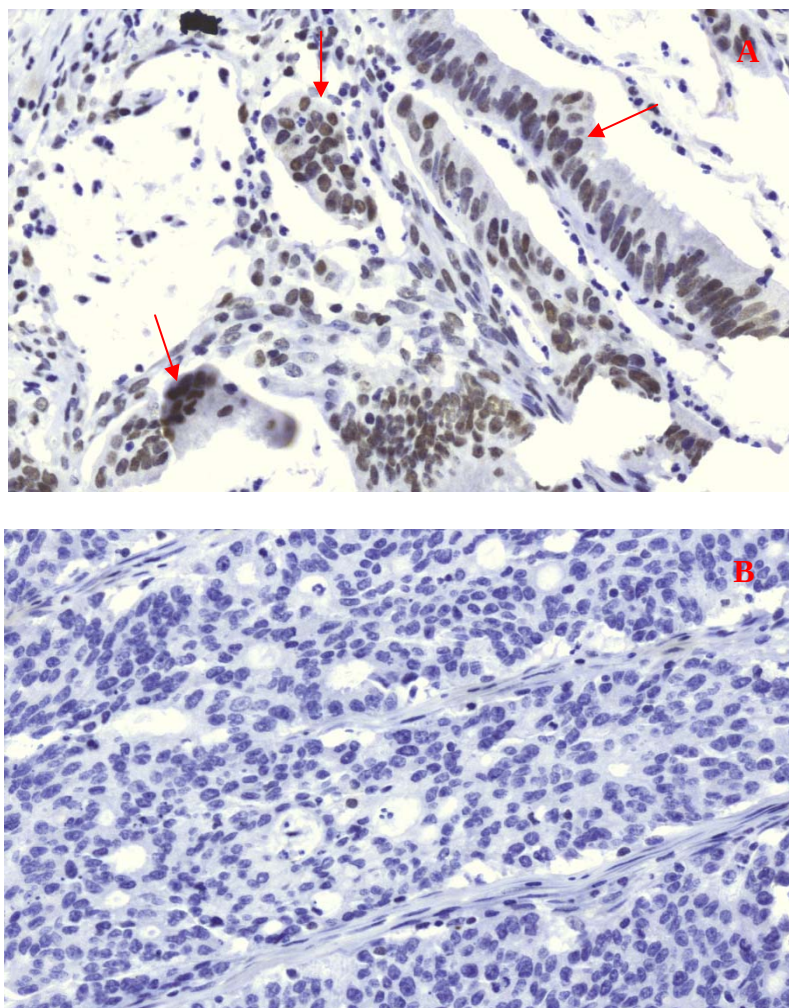


Figura 15 – Fotomicrografia ilustrativa da IHQ realizada para a detecção da proteína pms2, aumento de 40x. A) Corte histológico de um adenocarcinoma tubular de cólon diagnosticado aos 68 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, em que pode observar marcação nuclear da proteína pms2 (setas). B) Corte histológico de um carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticado aos 27 anos em uma paciente não portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, onde se pode verificar ausência de marcação para a proteína pms2.

Dentre os 27 tumores provenientes de pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 13 foram positivos para a expressão proteica de pms2 (13/27) enquanto 11 foram classificados como negativos

para a expressão proteica desse marcador (11/27). Em três amostras desse grupo a IHQ foi classificada como inconclusiva (3/27) (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise proteica por IHQ para detecção da proteína pms2.

Resultado IHQ	Tumores com mutação germinativa em <i>TP53</i>	Tumores sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	Total
Positivo	8 (8/13)	13 (13/27)	21
Negativo	5 (5/13)	11 (11/27)	16
Inconclusivo	0	3 (3/27)	3
Total	13	27	40

6 DISCUSSÃO

A LFS/LFL é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer transmitida de maneira autossômica dominante (MALKIN et al. 1990). Mutações germinativas no gene *TP53* foram identificadas como a principal alteração na LFS/LFL e estão presentes em 70% dos casos da LFS clássica (VARLEY et al. 1997) e em 29% das famílias LFL, segundo os critérios de Chompret (BOUGEARD et al. 2008). Até o momento, mutações germinativas em outros genes supressores de tumor ou genes de reparo não foram descritas como responsáveis pela LFS/LFL. Entretanto, essa hipótese permanece controversa. Diversos genes envolvidos na via de sinalização de *TP53*, responsáveis pela apoptose ou pela parada do ciclo celular, tais como *TP63*, *BCL10*, *BAX*, *CDKN2A*, *PTEN*, *CHEK1* e *CHEK2*, foram considerados candidatos para a predisposição tumoral em famílias LFS/LFL negativas para mutações germinativas em *TP53* (MALKIN 2011). No entanto, ainda não foi possível provar que algum desses genes candidatos estejam correlacionados com a LFS/LFL.

Diferentemente dos tumores esporádicos, tumores LFS/LFL provenientes de pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* podem apresentar características distintas devido à ausência ou presença deficiente do principal gene supressor de tumor funcionante. Desta forma, sugere-se a possibilidade de ocorrência de alterações em outros genes devido à haploinsuficiência de *TP53*. Estudos experimentais em

linhagens celulares demonstram que células carreadoras de um alelo mutante de *TP53* têm respostas alteradas frente aos danos ao DNA (BISCHOFF et al. 1990; BOYLE et al. 1998).

Neste estudo, a análise gênica, cromossômica e proteica dos genes teve como intenção investigar a hipótese de que a haploinsuficiência de *TP53* possa ter impacto nos padrões de alterações somáticas que fundamentam a tumorigênese em pacientes portadores de mutações germinativas nesse gene (CADWELL e ZAMBETTI 2001). A deficiência na função pode predispor esses pacientes à rápida aquisição de defeitos genéticos e epigenéticos em genes relacionados à tumorigênese (MALKIN 2011). Assim, portadores de mutações germinativas no gene *TP53* teriam um fenótipo alterado, isto é, uma característica genética que torna indivíduos propensos a adquirir e acumular mutações nos tumores. Além disso, a deficiência na função de p53 pode levar as células a adquirirem alterações na expressão gênica e/ou alteração na atividade dos componentes da via de sinalização que regulam ou complementam a função de p53.

No trabalho em questão, estudou-se a expressão proteica dos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *PTEN*, *p21*, *RB1*, *BRCA1*, *CDKN2A* (p16Ink4a e p14Arf), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* pela técnica de imunoistoquímica, bem como a presença de alterações cromossômicas e gênicas nos genes *TP53* e *PTEN* pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em 40 tumores provenientes de 29 pacientes com diagnóstico clínico para a síndrome de Li-Fraumeni e sua variante Li-Fraumeni *like*.

Os tumores foram divididos em dois grupos: (1) 13 tumores provenientes de nove pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* e (2) 27 tumores originados de 20 pacientes sem mutação germinativa no gene *TP53* e com diagnóstico clínico para a LFS/LFL. Os resultados encontrados nos dois grupos foram comparados em busca de semelhanças e diferenças entre os grupos. A finalidade desse estudo foi realizar uma análise exploratória nos tumores selecionados através das técnicas acima descritas. Por se tratar de uma amostragem muito pequena, esse estudo teve como limitação a ausência de resultados estatisticamente significantes. No entanto, fornece dados preliminares indicativos de alterações que deverão ser investigadas posteriormente em estudos com um maior número de tumores. Tais pesquisas serão necessárias para verificar se as diferenças na expressão proteica aqui demonstradas por IHQ ocorreram devido a diferenças genéticas ou epigenéticas nos genes testados.

Neste estudo, dentre os diferentes genes avaliados, duas alterações em dois genes distintos, o *PTEN* e o *TP53*, foram marcantes e podem ser importantes na melhor determinação dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese dos pacientes portadores da LFS/LFL.

Um dos resultados mais marcantes são as polissomias encontradas no cromossomo 10. A análise do *PTEN* pela técnica de FISH para o grupo dos 13 tumores com mutação germinativa em *TP53* revelou que quatro apresentaram alterações cromossômicas (4/13). Foram encontradas: (1) polissomia do cromossomo 10, verificada em um carcinoma ductal invasivo em uma paciente de 36 anos portadora da mutação p.R337H, (2) polissomia

do cromossomo 10 com deleção do gene *PTEN*, observada em dois tumores da mesma paciente de 61 anos portadora da mutação p.R337H, sendo um adenocarcinoma *in situ* de pulmão e uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma, e (3) amplificação do gene *PTEN*, observada em um carcinoma ductal *in situ* em uma paciente de 60 anos portadora da mutação p.R337H. É interessante verificar que todos os casos de polissomia do cromossomo 10 com deleção do gene *PTEN* e amplificação gênica do *PTEN* foram verificados em tumores de pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53*. Até o momento, nenhum estudo havia analisado a presença de alterações no FISH do gene *PTEN* em tumores de portadores de mutação germinativa em *TP53*.

