

Detecção dos Polimorfismos 213^{A→G} e 13494^{G→A} no Gene TP53 em Carcinoma Ductal *in situ* de Mama: Relato de Caso

Detection of Polymorphisms 213^{A→G} and 13494^{G→A} in the TP53 Gene in Breast in Situ Ductal Carcinoma: Case Report

La detección de Polimorfismos 213^{A→G} y 13494^{G→A} en el Gen TP53 en Carcinoma Ductal *in Situ* de Mama: Reporte de Caso

Lucas Delmonico¹; Lívia Menezes²; Marco Felipe Franco Rosa³; Najla Marques de Oliveira Mattar⁴; Eliane Barbosa Esteves⁵; Vivian Rabello Areias⁶; Carolina Maria de Azevedo⁷; Gilda Alves⁸

Resumo

Introdução: A caracterização das alterações moleculares em lesões mamárias suspeitas para malignidade ainda não são bem definidas. Sabe-se que a detecção precoce do câncer de mama aumenta consideravelmente as chances de cura. Com isso, a busca por marcadores tumorais, a fim de auxiliar no diagnóstico precoce e prever com confiança se essas lesões são benignas ou malignas, se faz necessária. No processo de carcinogênese, diversas são as alterações de expressão gênica, na qual envolve vários genes-chave que controlam o ciclo celular. Entre os genes, o *TP53* tem sido amplamente pesquisado por apresentar mutações e variantes que podem estar envolvidas na carcinogênese mamária.

Relato de caso: Paciente do sexo feminino, 45 anos, branca, casada, residente do Estado do Rio de Janeiro com carcinoma ductal *in situ* grau 2, multifocal. Lesão positiva para os receptores hormonais de estrogênio e progesterona, com ausência de mutação somática e com presença dos variantes 213^{A→G} e 13494^{G→A} no éxon 6 e intron 6 do gene *TP53*. **Conclusão:** Embora tenham sido considerados individualmente neutros, não existem estudos que tenham avaliado o efeito sinérgico dos variantes 213^{A→G} e 13494^{G→A}.

Palavras-chave: Humanos; Feminino; Neoplasias da Mama-patologia; Genes p53; Polimorfismo Genético; Marcadores Biológicos de Tumor

¹ Biomédico. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Rio de Janeiro (RJ), Brasil. *E-mail:* lucasdelmonico@gmail.com.

² Graduanda em Ciências Biológicas. Bacharel pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/ INCA. Rio de Janeiro (RJ), Brasil. *E-mail:* liviademenezes@yahoo.com.br.

³ Graduando em Medicina pela UNIRIO. Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. *E-mail:* marcofelipe20@hotmail.com.

⁴ Graduanda em Medicina pela UNIRIO. Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. *E-mail:* najla.mattar@yahoo.com.br.

⁵ Bióloga. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/ INCA. *E-mail:* elianebesteves@yahoo.com.br.

⁶ Biomédica. Mestre em Biociências Nucleares pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/ INCA. *E-mail:* vrareias@gmail.com.

⁷ Médica. Doutora em Radiologia. PhD pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. *E-mail:* azevedocma@bol.com.br.

⁸ Bióloga. Doutora em Biofísica. PhD pela UFRJ. Laboratório de Genética Aplicada/Departamento de Hematologia/ INCA. *E-mail:* gbrown@inca.gov.br.

Endereço para correspondência: Gilda Alves. Laboratório de Genética Aplicada do INCA. Praça da Cruz Vermelha, 23 - 6º andar - Centro. Rio de Janeiro (RJ), Brasil. CEP 20230-130.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a principal causa de morte entre as mulheres, com uma estimativa de risco para 2012-2013 de 52 casos por cada 100.000 mulheres no Brasil¹.

A busca por marcadores tumorais vem sendo amplamente pesquisada como forma de aperfeiçoar a detecção e aprimorar o tratamento. Contudo, a grande dificuldade da clínica é determinar com segurança quais os marcadores moleculares já descritos no câncer de mama seriam capazes de prever com confiança a detecção dessas lesões que, em muitas vezes, podem ser benignas.