A análise do FISH para *PTEN* nos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53* revelou que três apresentaram polissomia do cromossomo 10 (3/27). Cada núcleo apresenta, em média, três cromossomos. Os tumores alterados foram: (1) um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 27 anos, (2) um carcinoma adrenocortical diagnosticado aos 20 anos e (3) um adenocarcinoma tubular de cólon diagnosticado aos 68 anos. As alterações no gene *PTEN* verificadas por FISH nesse estudo são duas vezes mais frequentes em tumores provenientes de portadores de mutação germinativa no gene *TP53* (4/13) quando comparadas com as alterações encontradas em tumores sem mutação germinativa no gene *TP53* (3/27). É possível que a presença de mutações germinativas no gene *TP53* esteja envolvida com as alterações cromossômicas verificadas nesse estudo. A ocorrência de polissomia do

cromossomo 10 com deleção do gene *PTEN* exclusivamente em tumores provenientes de pacientes portadores da mutação p.R337H é um fator que merece análises futuras. Contudo, como a maior parte dos tumores envolvidos são de pacientes com essa mutação, não se sabe se, diante de um aumento da amostra, o mesmo padrão será observado.

Cabe lembrar que a mutação p.R337H é uma alteração que ocorre no domínio de oligomerização do gene *TP53*, fora do domínio onde a maior parte das mutações patogênicas no gene ocorrem. Sabe-se que o p.R337H é um mutante condicional e dependendo do pH fisiológico terá sua atividade restaurada (DIGIAMMARINO et al. 2002). Assim, a ocorrência deste mutante condicional na linhagem germinativa do paciente poderia, frente à polissomia do *PTEN*, ativar a via da tumorigênese. Porém, nossos dados não são suficientes para comprovar essa afirmação devido ao pequeno número da amostra. São necessários mais estudos comparativos em outros tumores de pacientes portadores da LFS/LFL com mutações germinativas no domínio de ligação ao DNA no gene *TP53* para verificar a melhor compreensão desse evento.

As polissomias no cromossomo 10 verificadas nesse estudo levam a cópias adicionais tanto do gene *PTEN* quanto de todos os outros genes localizados no cromossomo 10, como, por exemplo, o gene *ADAM12* (BRAT et al. 2004). Esse também está localizado no cromossomo 10, na posição 10q26, muito próximo ao *PTEN*, encontrado em 10q23.3. *ADAM12* codifica duas proteínas por *splicing* alternativo, uma disintegrina e uma metaloproteinase, que estão frequentemente superexpressas em diversos

tipos de câncer, como, por exemplo, no câncer de bexiga (FRÖHLICH et al. 2011). SHLIEN et al. (2008) identificaram duplicações na região do gene *ADAM12* em estudo onde detectaram aumento no número de CNVs (número de variações de cópias, do inglês *copy number variations*) em indivíduos LFS/LFL portadores de mutação germinativa no gene *TP53*. Análises de IHQ para a detecção das proteínas codificadas por *ADAM12* são necessárias pra comprovar se as alterações encontradas no FISH para o gene *PTEN* nas amostras deste estudo estão correlacionadas com a superexpressão do gene *ADAM12*.

Já no caso do tumor que apresentou amplificação do *PTEN*, várias hipóteses podem ser propostas. Uma delas é a de que o tumor pode ter apresentado um mecanismo de defesa frente à mutação no gene *TP53*, amplificando o gene *PTEN*. Isso levaria a um mecanismo compensatório. Outra hipótese a ser proposta é que pode ter ocorrido um evento de metilação na região promotora desse gene, silenciando sua função supressora de tumor, o que levaria à progressão tumoral. Assim, apesar das cópias adicionais de *PTEN*, as células tumorais teriam a função supressora de tumor desse gene silenciada. A hipermetilação aberrante da região promotora leva ao silenciamento de diversos genes (BAYLIN e HERMAN 2000). Além disso, é o mecanismo mais frequente da perda de função de um gene (KHAN et al. 2004). A metilação das cópias adicionais do gene *PTEN* inativaria sua função supressora tumoral. KHAN et al., em 2004, observaram a metilação de *PTEN* em 30% dentre 45 carcinomas mamários invasivos estudados. A metilação não foi verificada em nenhuma das amostras

normais, inclusive nas obtidas de mulheres idosas, o que indica que a metilação em carcinomas mamários invasivos ocorre especificamente durante a tumorigênese. Como neste estudo não tínhamos o objetivo de avaliar a hipermetilação do gene *PTEN* diante dos resultados obtidos e das observações encontradas na literatura, conclui-se que estudos futuros são necessários para comprovar se o gene *PTEN* encontra-se metilado nos tumores com polissomia do cromossomo 10 e amplificação do gene *PTEN* deste estudo.

Na literatura, diversos trabalhos já foram conduzidos para avaliação do status do gene *PTEN* tanto em tumores quanto na linhagem germinativa de indivíduos portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer. RAZIS et al. (2008) verificaram a deleção do gene *PTEN* em câncer colorretal esporádico. Observou-se pior resposta ao tratamento com cetuximab em pacientes que tinham tumores com deleção de *PTEN* quando comparados com pacientes que tinham tumores com a forma selvagem de *PTEN*. A perda do cromossomo 10 com inativação do gene *PTEN* é frequente nos glioblastomas (KORSHUNOV et al. 2004), sendo também observada em 20 a 30% dos oligodendrogliomas (BIGNER et al. 1999). Ambos os tumores fazem parte do espectro de tumores típicos da LFS/LFL (BIRCH et al. 1994). Mutações somáticas no gene *PTEN* são comuns em cânceres esporádicos em estágio avançado, sendo também encontradas em cerca de 30 a 60% dos carcinomas de próstata (KWABI-ADDU et al. 2001). Está relacionada com a quimiorresistência e com resultados adversos (KORSHUNOV et al. 2004). Também se demonstrou que tanto a perda

hemizigótica quanto a homozigótica de *PTEN* são marcadores prognósticos significativos para o mau resultado clínico em câncer de próstata. Há uma forte associação entre a deleção de *PTEN* e o menor intervalo para a recorrência de PSA (YOSHIMOTO et al. 2007). Não há estudos que relatem a presença de polissomia no cromossomo 10 nos tumores analisados neste trabalho. Mutações germinativas em *PTEN* estão associadas à síndrome de Cowden, uma condição que predispõe indivíduos afetados a hamartomas múltiplos, câncer de mama e de tireoide (LIAW et al. 1997). Porém, até o momento, nenhuma das mutações acima mencionadas foi relacionada à LFS/LFL.

A instabilidade cromossômica já foi verificada previamente em fibroblastos de pacientes LFS/LFL portadores de mutação germinativa em *TP53*. Neste estudo, BOYLE et al. demonstraram, em 1998, que a instabilidade cromossômica é uma característica predominante nesses fibroblastos. JONSDOTTIR et al. em 2011, analisaram tumores de mama com e sem mutação germinativa no gene *BRCA2* por citometria de fluxo e encontraram alterações na ploidia em ambos os grupos analisados. No entanto, no grupo de tumores com mutação germinativa em *BRCA2*, foi verificado um número maior de tetraploidia em comparação com o grupo controle. A maioria dos tumores *BRCA2* positivos que apresentaram tetraploidia pertence ao subtipo luminal. Neste trabalho encontraram-se polissomias dos cromossomos 10 e 17 em alguns tumores. Análises posteriores por citometria de fluxo, CGH (*comparative genomic hybridization*) ou SKY (*spectral karyotyping*), uma técnica que permite a visualização

simultânea de cada cromossomo em diferentes cores, o que facilita a identificação de aberrações cromossômicas, seriam importantes para verificar se os tumores LFS que apresentaram polissomia de um ou ambos os cromossomos acima mencionados são aneuploides para todo o genoma.

A análise de IHQ para a detecção da proteína pten foi realizada nos 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*. Cinco tumores (um sarcoma pleomórfico de alto grau de coxa, um CEC, um osteossarcoma de fêmur, um carcinoma ductal invasivo de mama e uma metástase de leiomiossarcoma) foram negativos para a marcação citoplasmática de pten (5/13). Mutações somáticas em *PTEN* são encontradas em grande número de tumores como glioblastoma, melanoma, carcinomas de mama, da próstata, de ovário, do endométrio e renais, além de câncer de pulmão de células não pequenas (SORIA et al. 2002; SARMADI et al. 2009). Não há evidências de que a presença da mutação germinativa em *TP53* esteja associada à negatividade proteica de pten nesses tumores. Até o momento, não há nenhum estudo que correlacione a expressão proteica negativa de pten com tumores LFS. Em outros cinco tumores (um carcinoma pouco diferenciado de peritônio, um carcinoma adrenocortical, um carcinoma ductal invasivo, um carcinoma ductal *in situ* e um adenocarcinoma *in situ* de pulmão) a IHQ revelou marcação citoplasmática, o que indicou a presença de pten (5/13). A proteína pten é detectada em tecidos normais das mamas (KHAN et al. 2004) e em células epiteliais normais dos brônquios (SORIA et al. 2002). Classificaram-se três tumores como inconclusivos para a expressão proteica de pten devido ao

material ser insuficiente para a análise ou à perda de material durante o processamento.

Já para os 27 tumores originados em pacientes sem mutação germinativa no gene *TP53*, a IHQ de pten revelou que nove foram negativos para a expressão dessa proteína (9/27), 16 positivos (16/27) e 2 (2/27) inconclusivos. A perda da expressão proteica de pten pode ser explicada por diversos mecanismos, dentre eles a diminuição da síntese proteica, o aumento da degradação proteica ou ainda modificações ocorridas após a tradução gênica (SORIA et al. 2002). A perda de função de *PTEN* resulta no aumento de atividade de Akt, o que leva ao crescimento celular aberrante, proliferação e sobrevivência celular com evasão do mecanismo de apoptose, culminando com a migração das células alteradas para outros tecidos (SORIA et al. 2002; SARMADI et al. 2009). Mutações em *PTEN* estão relacionadas ao surgimento de diversas neoplasias e podem ser a explicação para o aparecimento de tumores em pacientes LFS/LFL sem mutação germinativa no gene *TP53*. São necessários mais estudos tanto em tumores quanto nas linhagens germinativas de pacientes não portadores de mutação germinativa no gene *TP53* para verificar se *PTEN* está envolvido com o surgimento ou progressão tumoral nesses casos. Nossos dados são insuficientes para comprovar esse fato. Outros estudos já consideraram *PTEN* como candidato para o aparecimento de tumores LFS típicos em famílias não portadoras de mutação germinativa em *TP53*, porém mutações germinativas neste gene não foram encontradas em pacientes com diagnóstico clínico de LFS/LFL (BURT et al. 1999; BROWN et al. 2000).