Baseado nesses dados, o gene *TP53* amplamente estudado nas neoplasias mamárias é considerado um forte fator de prognóstico e apresenta flutuações nas taxas de mutação que podem alcançar a 25%². Ainda assim, pode sofrer variação quanto às subclassificações histológicas e moleculares³.

Entre os genes que contêm diversas mutações variantes (*missense*), o gene *TP53* é capaz de gerar uma série de proteínas p53 mutantes, com níveis de atividade variáveis⁴. Em base, o genoma humano possui como um todo cerca de 3,1 milhões de variações de sequências, denominadas polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Entre os validados para o gene *TP53*, alguns parecem remeter alguma alteração funcional à proteína e desencadear o processo de carcinogênese⁵⁻⁷.

Inicialmente descrito por Carbone et al.⁸ em tumores de pulmão e mama, o variante A→C é resultado de um troca de base no codon 213, na região do éxon 6, porém não modifica a codificação da proteína p53. Inicialmente foi descrito pelo autor como fator de susceptibilidade à carcinogênese; porém, logo após sua descoberta, a hipótese foi contestada com diversos estudos que descreveram nenhuma associação de risco⁹⁻¹⁰.

O variante 13494^{G→A} foi inicialmente descrito através da fragmentação de uma região do intron 6 de 107 pares de base (pb) em bandas de 63 pb e 44 pb pela enzima de restrição MspI, resultado de uma troca de base no nucleotídeo 1394^{T→C}¹¹⁻¹³.

Os polimorfismos, 213^{A→G} e 13494^{G→A} são validados pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) e podem ser acessados pelo banco de dados <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. São considerados polimorfismos neutros, logo, não promovem alteração funcional da proteína p53.

Relatamos um caso de paciente com carcinoma ductal *in situ* grau 2, multifocal com achado molecular desses dois polimorfismos para o gene TP53.

RELATO DO CASO

A participação da paciente foi realizada pela autorização e assinatura da mesma no Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido (TCLE). A pesquisa possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) – Rio de Janeiro (RJ) – 07/2007. Paciente do sexo feminino, 45 anos, parda, casada, profissional do lar, residente do Estado do Rio de Janeiro. Histórico de menarca aos 10 anos de idade, duas gestações, sem histórico de aborto e período de amamentação de dois anos e oito meses. Usuária de contraceptivo oral dos 16 aos 26 anos e dos 28 a 37 anos. Laqueadura no ano de 2001, com interrupção do uso do contraceptivo. Negou terapia hormonal e declarou-se ser etilista e tabagista. Relato de câncer na família, hepático e intestinal, tio e avó paterna, respectivamente.

Mama direita e mama esquerda sem nódulos palpáveis, com fluido mamilar de média intensidade, periareolar e inframamária, com períodos súbitos de evasão. Paciente relatou quadro clínico com persistência de dois meses, dezembro de 2010 a janeiro de 2011. Negou uso de medicamentos locais.

Mamografia revelou revestimento cutâneo e complexo areolopapilar sem alterações. Predomínio de tecido adiposo com ausência de nódulos. Detecção de microcalcificações agrupadas no quadrante superior externo da mama direita (MD). Ausência de comprometimento linfonodal axilar. Conclusão mamográfica final: mamas predominantemente adiposas, MD com lesão BI-RADS 4.

Biópsia excisional da MD revelou carcinoma intraductal de alto grau em três ductos, com presença de microcalcificações e necrose central do tipo comedocarcinoma em um ducto. A avaliação imuno-histoquímica foi positiva para estrogênio e progesterona em mais de 75% da lesão mamária, com ausência de imuno-histoquímica para HER-2.

Macroscopia – segmento mamário de MD medindo 13,5x10,5x2,5 cm. Corte untuoso, lobulado e amarelado, com traves brancacentas e áreas pardacentas de permeio. Microscopia revelou carcinoma ductal *in situ* grau 2, multifocal. Padrão cribriforme, sólido e micropapilar, além de microcalcificações e focos de necrose intraluminal. Presença de áreas de hiperplasia ductal atípica e hiperplasia ductal usual. Presença de alterações fibrocísticas no restante do parênquima mamário e margens cirúrgicas livres.

A extração do DNA da lesão foi feita de acordo com Sambrook et al.¹⁴. Para amplificar os fragmentos de interesse do gene *TP53*, foram utilizadas na solução base: 59 µL de água ultrapura e estéril; 20 µL de tampão STR 10X (Invitrogen™); 8 µL de dNTPs (2 mM) (Invitrogen™); 6 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen™); 3,0 µL de cada iniciador (fragmento 1: F-tgttcactgtgccttgact; R-agcaatcagtggaggaatcag; fragmento 2: F-tggtgcccagggtcccag; R-cggagggccactgacaacca; fragmento 3: F-cttgcccacaggtctccaa; R-agggtcagaggcaagcaga; fragmento 4: F-tgggagtagatggagccct; R-agaggcaaggaaagtgata)

concentrados a 10 pmol/ μ L; 1 μ L da enzima DNA polimerase (1 U/ μ L) (Invitrogen™) e 50- 100ng/ μ L de DNA genômico.

No termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller*, a amplificação dos fragmentos foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 2 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE) e posteriormente sequenciados pelo método automático¹⁵. A análise não revelou mutações somáticas que compreendem a região codificante do éxon 5 ao 8. Por outro lado, foi detectada a presença de dois variantes (SNPs) no éxon 6 (Figura 1) e intron 6 (Figura 2). A análise do sequenciamento foi feita comparando-se a sequência referência do gene *TP53* utilizado pelo IARC e podendo ser acessado pelo *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) NC_000017-9. Essa comparação foi feita através dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* e *Sequencher Demo Version da Gene Codes*.

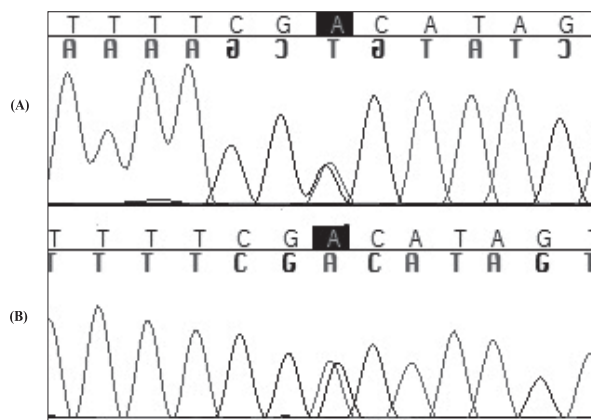


Figura 1. Representação do variante 213^{A→G}. Eletroferograma gerado pelo software *Sequencher Demo Version 5.1*. (A) Sequência no sentido 3'→5' (B) Sequência no sentido 5'→3'. Marcação em negrito ilustra troca de bases A→G e em homozigose (dupla fita)

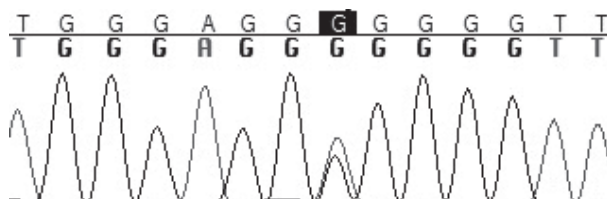


Figura 2. Representação do variante 13494^{G→A}. Eletroferograma gerado pelo software *Sequencher Demo Version 5.1*. (A) Sequência no sentido 5'→3'; Marcação em negrito ilustra troca de bases G→A

DISCUSSÃO

Cerca de 90% dos polimorfismos em *TP53* ocorrem nas sequências não codificantes. Até o momento, o único variante intrônico que parece estar relacionado ao risco de câncer é uma inserção de 16 pares de bases (pb) no intron 3 do gene *TP53*^{16,17}. Já entre a região codificante, o polimorfismo no codon 72 (G412C), localizado no éxon 4, é associado à alterações no processamento do mRNA, e parece ser um dos únicos que consequentemente eleva o risco para a carcinogênese¹⁸. Contudo, o variante G412C parece não estar envolvido somente a fatores de risco¹⁸, mas, por outro lado, responsável pela proteção de defeitos no tubo neural¹⁹.