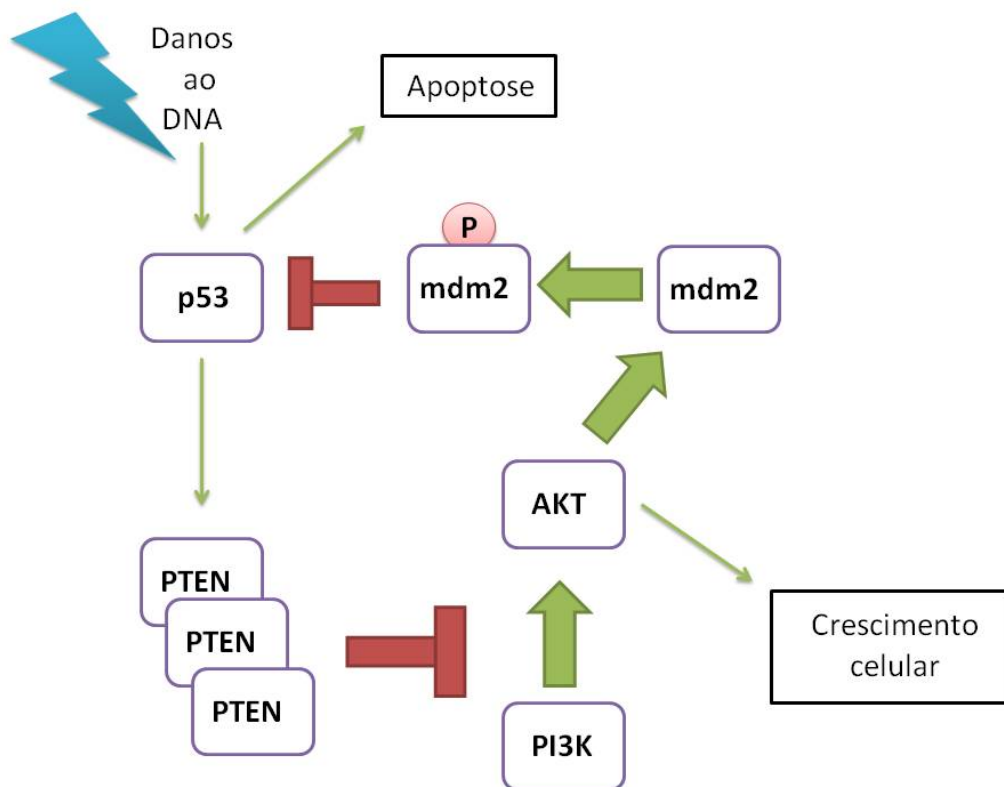
Além das polissomias encontradas no FISH para o gene *PTEN*, outras alterações encontradas no gene *TP53* pelo método de FISH também foram de grande relevância, as polissomias do cromossomo 17 e polissomias do cromossomo 17 com deleção do gene *TP53*.

O gene *TP53* foi analisado através da IHQ e do FISH nos 13 tumores provenientes de nove pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53* e nos 27 tumores provenientes de 20 pacientes sem mutação germinativa em *TP53*. No grupo dos 13 tumores em portadores de mutação, a análise de FISH revelou duas alterações cromossômicas em três tumores (3/13), todos provenientes da mesma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H: (1) polissomia do cromossomo 17 com deleção gênica de *TP53*, observada em um carcinoma ductal *in situ* desenvolvido aos 60 anos, (2) polissomia do cromossomo 17, observada em um adenocarcinoma *in situ* de pulmão e em uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma ocorridos aos 61 anos. A paciente em questão também apresentou polissomia no cromossomo 10 com deleção gênica em *PTEN* no adenocarcinoma *in situ* de pulmão e na metástase de leiomiosarcoma. No carcinoma ductal *in situ* de mama foi ainda encontrada a amplificação do gene *PTEN*. O motivo pelo qual a paciente desenvolveu tantas alterações cromossômicas nos tumores ainda não pode ser esclarecido. Uma hipótese a ser levantada é de que tenha ocorrido alguma alteração adicional em um gene *upstream*, ou seja, localizado acima do *TP53* e do *PTEN* (Figura 16) que pode estar ocasionando o desequilíbrio de replicação cromossômica. Não há nenhum estudo que correlacione alterações cromossômicas e

gênicas no FISH para *TP53* com tumores LFS provenientes de portadores de mutações germinativas em *TP53*.

DEMIRHAN et al. relataram em 2010 a presença de aberrações cromossômicas no cromossomo 17 em tumores de pacientes com câncer de pulmão de pequenas e não pequenas células. Nesse estudo, concluiu-se que danos ao DNA aliados à instabilidade genômica podem ser fatores que contribuem para a progressão do câncer de pulmão.

Dentre os 27 tumores originados nos pacientes sem mutação germinativa em *TP53*, três apresentaram alterações cromossômicas na análise de FISH (3/27): (1) polissomia do cromossomo 17 com deleção de *TP53* observada em um carcinoma ductal invasivo diagnosticado aos 27 anos, (2) polissomia do cromossomo 17, observada em um carcinoma adrenocortical diagnosticado aos 20 anos e (3) deleção do gene *TP53*, observada em um adenocarcinoma mucinoso de cólon diagnosticado aos 68 anos. Deleções do gene *TP53* em adenocarcinomas colorretais e carcinomas de mama já foram demonstradas em estudo anterior (HERRERA et al. 2010). As deleções foram, provavelmente, as responsáveis pelo desenvolvimento desses tumores. A deleção de um dos alelos do gene *TP53* gerou a haploinsuficiência nas células neoplásicas, ficando essas com somente uma cópia do gene. Assim, bastou que ocorresse outra mutação somática no alelo remanescente para que a progressão tumoral fosse iniciada (KNUDSON 2001). A deleção do gene *TP53* é considerada um evento fundamental no processo da transição de uma célula benigna para uma maligna (HERRERA et al. 2010).



Fonte: Adaptado de http://p53.free.fr/p53_info/p53_cancer.html#PTEN.

Figura 16 - via de sinalização da proteína p53.

O gene *PTEN* reprime a via de sinalização de AKT. A proteína akt quinase fosforila a proteína mdm2 e induz sua migração para o núcleo. A proteína mdm2 fosforilada se liga à p53 e a ubiquitina, o que induz sua degradação proteossômica. A repressão da via de AKT por *PTEN* leva ao aumento nuclear da proteína p53, permitindo que os danos ocorridos no DNA sejam reparados. Quando ocorre alguma alteração gênica em *PTEN*, a via de sinalização de AKT não é reprimida, o que aumenta a degradação de p53 via ubiquitinação por mdm2. Assim, a resposta celular frente aos danos ao DNA é interrompida e o crescimento celular é estimulado.

P = fosforilado

No caso do carcinoma adrenocortical, que apresentou polissomia do cromossomo 17, pode ter havido a metilação das cópias extras do gene *TP53*, já que esse é um dos principais mecanismos de inativação gênica (BAYLIN e HERMAN 2000). Desta forma, ocorreria sua inativação por metilação e, consequentemente, a progressão tumoral. O carcinoma de

adrenocortical e o carcinoma ductal inaviso apresentaram alteração tanto em *PTEN* quanto em *TP53*. Novamente, tal resultado corrobora para a hipótese de que haja alguma instabilidade cromossômica em certos pacientes, o que resultaria na desregulação e no descontrole da replicação dos cromossomos no momento da divisão celular. Deve-se ainda ressaltar que existem outros genes importantes localizados no cromossomo 17, que também podem estar alterados nesses tumores tais como *ERBB2*, *BRCA1*, *EGFR*, *NF1* e *HER2/neu* (HERRERA et al. 2010).

A aneuploidia é um dos muitos processos que ocorrem durante a tumorigênese. Pode levar à perda de cromossomos carreadores de genes supressores de tumor ou ao ganho de cromossomos carreadores de oncogenes. O número aberrante de cromossomos pode resultar no desequilíbrio dos níveis proteicos. Tal processo, por sua vez, pode gerar sinais oncogênicos (AYLON e OREN 2011). A inativação de *TP53* provavelmente facilita a tolerância celular pela instabilidade cromossômica. FUJIWARA et al. em 2005, ao estudarem se falhas que geram tetraploides durante a citocinese promoveriam a tumorigênese, verificaram que células tetraploides de camundongos podem iniciar a formação tumoral quando transplantadas em camundongos imunossuprimidos. Esse fato ocorre somente quando há perda de função da proteína p53 nas células em questão. Quando a proteína p53 selvagem é expressa, não há propagação tumoral.