Estudos sobre os polimorfismos 213^{A→G} e 13494^{G→A} são raros e apresentam baixa frequência⁴. Além disso, poucos são os casos descritos na população brasileira e que tenham relação à influência destes no processo de susceptibilidade ao câncer de mama²⁰⁻²¹.

Mazars et al.²² encontraram uma frequência de 3% para o polimorfismo 213^{A→G} em casos de câncer de ovário na população francesa e 2,6% para o grupo controle. Ainda assim, estendendo o trabalho para casos de câncer de mama e o seu envolvimento hereditário, não encontrou associação de risco. Pilger et al.²¹, estudando casos de patologias do esôfago na região Sul do Brasil e a associação de ambos polimorfismos, não encontraram diferença de frequência entre caso e controle. Em outro trabalho, Simão et al.²⁰, estudando um amostral brasileiro de casos de câncer de mama no Estado do Rio de Janeiro, encontraram um caso de polimorfismo 213^{A→G}.

O caso relatado aqui merece destaque por apresentar duas regiões de polimorfismos pouco frequentes em diferentes regiões do gene *TP53*, sendo uma região com característica homozigota (variante 213^{A→G}). Além desse fator, a paciente apresenta idade relativamente jovem para diagnóstico de câncer, sendo que, entre os fatores de risco para a maioria dos cânceres, a idade avançada é sem dúvida um dos fatores de risco mais discutido, pois o indivíduo provavelmente, ao longo dos anos de vida, vem acumulando mutações. A paciente se declara etilista e tabagista, sabe-se que ambos são fatores evitáveis, sendo o álcool responsável por alterar os níveis circulantes de estrogênio, elevando-se a susceptibilidade para a carcinogênese. Tais fatores podem estar envolvidos até então pela carcinogênese mamária na idade jovem.

Contudo, não se sabe ao certo a que ponto os variantes possam ser considerados neutros quando expressos em um mesmo gene. Não existem estudos que tenham detalhado o efeito sinérgico desses polimorfismos e qual poderia ser a influência de ambos na iniciação e evolução da carcinogênese mamária. Dessa forma, a confirmação de influência desses variantes seria possível somente em estudos populacionais.

CONCLUSÃO

O caso relatado apresentou dois polimorfismos raros no gene *TP53*. Os SNP 213^{A→G} e 13494^{G→A}, embora descritos como variantes neutros, podem sugerir alguma influência de susceptibilidade para a carcinogênese mamária, por isso deve ser feito o *follow up* da paciente atenciosamente.

CONTRIBUIÇÕES

Todos os autores participaram da concepção, planejamento da pesquisa; obtenção, análise, interpretação de dados; redação e revisão crítica do artigo.

FINANCIAMENTO

Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ - 102.558/2012, FAPERJ - APQ1 E-26/110.319/2008 e APQ1 E-26/110.803/2009).