A proteína p53 tem meia-vida curta, de aproximadamente 20 minutos. É rapidamente degradada em células normais. Por essa razão, é detectada

pela IHQ somente em células com mutação deste gene (LEVINE 1997). Formas mutadas da proteína p53 são encontradas em acúmulo no núcleo de células cancerígenas. Isso sugere que essas proteínas possuem um efeito oncogênico, além de perderem sua função supressora tumoral selvagem (OLIVIER et al. 2010).

A IHQ para a detecção nuclear da proteína p53 foi realizada nos 13 tumores provenientes de portadores de mutação germinativa em *TP53*. Nove tumores foram positivos para a expressão proteica de p53 (9/13). Todos os tumores positivos para a proteína p53 são originados de pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H. Conforme o esperado, foi possível detectar a presença da proteína p53 na maioria dos tumores provenientes de portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Assim como para os tumores provenientes de portadores de mutação germinativa em *TP53*, todos os 27 tumores originados em pacientes sem mutação germinativa no gene *TP53* foram submetidos à avaliação proteica por IHQ. Em cinco deles foi verificada a presença nuclear da proteína p53 (5/27). Nesses tumores, pode ter havido uma mutação somática no gene *TP53* que levou à progressão tumoral. Mutações somáticas em *TP53* são encontradas na maioria dos cânceres humanos (LEVINE 1997). A mutação nesse gene inativa sua função reguladora do crescimento celular e causa perda de sua função supressora de tumor, levando assim à progressão tumoral (CADWELL e ZAMBETTI 2001). Células que expressam formas mutantes de p53 possuem maior resistência à quimioterapia e radioterapia (LEVINE 1997; CADWELL e ZAMBETTI 2001).

Dentro do esperado, a proteína p53 foi detectada pela IHQ na maioria dos tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53* (9/13) e em apenas 5/27 dos tumores sem mutação. Dados da literatura corroboram nossos achados, uma vez que somente a proteína p53 mutada pode ser detectada pela IHQ (LEVINE 1997; OLIVIER et al. 2010).

Além dos dois principais resultados obtidos nesse estudo com as polissomias, amplificação e deleção dos genes *PTEN* e *TP53*, vale a discussão dos outros genes pesquisados. Na análise de IHQ para detecção proteica dos genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*), vários padrões foram verificados nos diferentes tumores estudados. A análise da IHQ para a proteína mlh1 nos 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53* revelou que nove expressaram a proteína mlh1 no núcleo de suas células (9/13). Três tumores (um carcinoma pouco diferenciado de peritônio, um sarcoma pleomórfico de alto grau e uma metástase de leiomiossarcoma) foram negativos para a presença de mlh1 (3/13). Para a proteína msh2, a análise da IHQ demonstrou marcação nuclear em dez tumores (10/13) e ausência de marcação em três: um carcinoma pouco diferenciado de peritônio, um sarcoma pleomórfico de alto grau e um osteossarcoma (3/13). Ao analisar a IHQ para detecção nuclear de pms2, verificou-se que oito tumores foram positivos para essa proteína (8/13) e cinco negativos: um carcinoma pouco diferenciado de peritônio, um sarcoma pleomórfico de alto grau, um CEC, um osteossarcoma de fêmur e uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma (5/13). Já para msh6, apenas

um tumor perdeu a expressão proteica: um sarcoma pleomórfico de alto grau (1/13), enquanto a maioria manteve a expressão dessa proteína (11/13).

Com relação aos 27 tumores provenientes de pacientes sem mutação germinativa no gene *TP53*, a IHQ evidenciou a presença da proteína mlh1 em 16 (16/27) e a ausência de mlh1 em oito tumores (8/27). Os sítios de acometimento dos tumores que perderam a expressão proteica de mlh1 são mama, tireoide, osso, adrenocortical, retroperitônio e sigmoide. O resultado da análise de IHQ para a proteína msh2 foi semelhante ao observado para mlh1: 16 tumores foram positivos para a expressão de msh2 (16/27) e nove negativos (9/27). Os sítios de acometimento tumoral das amostras negativas são sigmoide, retroperitônio, tireoide, adrenocortical, mama, ossos e próstata. Para a proteína msh6, 17 tumores mantiveram a expressão nuclear da proteína (17/27) enquanto sete ocorridos nos seguintes sítios: sigmoide, retroperitônio, tireoide, mama, ossos e adrenocortical perderam sua expressão proteica (7/27). Já para a detecção da proteína pms2, a análise de IHQ revelou 13 tumores positivos (13/27) e 11 negativos que acometeram os seguintes sítios: sigmoide, mama, retroperitônio, tireoide, adrenocortical e ossos (11/27). Nossos dados vão contra aos relatados na literatura, uma vez que mutações somáticas nos genes *MSH6* e *PMS2* somam juntas menos de 10% de todas as mutações encontradas nos genes MMR (PAPP et al. 2007; CANARD et al. 2011).

É de suma importância que os pacientes cujos tumores colorretais perderam a expressão proteica de algum dos genes MMR acima mencionados sejam testados para mutações germinativas nos genes

alterados ou no seu complementar, pois pode ser indicativo da presença de mutações germinativas no gene que mostrou a IHQ alterada ou no seu complementar (JACOB e PRAZ 2002). O rastreamento para a síndrome de Lynch através da IHQ seguido por aconselhamento genético aos pacientes cujos tumores colorretais perderam a expressão proteica de um ou mais genes MMR é crucial para detectar e alertar os pacientes em risco (BACKES et al. 2009). O rastreamento regular de famílias portadoras da síndrome de Lynch reduz a incidência do câncer colorretal invasivo e diminui sua mortalidade, visto que a maioria dos casos é diagnosticada em estágios iniciais da doença (JÄRVINEN et al. 2000). Até o momento não existem relatos na literatura que correlacionem a ocorrência de mutações germinativas em MMR a pacientes portadores da LFS/LFL.

Outra proteína analisada por IHQ em todos os tumores disponíveis deste estudo é a p63, codificada pelo gene *TP63*, que pertence à família da proteína p53. Há uma extensa homologia entre diversos domínios estruturais dessas proteínas, porém cada uma possui funções biológicas específicas e distintas (VILGELM et al. 2008; MANGIULLI et al. 2009).

O experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína p63 revelou que nenhum dos tumores foi positivo para sua expressão. No grupo dos 13 tumores provenientes de portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, todos foram negativos para a expressão proteica de p63 (13/13). Já no grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa em *TP53*, considerou-se a IHQ negativa em 26 tumores (26/27) e inconclusiva em um tumor devido à material insuficiente para análise. Uma das suspeitas para o resultado

negativo encontrado nesse estudo é que o anticorpo utilizado seja incapaz de detectar as seis diferentes isoformas proteicas codificadas pelo gene *TP63*. Todavia, para combater essa hipótese, utilizou-se um anticorpo que detecta a região entre os aminoácidos 319-340, comum às seis isoformas da molécula p63.

Não é possível descartar a hipótese de que o gene *TP63* esteja mutado nesses tumores. Entretanto, mutações somáticas e germinativas em *TP63* são extremamente raras em cânceres humanos (MANGIULLI et al. 2009). Ao contrário do que se verificou nesse trabalho, p63 é frequentemente superexpressa durante a tumorigênese. A expressão dessa proteína está associada a diversos subtipos tumorais (ROSENBLUTH et al. 2009). No entanto, o papel de p63 na tumorigênese ainda é controverso (MANGIULLI et al. 2009). Não há dados na literatura que correlacionem a expressão de p63 com tumores LFS/LFL. Nossos dados são insuficientes para afirmar que a perda da expressão proteica de p63 é uma característica dos tumores LFS/LFL. Estudos adicionais são necessários para verificar se a expressão negativa da proteína p63 encontrada nesse estudo está correlacionada com a tumorigênese em pacientes LFS/LFL com e sem mutação germinativa no gene *TP53*.

Outra proteína da família de p53 também foi analisada por IHQ neste estudo, a proteína p73. É codificada pelo gene *TP73*, que assim como o *TP63*, origina diferentes isoformas proteicas (ROSENBLUTH et al. 2009). A proteína p73 tem um papel importante durante a embriogênese para o desenvolvimento de estruturas neurais (BRANDT et al. 2009). Camundongos

nocaute para o gene *TP73* sofrem diversos defeitos durante seu desenvolvimento, o que inclui hidrocefalia, disgenesia hipocampal, infecções e inflamações crônicas (STIEWE e PÜTZER 2002).

A análise de IHQ para detecção nuclear da proteína p73 foi realizada nos 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* disponíveis. Nove tumores foram classificados como negativos para a expressão de p73 (9/13). A expressão negativa da proteína p73 é muito comum em células não neoplásicas, uma vez que os níveis celulares de p73 são tipicamente tão baixos que é difícil detectar a presença dessa proteína em células normais (STIEWE e PÜTZER 2002). Três tumores foram positivos para a expressão da proteína p73 (3/13). Conforme verificado em outros estudos, a proteína p73 está frequentemente superexpressa durante a tumorigênese (ROSENBLUTH et al. 2009). ZAIKA et al. em 1999, ao estudar tumores de mama, não encontraram significância entre a superexpressão de p73 e mutações germinativas em *TP53*. Neste estudo também não foi observada correlação entre a presença de mutações germinativas no gene *TP53* e a superexpressão da proteína p73. Porém, são necessários novos trabalhos com um número maior de amostras LFS para confirmar se não há ligação entre o “status” do gene *TP53* e a superexpressão da proteína p73 nesses tumores.

Com relação aos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, a análise de IHQ para p73 demonstrou que 23 tumores foram negativos para a expressão dessa proteína (23/27) e dois positivos (2/27). Estudos são necessários para verificar se o gene *TP73* encontra-se mutado

nesse grupo de tumores LFS, apesar de mutações nesse gene serem extremamente raras, relatadas em somente 2% de todos os tipos de câncer. Já foram reportados pelo menos 19 polimorfismos no gene *TP73*, mas em nenhum ocorre troca de aminoácidos (ANSELMO et al. 2009).

A IHQ para a detecção da proteína brca1 foi realizada nos 40 tumores disponíveis para este estudo. A presença da proteína brca1 é comumente detectada tanto em células normais quanto em células neoplásicas. Há controvérsia quanto ao sítio de localização celular da proteína brca1. A marcação nuclear, citoplasmática ou de ambos depende do anticorpo utilizado (AL-MULLA et al. 2005). Em nosso estudo, foi encontrada somente marcação citoplasmática.

No grupo dos 13 tumores originados em pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 10 tiveram marcação positiva para a presença da proteína brca1 (10/13). Esse resultado ratifica os dados da literatura, já que brca1 é expressa em diferentes órgãos e tecidos (AL-MULLA et al. 2005; CARVALHO et al. 2007). Somente um tumor, uma metástase pulmonar de leiomiossarcoma proveniente de uma paciente portadora da mutação germinativa p.R337H, perdeu a expressão proteica de brca1 (1/13). São necessários mais estudos para verificar se esse tumor sofreu um silenciamento epigenético no gene *BRCA1*, o que levou ao seu desenvolvimento e progressão.

Já no grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, um resultado semelhante foi observado. A maioria dos tumores foi positiva para a expressão proteica de brca1 (24/27). Somente um tumor, um

adenocarcinoma moderadamente diferenciado de sigmoide, foi classificado como negativo para a presença da proteína brca1 (1/27). Mutações somáticas em *BRCA1* são extremamente raras em câncer de mama e ovário esporádicos (CARVALHO et al. 2007). Apesar disso, esse gene tem um papel importante no desenvolvimento de tumores esporádicos. O silenciamento epigenético é relativamente comum em tumores avançados e já foi verificado em carcinomas ductais invasivos esporádicos (WILSON et al. 1999; STEFANSSON et al. 2011). Assim como para o tumor com mutação germinativa no gene *TP53*, um evento de silenciamento epigenético no gene *BRCA1* pode ter ocorrido. A hipermetilação da ilha CpG do gene *BRCA1* já foi relatada em tumores de mama e está associada ao fenótipo triplo negativo em tumores esporádicos (STEFANSSON et al. 2011). É necessário realizar um experimento que demonstre se o gene *BRCA1* se encontra metilado nesse tumor com o objetivo de validar nosso achado.

O gene *RB1*, cuja inativação está presente em todos os retinoblastomas (HOROWITZ et al. 1990), codifica a proteína pRb. Alguns tumores sólidos não expressam a proteína pRb devido a deleções no gene *RB1* ou expressam uma forma mutada dessa proteína (GALTELAND et al. 2002).

Neste estudo, os 13 tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53* foram submetidos ao experimento de IHQ para a detecção nuclear da proteína pRb. Onze tumores foram classificados como negativos para a expressão dessa proteína (11/13) e dois foram inconclusivos devido à ausência de material para análise (2/13).

Nenhum tumor foi classificado como positivo para a expressão proteica de pRb. A não expressão de pRb é relativamente comum em um grande número de tumores humanos (HOROWITZ et al. 1990; GALTELAND et al. 2002). A não detecção da proteína pRb pode ter ocorrido devido à inativação do gene *RB1* por alterações genéticas, tais como rearranjos cromossômicos que afetam a região 13q14 (deleções ou translocações), trocas de nucleotídeos (substituições, inserções, deleções ou duplicações), deleções de éxons, perda de heterozigose ou hipermetilação da ilha CpG na região promotora do gene *RB1* (BARBOSA et al. 2009). Além disso, uma forma mutante da proteína pRb1 não detectável pelo anticorpo utilizado no estudo pode ter sido expressa nesses tumores (GALTELAND et al. 2002; MAO et al. 2006). Diante desses fatores, são necessários estudos para verificar se alguma dessas alterações propostas estão presentes nos tumores negativos para a expressão da proteína pRb.

A IHQ para detecção de pRb também foi realizada no grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*. Esse grupo apresentou um perfil semelhante ao verificado no grupo dos 13 tumores com mutação germinativa no gene *TP53*. Vinte e seis foram negativos para a expressão proteica de pRb (26/27). Somente um tumor, um adenocarcinoma tubular de cólon, foi classificado como positivo para a presença de pRb (1/27). Esse achado corrobora os dados da literatura, já que a forma fosforilada da proteína pRb tende a se acumular em células humanas com elevada atividade de proliferação e/ou divisão, como células de câncer colorretal (MAO et al. 2006). Mutações germinativas em *RB1* nunca foram

correlacionadas com a LFS/LFL. Entretanto, BURT et al. sugeriram, em 1999, que mutações germinativas no gene *RB1* poderiam estar envolvidas no desenvolvimento dos tumores em famílias LFS/LFL sem mutação germinativa detectada no gene *TP53*.

Também foi sugerido por BURT et al., em 1999, que mutações germinativas no gene *p21* poderiam ser candidatas ao desenvolvimento dos tumores em famílias LFS/LFL sem mutação germinativa detectada no gene *TP53*. O gene *p21* codifica a proteína p21, que é expressa em uma ampla variedade de tecidos, como tireoide, mama, testículos, trato gastrointestinal, próstata, rins e músculos (EL-DEIRY et al. 1995; SINICROPE et al. 1998; ANTTILA et al. 1999). É responsável pela regulação da proliferação celular e inibição das Cdk's em tecidos normais e tumorais (EL-DEIRY et al. 1995).

Neste estudo, utilizou-se a IHQ para a detecção nuclear da proteína p21. No grupo dos 13 tumores provenientes de portadores de mutação germinativa em *TP53*, dois foram positivos para a expressão de p21 (2/13). Um dos tumores positivos para a expressão proteica de p21 foi um adenocarcinoma *in situ* de pulmão. Um estudo demonstrou que a superexpressão de p21 está associada à diferenciação histológica em carcinomas pulmonares (MARCHETTI et al. 1996). Nove tumores foram classificados como negativos para a expressão da proteína p21 (9/13). A baixa expressão da proteína p21 está ligada ao pior prognóstico em câncer de ovário (ANTTILA et al. 1999) e à progressão tumoral em câncer colorretal (SINICROPE et al. 1998). Não há dados na literatura que correlacionem a expressão proteica de p21 com tumores LFS/LFL.

No grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa em *TP53*, quatro foram positivos para a expressão da proteína p21 (4/27) e 22 foram classificados como negativos (22/27). El-Deiry et al. em 1993, citado por ANTTILA et al. (1999 p.1870) verificaram que a expressão de p21 foi detectada somente em células que continham o tipo selvagem da proteína p53. Os quatro tumores deste estudo que apresentaram expressão proteica de p21 possuem o tipo selvagem da proteína p53. Contudo, não se pode afirmar que a expressão normal de p21 esteja restrita a tumores que expressam o tipo selvagem da proteína p53. Nossos dados são insuficientes para essa afirmação. A perda da expressão de p21 pode estar correlacionada com mutações somáticas no gene *p21* nos tumores alterados. Esse fato pode contribuir para a transformação maligna e progressão tumoral (SINICROPE et al. 1998). Um estudo realizado com camundongos demonstrou que a ausência de uma cópia funcional do gene *p21* não é suficiente para o desenvolvimento de tumores. Alterações genéticas adicionais são necessárias para a tumorigênese (DENG et al. 1995).

A expressão negativa da proteína p21 foi observada tanto nos tumores provenientes de portadores de mutações germinativas no gene *TP53* quanto nos tumores sem mutação germinativa nesse gene. Esses dois grupos apresentaram um resultado semelhante: 9/13 dos tumores com mutação germinativa em *TP53* e 22/27 dos tumores sem mutação não expressaram a proteína p21. O esperado seria que mais tumores com mutação germinativa no gene *TP53* não expressassem a proteína p21, já

que essa está localizada *downstream*, ou seja, abaixo de p53 na via de sinalização para a parada do ciclo celular em G1 (WALDMAN et al. 1995). Esse fato pode ser um indicativo de que pacientes LFS/LFL sem mutação germinativa no gene *TP53* têm uma alteração genética localizada *upstream* de *TP53*, como por exemplo, *PTEN*, *AKT* ou *MDM2*.

O gene *CDKN2A* já foi considerado candidato para o desenvolvimento de tumores em pacientes LFS que não possuem mutações germinativas detectadas (BURT et al. 1999). Entretanto, até o momento nenhuma correlação positiva foi estabelecida (BURT et al. 1999; MALKIN 2011). É um dos principais alvos da tumorigênese, encontrando-se inativado em diversas linhagens celulares tumorais e tumores primários, como adenocarcinomas pancreáticos e glioblastomas (KAMB 1995). Mutações germinativas em *CDKN2A* podem resultar na predisposição hereditária ao desenvolvimento de melanoma (HUSSUSSIAN et al. 1994) e câncer de pâncreas (FOULKES et al. 1997). Tal gene codifica duas proteínas por “*splicing*” alternativo, p14Arf e p16Ink4a, que atuam como reguladoras negativas do ciclo celular (BURT et al. 1999).