Declaração de Conflito de Interesses: Nada a Declarar.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2011 [acesso 2013 Fev 09]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
2. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: Pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*. 2010; (4):255-66. Epub 2010 Apr 9.
3. IARC TP53 Database. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; c2013-. [atualizada 2013 Jul; acesso 2013 Fev 09]. Disponível em: <http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>
4. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(4):275-83.
5. Hosny G, Farahat N, Hainaut P. TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Lett*. 2009; 275(2): 234-9. Epub 2008 Nov 28.
6. International HapMap Consortium; Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation humanhaplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007; 449(7164):851-61.
7. International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature* 2003; 426(6968):789-96.
8. Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene*. 1991; 6(9):1691-2.
9. Borkowska E, Binka-Kowalska A, Constantinou M, Nawrocka A, Matych J, Kałuzewski B. P53 mutations in urinary bladder cancer patients from Central Poland. *J Appl Genet*. 2007; 48(2):177-83.
10. Schuyer M, Henzen-Logmans SC, van der Burg ME, Fieret EJ, Klijn JG, Foekens JA, et al. High prevalence of codon 213^{ARG→STOP} mutations of the TP53 gene in human ovarian cancer in the southwestern part of the Netherlands. *Int J Cancer*. 1998; 76(3):299-303.
11. de la Calle O, Yagüe J, Gayá A, Romero M, Vives J. Biallelic Bgl II DNA polymorphism of the human p53 oncogene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(1):206.
12. Chumakov PM, Jenkins JR. BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nucleic Acids Res*. 1991; 25:19(24):6969.
13. McDaniel T, Carbone D, Takahashi T, Chumakov P, Chang EH, Pirolo KF, et al. The MspI polymorphism in intron 6 of p53 (TP53) detected by digestion of PCR products. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(17):4796.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. Section 1.21.
15. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat. Acad. Sci USA*. 1977; 74(12):5463-7.
16. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(2):95-107.
17. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 2004; 23(10):1954-6.
18. Xu CT, Zheng F, Dai X, Du JD, Liu HR, Zhao L, et al. Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(9):4305-9.
19. Arora J, Saraswathy KN, Deb R. Effect of maternal Tp53 gene G412C polymorphism on neural tube defects: A study from North India. *Indian J Hum Genet*. 2012; 18(2):177-82.
20. Simão TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, et al. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*. 2002; 101(1):69-73.
21. Pilger DA, Lopez PL, Segal F, Leistner-Segal S. Analysis of R213R and 13494 g a polymorphisms of the p53 gene in individuals with esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus compared with a control group. *Genomic Med*. 2007; 1(1-2):57-63. Epub 2007 May 25.
22. Mazars GR, Jeanteur P, Lynch HT, Lenoir G, Theillet C. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene* 1991; 7(4):781-2.

Abstract

Introduction: The characterization of molecular alterations in breast lesions suspicious for malignancy is not well defined. It is known that early detection of breast cancer greatly increases the chances of cure. Thus, it is required the survey for tumor markers may help establish an early diagnosis and confidently predict whether these lesions are benign or malignant. In the process of carcinogenesis, there are several changes in gene expression, which involves several key genes that control the cell cycle. Among the genes, *TP53* has been widely studied for its mutations and variations, which may be involved in breast carcinogenesis. **Case report:** A female patient, aged 45, white, married, resident of the state of Rio de Janeiro with grade 2, multifocal Carcinoma Ductal *in situ*. Positive injury in estrogen and progesterone hormone receptors, with no somatic mutation and presence of variants 213^{A→G} and 13494^{G→A} in exon 6 and intron 6 of *TP53*. **Conclusion:** Although considered individually neutral, the synergistic effect of 213^{A→G} and 13494^{G→A} variants is still unknown.

Key words: Humans; Female; Breast Neoplasms-pathology; Genes p53; Polymorphism, Genetic; Tumor Markers, Biological

Resumen

Introducción: Las características de las alteraciones moleculares en las lesiones mamarias con sospecha de malignidad todavía no están bien definidas. Se sabe que la constatación temprana de cáncer de mama aumenta en gran medida las posibilidades de cura. Por lo tanto, la búsqueda de señales tumorales para ayudar al diagnóstico precoz y predecir con seguridad si estas lesiones son benignas o malignas, se hace necesaria. En el proceso de la carcinogénesis, son varios los cambios en la expresión génica, lo que implica varios genes-clave que controlan el ciclo celular. Entre los genes, el *TP53* ha sido ampliamente investigado por presentar mutaciones y variaciones que pueden estar implicados en la carcinogénesis de mama. **Caso clínico:** Paciente de sexo femenino, 45 años, raza blanca, casada, residente en el estado de Río de Janeiro con carcinoma ductal *in situ* de grado 2, multifocal. Lesión positiva para receptores de hormonas de estrógeno y progesterona, sin mutación somática y la presencia de variantes 213^{A→G} y 13494^{G→A} en el exón 6 y el intrón 6 del gen *TP53*. **Conclusión:** A pesar de que se hayan considerado de forma individual, neutral, no hay estudios que hayan evaluado el efecto sinérgico de las variantes 213^{A→G} y 13494^{G→A}.

Palabras clave: Humanos; Femenino; Neoplasias de la Mama-patología; Genes p53; Polimorfismo Genético; Marcadores Biológicos de Tumor