Neste estudo utilizou-se a técnica de IHQ para a detecção nuclear de ambas as proteínas codificadas pelo gene *CDKN2A* nos 40 tumores disponíveis. A IHQ para a detecção da proteína p14Arf no grupo dos 13 tumores com mutação germinativa no gene *TP53* demonstrou que nenhum foi positivo para a expressão dessa proteína. Onze tumores foram classificados como negativos (11/13) e dois como inconclusivos devido à material insuficiente para análise (2/13). A falta de expressão de p14Arf já foi

relatada em câncer de pulmão de células não pequenas (MORI et al. 2004), porém nunca foi correlacionada com tumores LFS. Esses podem ter passado por um evento de metilação no gene *CDKN2A*, o que levaria à perda da expressão da proteína p14Arf. A hipermetilação da ilha 5' CpG do gene *CDKN2A* já foi observada em tumores pulmonares (SEKIDO et al. 1998). São necessárias análises para verificar se o gene *CDKN2A* se encontra metilado nos tumores LFS deste estudo. Nossos dados são insuficientes para afirmar se a perda de expressão de p14Arf está associada à presença de mutações germinativas no gene *TP53*.

Com relação ao grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, a IHQ para a detecção nuclear de p14Arf revelou um resultado semelhante ao encontrado para os tumores provenientes de pacientes com mutação germinativa em *TP53*: nenhum tumor foi positivo para a expressão dessa proteína. Vinte e seis tumores foram classificados como negativos para a expressão proteica de p14 (26/27) e um como inconclusivo por ausência de material suficiente para análise (1/27). Assim como para os tumores provenientes de pacientes portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, pode ter ocorrido um evento de metilação no gene *CDKN2A*, inativando-o, ou ainda esse gene pode ter sofrido alguma mutação somática nesses tumores. Mutações somáticas no gene *CDKN2A* são comuns em diversos tumores, tais como câncer de pulmão de células pequenas e de células não pequenas (SEKIDO et al. 1998), melanoma (KAMB 1995) e glioblastomas (IZUMOTO et al. 1995).

A IHQ para a detecção nuclear da proteína p16Ink4a, a outra proteína codificada pelo gene *CDKN2A*, foi realizada nos 13 tumores provenientes de portadores de mutações germinativas em *TP53* disponíveis para este estudo. A marcação positiva para a proteína p16Ink4a foi verificada em quatro tumores (4/13). Seis tumores foram classificados como negativos para a expressão de p16Ink4a (6/13) e três como inconclusivos devido à ausência de material para análise (3/13). A proteína p16Ink4a contribui para a parada do ciclo celular mediada pela resposta aos danos no DNA em diversos tecidos (SHAPIRO et al. 1998). A proteína p16Ink4a mutada é incapaz de inibir a progressão celular através de divisões mitóticas inadequadas. Sua importância como reguladora do ciclo celular pode ser demonstrada através da grande variedade de tumores que possuem mutações somáticas no gene *CDKN2A* (FOULKES et al. 1997). A p16Ink4a é comumente inativada durante a progressão tumoral através da metilação da região promotora do gene *CDKN2A* ou através de mutações somáticas ocorridas nesse gene (VON HOLZEN et al. 2010). Mutações somáticas no gene *CDKN2A* são comuns em tumores associados com a LFS (BURT et al. 1999).

Na IHQ realizada no grupo dos 27 tumores sem mutação germinativa no gene *TP53*, 15 tumores foram classificados como positivos para a expressão de p16Ink4a (15/27), 11 como negativos para a expressão dessa proteína (11/27) e um como inconclusivo devido à material insuficiente para análise (1/27). São necessárias análises para verificar se a perda de expressão da proteína p16Ink4a nos tumores deste estudo ocorreu devido a

mutações somáticas no gene *CDKN2A* ou devido a evento de metilação ocorrido na região promotora desse gene. BURT et al. em 1999 tentaram verificar se a presença de mutações germinativas no gene *CDKN2A* eram responsáveis pelo surgimento tumoral em pacientes LFS/LFL sem mutação germinativa diagnosticada no gene *TP53*. Todavia, não se encontrou nenhuma mutação germinativa no gene *CDKN2A* nas 16 famílias testadas. Eles encontraram um polimorfismo no códon 148 do gene *CDKN2A* em uma das famílias estudadas. Esse polimorfismo é prevalente na população e não afeta a função da proteína p16Ink4a (HUSSUSSIAN et al. 1994).

A LFS/LFL é uma síndrome que até recentemente era considerada rara. A ocorrência da LFS/LFL na população brasileira constitui um evento único mundial. Esse fato se deve à mutação fundadora exclusiva da população brasileira no gene *TP53*, a mutação p.R337H. O número de pacientes diagnosticados com essa síndrome no Brasil é o maior mundialmente.

O departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo acompanha o maior número de pacientes LFS/LFL que se tem relato. Devido à alta incidência dessa síndrome no Brasil, foi possível o acesso ao número de tumores selecionados para este estudo.

Até o momento, poucos trabalhos foram realizados para elucidar as características germinativas e somáticas dos pacientes portadores dessa síndrome. Esse é o primeiro estudo que propôs a investigação sistemática sobre o perfil gênico-proteico dos principais genes supressores tumorais e dos genes de reparo do sistema MMR em tumores LFS/LFL com e sem

mutação germinativa diagnosticada no gene *TP53*. Apesar de a amostragem analisada ser pequena, tal investigação fornece o primeiro conteúdo sobre as alterações proteicas, cromossômicas e gênicas nos genes estudados em tumores LFS/LFL provenientes de pacientes portadores e não portadores de mutações germinativas no gene *TP53*. As polissomias encontradas nos cromossomos 10 e 17 podem fornecer melhor compreensão no impacto que as mutações germinativas no gene *TP53* podem ter nos outros genes relacionados à tumorigênese.

Dúvidas permanecem em relação à agressividade dos tumores LFS/LFL. Mecanismos alternativos provavelmente ocorrem nesses tumores e podem levar a um prognóstico diferente do verificado em tumores esporádicos. Não se deve descartar que os genes com proteínas alteradas podem ser alvos de novas drogas que poderão ser empregadas nos pacientes LFS/LFL, oferecendo uma estratégia nova no acompanhamento e tratamento dessa síndrome tão dramática. Estudos futuros com número maior de tumores e com amostras estratificadas por subtipo tumoral são necessários para validar os achados.

7 CONCLUSÕES

- As alterações encontradas no cromossomo 10 são um evento frequente em tumores provenientes de pacientes LFS/LFL portadores da mutação no gene *TP53*, ocorrendo em 4/13 das amostras. Três dos quatro tumores com alteração no cromossomo 10 também apresentaram polissomia no cromossomo 17, verificada em 3/13 das amostras.
- Alterações cromossômicas e gênicas foram verificadas em 3/27 pacientes sem mutação, correspondendo proporcionalmente à metade do encontrado nos pacientes com mutação germinativa em *TP53*. Não foi possível correlacionar os achados de IHQ e de FISH nos tumores analisados.
- A expressão alterada da p21 por IHQ foi verificada em proporções semelhantes em ambos pacientes com e sem mutação germinativa no gene *TP53*.
- A ausência de expressão proteica em pelo menos um dos genes MMR analisados nesse estudo nos tumores colorretais pode ser indicativa da presença de mutações germinativas tanto no gene MMR

alterado quanto no seu complementar. Além disso, pode estar relacionada à tumorigênese nos portadores da LFS/LFL.

- A análise da expressão proteica por IHQ nas proteínas p63, p73, p14Arf, p16Ink4a, brca1 e pRb, em tumores de pacientes LFS/LFL com e sem mutação germinativa no gene *TP53*, não revelou nenhuma alteração relevante.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abouzeid H, Schorderet DF, Balmer A, et al. Germline mutations in retinoma patients: relevance to low-penetrance and low-expressivity molecular basis. **Mol Vis** 2009; 15:771-7.

Achatz MIW, Hainaut P. *TP53* Gene and Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res** 2005; 25:51-7.

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MIASW. **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.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Acharya S, Wilson T, Gradia S, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:13629-34.

Al-Mulla F, Abdulrahman M, Varadharaj G, et al. BRCA1 gene expression in breast cancer: a correlative study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem** 2005; 53:621-9.

Anttila MA, Kosma VM, Hongxiu J, et al. p21/WAF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer. **Br J Cancer** 1999; 79:1870-8.

Anselmo NP, Rey JA, Almeida LO, et al. Concurrent sequence variation of TP53 and TP73 genes in anaplastic astrocytoma. **Genet Mol Res** 2009; 20:1257-63.

Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. **Mol Oncol** 2011; 5:315-23.

Backes FJ, Leon ME, Ivanov I, et al. Prospective evaluation of DNA mismatch repair protein expression in primary endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 2009; 114:486-90.

Barbosa RH, Vargas FR, Lucena E, et al. Constitutive RB1 mutation in a child conceived by in vitro fertilization: implications for genetic counseling. **BMC Med Genet** 2009; 10:75.

Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, et al. Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. **Genes Chromosomes Cancer** 1995; 14:189-95.

Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet** 2000; 16:168-74.

Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, et al. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. **Am J Pathol** 1999; 155:375-86.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

Bischoff FZ, Yim SO, Pathak S, et al. Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization. **Cancer Res** 1990; 50:7979-84.

Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, et al. French LFS working group. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **J Med Genet** 2008; 45:535-8.

Boyle JM, Mitchell EL, Greaves MJ, et al. Chromosome instability is a predominant trait of fibroblasts from Li-Fraumeni families. **Br J Cancer** 1998; 77:2181-92.

Brandt T, Petrovich M, Joerger AC, et al. Conservation of DNA-binding specificity and oligomerisation properties within the p53 family. **BMC Genomics** 2009; 10:628.

Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, et al. Radiation therapy oncology group. analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from radiation therapy oncology group trials. **Neuro Oncol** 2004; 6:96-103.

Brown LT, Sexsmith E, Malkin D. Identification of a novel PTEN intronic deletion in Li-Fraumeni syndrome and its effect on RNA processing. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 123:65-8.

Bujalkova M, Zavodna K, Krivulcik T, et al. Multiplex SNaPshot genotyping for detecting loss of heterozygosity in the mismatch-repair genes MLH1 and MSH2 in microsatellite-unstable tumors. **Clin Chem** 2008; 54:1844-54.

Burt EC, McGown G, Thorncroft M, et al. Exclusion of the genes CDKN2 and PTEN as causative gene defects in Li-Fraumeni syndrome. **Br J Cancer** 1999; 80:9-10.

Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene** 2001; 277:15-30.

Canard G, Lefevre JH, Colas C, et al. Screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: are we doing enough? **Ann Surg Oncol**. 2011; Aug 31.

Carvalho MA, Couch FJ, Monteiro AN. Functional assays for BRCA1 and BRCA2. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:298-310.

Charames GS, Millar AL, Pal T, et al. Do MSH6 mutations contribute to double primary cancers of the colorectum and endometrium? **Hum Genet** 2000; 107:623-9.

Chin L, Pomerantz J, DePinho RA. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products--two pathways. **Trends Biochem Sci** 1998; 23:291-6.

Cho SJ, Zhang J, Chen X. RNPC1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability. **Nucleic Acids Res** 2010; 38:2256-67.

Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. **Cancer Letters** 2006; 241:184-96.

Conde J, Silva SN, Azevedo AP, et al. Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. **BMC Cancer** 2009; 9:344.

Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. **Hum Mol Genet** 1999; 8:185-93.

Darbary H, Stoler DL, Anderson GR. Family cancer syndromes: inherited deficiencies in systems for the maintenance of genomic Integrity. **Surg Oncol Clin N Am** 2009; 18:1–17, vii.

Demirhan O, Taştemir D, Hastürk S, et al. Alterations in p16 and p53 genes and chromosomal findings in patients with lung cancer: fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies. **Cancer Epidemiol** 2010; 34:472-7.

Deng C, Zhang P, Harper JW, et al. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell** 1995; 82:675-84.

Diakoumis E, Sourvinos G, Kiaris H, et al. Genetic instability in renal cell carcinoma. **Eur Urol** 1998; 33:227-32.

DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol** 2002; 9:12-6.

Duijf PH, Vanmolkot KR, Propping P, et al. Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. **Hum Mol Genet** 2002; 11:799-804.

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv** 1995; 25:101-24.

El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res** 1995; 55:2910-9.

Emery J, Barlow-Stewart K, Metcalfe SA. There's cancer in the family. **Aust Fam Physician** 2009; 38:194-8.

Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, et al. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. **Mol Med** 1997; 3:5-20.

Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. **Bull Cancer** 2001; 88:581-7.

Fröhlich C, Albrechtsen R, Dyrskjød L, et al. Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:7359-68.

Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. **Oncogene** 2003; 22:9030-40.

Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. **Nature** 2005; 437:1043-7.

Galteland E, Smedshammer L, Suo Z, et al. Proliferation-dependent expression and phosphorylation of pRB in B cell non-Hodgkin's lymphomas: dependence on RB1 copy number. **Leukemia** 2002; 16:1549-55.

Gardie B, Cayuela JM, Martini S, et al. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 1998; 91:1016-20.

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Mol Cancer Ther** 2002; 1:639-49.

Gazzoli I, Kolodner RD. Regulation of the human MSH6 gene by the Sp1 transcription factor and alteration of promoter activity and expression by polymorphisms. **Mol Cell Biol** 2003;23:7992-8007.

Gibson SL, Narayanan L, Hegan DC, et al. Overexpression of the DNA mismatch repair factor, PMS2, confers hypermutability and DNA damage tolerance. **Cancer Lett** 2006; 244:195-202.

Gonzales-Lamuño D, Fuentes MG. Genetically based diseases. **An Sist Sanit Navar** 2008; 31:105-26.

Gravina S, Lescai F, Hurteau G, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population. **Aging (Albany NY)** 2009; 1:470-80.

Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor supressor PTEN inhibits integrin and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. **J Cell Biol** 1998; 143:1375-83.

Hartley AL., Birch JM, Kelsey AM, et al. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? **Cancer Genet Cytogenet** 1989; 42:221-6.

Hartley AL., Birch JM, Tricker K, et al. Wilm's tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 67:133-5.

Herrera JC, Isaza LF, Ramírez JL, et al. Detection of chromosome 17 aneuploidy and TP53 gene deletion in a broad variety of solid tumors by dual-color fluorescence in situ hybridization (FISH). **Biomedica** 2010; 30:390-400.

Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:2775-9.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nat Genet** 1994; 8:15-21.

Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, et al. Homozygous deletions of p16INK4A/MTS1 and p15INK4B/MTS2 genes in glioma cells and primary glioma tissues. **Cancer Lett** 1995; 97:241-7.

Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. **Biochimie** 2002; 84:27-47.

Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology** 2000; 118:829-34.

Jonsdottir AB, Stefansson OA, Bjornsson J, et al. Tetraploidy in BRCA2 breast tumours. **Eur J Cancer** 2011.

Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. **Trends Genet** 1995; 11:136-40.

Kanber D, Berulava T, Ammerpohl O, et al. The human retinoblastoma gene is imprinted. **PLoS Genet** 2009; 5:e1000790.

Khan S, Kumagai T, Vora J, et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. **Int J Cancer** 2004; 112:407-10.

Kondo E, Horii A, Fukushige S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:1695-702.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7820-6.

Koster MI, Roop DR. Sorting out the p63 signaling network. **J Invest Dermatol** 2008; 128:1617-9.

Khokhar SK, Kommagani R, Kadakia MP. Differential effects of p63 mutants on transactivation of p53 and/or p63 responsive genes. **Cell Res** 2008; 18:1061-73.

Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:157-62.

Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, et al. Haploinsufficiency of the PTEN tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:11563-8.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6.

Levine AJ. p53, The cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill, JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 1988; 48:5358-62.

Li Q, Tang L, Roberts PC, et al. Interferon regulatory factors IRF5 and IRF7 inhibit growth and induce senescence in immortal Li-Fraumeni fibroblasts. **Mol Cancer Res** 2008; 6:770-84.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. **Nat Genet** 1997; 16:64-7.

Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:1680-5.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ Line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Malkin D. Li-Fraumeni syndrome. **Genes Cancer** 2011; 2:475-84.

Mangiulli M, Valletti A, Caratozzolo MF, et al. Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. **Nucleic Acids Res** 2009; 37:6092-104.

Manthey GM, Naik N, Bailis AM. Msh2 blocks an alternative mechanism for non-homologous tail removal during single-strand annealing in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One** 2009; 4:e7488.

Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, et al. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-Cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. **J Invest Dermatol** 2006; 126:1388-95.

Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, et al. p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. **Oncogene** 1996; 12:1319-24.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and Functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 1999; 18:7621-36.

Meyer C, Brieger A, Plotz G, et al. An interstitial deletion at 3p21.3 results in the genetic fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch syndrome family. **Clin Cancer Res** 2009; 15:762-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010 incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 266:66-71.

Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, et al. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol** 2002; 156:885-902.

Mori S, Ito G, Usami N, et al. p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer** 2004; 100:1673-82.

Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al. P-TEN, the tumor supressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. **Proc Natl Acad Sci** 1997; 94:9052-7.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001008.

Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. **World J Gastroenterol** 2007; 13:2727-32.

Parsam VL, Kannabiran C, Honavar S, et al. A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the RB1 gene in retinoblastoma. **J Genet** 2009; 88:517-27.

Peltomäki P. Lynch syndrome genes. **Fam Cancer** 2005; 4:227-32.

Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, et al. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. **J Biol Chem** 1999; 274:32368-75.

Rahner N, Steinke V. Hereditary cancer syndromes. **Dtsch Arztebl Int** 2008; 105:706-14.

Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, et al. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: an exploratory study. **BMC Cancer** 2008; 8:234.

Ruijs MWG, Broeks A, Menko FH, et al. The Contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni Phenotype. **Hereditary Cancer in Clinical Practice** 2009; 7:4.

Rocha RM, Nunes CB, Sanches FS, et al. Rabbit antibodies for hormone receptors and HER2 evaluation in breast cancer. **Rev Assoc Med Bras** 2009; 55:163-8.

Rosenbluth JM, Johnson K, Tang L, et al. Evaluation of p63 and p73 antibodies for cross-reactivity. **Cell Cycle** 2009; 8:3702-6.

Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, et al. The MLH1 -93 G>A promoter polymorphism and genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:835-44.

Sarmadi S, Izadi-Mood N, Sotoudeh K, et al. Altered PTEN expression; a diagnostic marker for differentiating normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. **Diagn Pathol** 2009; 4:41.

Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. **Biochim Biophys Acta** 1998; 1378:F21-59.

Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, et al. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. **Mol Cell Biol** 1998; 18:378-87.

Shlien A, Tabori U, Marshall CR, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:11264-9.

Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J** 2009; 127:46-51.

Sinicrope FA, Roddey G, Lemoine M, et al. Loss of p21WAF1/Cip1 protein expression accompanies progression of sporadic colorectal neoplasms but not hereditary nonpolyposis colorectal cancers. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1251-61.

Soria JC, Lee HY, Lee JI, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1178-84.

Steele N, Finn P, Brown R, et al. Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. **Br J Cancer** 2009;100:758-63.

Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. **Epigenetics** 2011; 6:638-49.

Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? **Cell Death Differ** 2002; 9:237-45.

Studamire B, Price G, Sugawara N, et al. Separation-of-function mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH2 that confer mismatch repair defects but do not affect nonhomologous-tail removal during recombination. **Mol Cell Biol** 1999; 19:7558-67.

Suchy J, Kurzawski G, Jakubowska A, et al. Ovarian cancer of endometrioid type as part of the MSH6 gene mutation phenotype. **J Hum Genet** 2002; 47:529-31.

Szadkowski M, Jiricny J. Identification and functional characterization of the promoter region of the human MSH6 gene. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 33:36-46.

Tabori U, Nanda S, Druker H, et al. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res** 2007; 67:1415-8.

Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome - a molecular and clinical review. **Br J Cancer** 1997; 76:1-14.

Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2003; 21:313-20.

Vilgelm A, El-Rifai W, Zaika A. Therapeutic prospects for p73 and p63: rising from the shadow of p53. **Drug Resist Updat** 2008; 11:152-63.

Vilkin A, Niv Y, Nagasaka T, et al. Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation, and BRAF mutation analysis in sporadic colorectal cancers of different ethnic groups in Israel. **Cancer** 2009; 115:760-9.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

von Holzen U, Chen T, Boquoi A, et al. Evidence for DNA damage checkpoint activation in barrett esophagus. **Transl Oncol** 2010; 3:33-42.

Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. **Cancer Res** 1995; 55:5187-90.

Wicha MS. Development of 'synthetic lethal' strategies to target BRCA1-deficient breast cancer. **Breast Cancer Res** 2009; 11:108.

Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. **Nat Genet** 1999; 21:236-40.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Mol Cell** 1998; 2:305-16.

Yang A, Walker N, Bronson R, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. **Nature** 2000; 404:99-103.

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, et al. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. **Br J Cancer** 2007; 97:678-85.

Yu J, Baron V, Mercola D, et al. A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. **Cell Death Differ** 2007; 14:436-46.

Zawacka-Pankau J, Kostecka A, Sznarkowska A, et al. p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? **Cell Cycle** 2010; 9:720-8.

Zhang Y, Rohde LH, Wu H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. **Curr Genomics** 2009; 10:250-8.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 09 de Setembro de 2010.

**A
Dra. Maria Isabel Waddington Achatz**

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1421/10

“Avaliação da expressão protéica de genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparo em tumores de pacientes com diagnóstico clínico para Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-like”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 31/08/2010, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 08/06/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Carta de justificativa da não apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06
Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo, SP – 01509-900
Telefone: (11) 2189-5000
www.accamargo.org.br

Anexo 2 – Quadro com os resultados obtidos no estudo

Paciente	Sexo	Mutação em TP53	Códon	Tumor disponível	Código tumor	Tipo histológico	Idade do diagnóstico	Aneuploidia	IHQ p53	IHQ p63	IHQ p73	IHQ pten	IHQ brca1	IHQ prb	IHQ p21	IHQ p14	IHQ p16	IHQ msh1	IHQ msh2	IHQ msh6	IHQ pms2
Y0079T007	F	sim	T125T	peritônio	A01Y079T007	carcinoma pouco diferenciado de peritônio	62	não	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo
Y0148T001	F	não	NA	mama	A01Y148T001	carcinoma ductal invasivo	27	sim (polissomia <i>PTEN</i> , polissomia com deleção <i>TP53</i>)	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo
Y0148T001	F	não	NA	linfonodo	A02Y148T001	metástase de carcinoma ductal invasivo	27	não funcionou	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	negativo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo
Y0131T000	F	sim	R337H	Partes moles	A01Y131T000	sarcoma pleomórfico de alto grau	32	não funcionou	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
Y0118T000	F	não	NA	mama	A01Y118T000	carcinoma ductal invasivo	53	não	positivo	negativo	inconclusivo	positivo	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	positivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo
009/03 (Poa01)	F	não	NA	tireóide	A01Poa01	carcinoma papilífero	61	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
009/03 (Poa01)	F	não	NA	mama	A02Poa01	carcinoma ductal invasivo	61	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
Y0004T000	F	não	NA	sigmóide	A01Y004T000	adenocarcinoma moderadamente diferenciado	48	não	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Y0006T000	F	não	NA	mama	A01Y006T000	carcinoma ductal invasivo	32	não	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0042T000	M	não	NA	retroperitônio	A01Y042T000	GIST	52	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
Y0035T000	F	sim	R337H	pele	A01Y035T000	carcinoma epidermóide de couro cabeludo	62	não	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0021T000	M	não	NA	partes moles	A01Y021T000	lipossarcoma mixóide	46	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0021T000	M	não	NA	partes moles	A02Y021T000	lipossarcoma mixóide de baixo grau	47	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	inconclusivo	positivo
Y0012T055	F	sim	R337H	mama	A01Y012T055	carcinoma ductal invasivo	59	não	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0023T001	F	não	NA	tireóide	A01Y023T001	microcarcinoma papilífero não encapsulado, variante folicular	45	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
Y0134T000	F	não	NA	tireóide	A01Y134T000	carcinoma papilífero encapsulado	46	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
Y0012T001	F	sim	R337H	mama	A01Y012T001	carcinoma ductal <i>in situ</i>	60	sim (amplificação <i>PTEN</i> , polissomia com deleção <i>TP53</i>)	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0012T001	F	sim	R337H	pulmão	A02Y012T001	adenocarcinoma <i>in situ</i>	61	sim (polissomia com deleção <i>PTEN</i> , polissomia <i>TP53</i>)	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0012T001	F	sim	R337H	pulmão	A03Y012T001	metástase de leiomiossarcoma	61	sim (polissomia com deleção <i>PTEN</i> , polissomia <i>TP53</i>)	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	inconclusivo	negativo	positivo	positivo	negativo
Y0156T000	F	não	NA	adrenocortical	A01Y156T000	carcinoma adrenocortical	20	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
Y0122T000	F	não	NA	cólon	A01Y122T000	adenocarcinoma tubular de cólon	68	sim (polissomia <i>PTEN</i>)	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0122T000	F	não	NA	cólon	A02Y122T000	adenocarcinoma mucinoso de cólon	68	sim (deleção <i>TP53</i>)	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0043T000	M	não	NA	ossos	A01Y043T000	sarcoma de Ewing	22	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
Y0083T000	F	não	NA	mama	A01Y083T000	carcinoma ductal <i>in situ</i>	44	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
Y0083T000	F	não	NA	mama	A02Y083T000	carcinoma intraductal	44	não	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
Y0083T000	F	não	NA	ossos	A03Y083T000	sarcoma fusocelular	44	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
Y0125T000	F	não	NA	retossigmóide	A01Y125T000	adenocarcinoma bem diferenciado	57	não	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	inconclusivo	positivo	positivo	inconclusivo
Y0125T000	F	não	NA	retossigmóide	A02Y125T000	adenocarcinoma bem diferenciado com atipia de alto grau	57	não	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0020T000	M	sim	del ex 5-11	ossos	A01Y020T000	osteosarcoma de fêmur	18	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	inconclusivo	negativo	inconclusivo	negativo
Y0147T000	F	não	NA	mama	A01Y147T000	carcinoma ductal <i>in situ</i>	35	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0095T000	F	não	NA	ossos	A01Y095T000	meta carcinoma ductal invasivo	36	não funcionou	negativo	negativo	negativo	inconclusivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo
Y0030T001	F	não	NA	vagina	A01Y030T001	neoplasia intraepitelial vaginal	50	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0027T000	F	sim	R337H	mama	A01Y027T000	carcinoma ductal invasivo	36	sim (polissomia <i>PTEN</i>)	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0027T000	F	sim	R337H	ossos	A02Y027T000	meta carcinoma ductal invasivo	38	não funcionou	negativo	negativo	negativo	inconclusivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0094T000	F	não	NA	pele	A01Y094T000	melanoma <i>in situ</i>	57	não	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0014T000	M	não	NA	próstata	A01Y014T000	adenocarcinoma acinar	63	não	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
MT12	F	não	NA	adrenocortical	A01MT12	carcinoma adrenocortical	20	sim (polissomia <i>PTEN</i> , polissomia <i>TP53</i>)	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo
Y0027T006	F	sim	R337H	mama	A01Y027T006	carcinoma ductal invasivo	39	não funcionou	positivo	negativo	negativo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0027T006	F	sim	R337H	ovários	A02Y027T006	metástase de carcinoma ductal invasivo	40	não funcionou	positivo	negativo	negativo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	inconclusivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Y0097T003	F	sim	IVS8+1G>A	adrenocortical	A01Y097T003	neoplasia adrenocortical	6 meses	não	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo