



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

YASMIN MARIA NUNES CARDOSO

**ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS ARG72PRO DO GENE TP53 E ILE655VAL DO
GENE HER-2 E O RISCO DE CÂNCER DE MAMA NA POPULAÇÃO DA CIDADE
DE MACAPÁ - AMAPÁ**

**Macapá/AP
2021**

YASMIN MARIA NUNES CARDOSO

**ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS ARG72PRO DO GENE TP53 E ILE655VAL DO
GENE HER-2 E O RISCO DE CÂNCER DE MAMA NA POPULAÇÃO DA CIDADE
DE MACAPÁ - AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Resque
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Artemis Socorro
do Nascimento Rodrigues

Macapá/AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Biblioteca Central/UNIFAP-
Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior –
CRB-2 / 1451

C268 Cardoso, Yasmin Maria Nunes.

Associação dos genótipos arg72pro do gene tp53 e ile655val do gene her-2 e o risco de câncer de mama na população da cidade de Macapá - Amapá / Yasmin Maria Nunes Cardoso. - 2021.

1 recurso eletrônico. 62. folhas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá - Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Macapá, 2022.

Orientador: Rafael Lima Resque.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Farmácia. 2. Gene HER-2. 3. Câncer de mama. I. Resque, Rafael Lima, orientador. II. Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD 23. ed. – 616.99

CARDOSO, Yasmin Maria Nunes. **Associação dos genótipos arg72pro do gene tp53 e ile655val do gene her-2 e o risco de câncer de mama na população da cidade de Macapá - Amapá.** Orientador: Rafael Lima Resque. 2021. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2022.

YASMIN MARIA NUNES CARDOSO

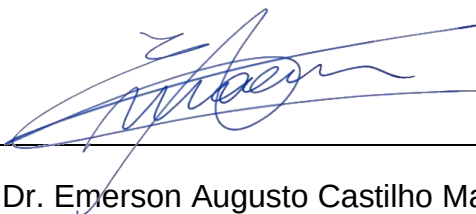
**ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS ARG72PRO DO GENE P53 E ILE655VAL DO
GENE HER-2 E O RISCO DE CÂNCER DE MAMA NA POPULAÇÃO DA CIDADE
DE MACAPÁ - AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de aprovação: ____/____/____



Orientador: Rafael Lima Resque



Avaliador 1: Profº. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins – UNIFAP



Avaliador 2: Profª. Drº Raimundo Nonato Picanço Souto - UNIFAP

*Dedico essa dissertação aos amores que
essa vida me permitiu ter*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Rafael Resque por me permitir andar com meus próprios pés e com seu jeito trazer leveza durante os problemas.

A minha querida coorientadora Artemis por me dar oportunidade de ingressar nesse estudo que se fez meu objetivo maior durante esses anos de mestrado e por todo conhecimento e compreensão durante todo esse tempo.

A todas as mulheres guerreiras que, mesmo passando por um período tão difícil em suas vidas, nos doaram uma parte de sua história para que nosso estudo fosse realizado. E apesar de não termos contato constante temos fé que a saúde de todas será reestabelecida e que não percam as esperanças de dias melhores.

Ao instituto de Câncer- Joel Magalhães, em especial ao Padre Paulo por abrir as portas da instituição para apresentarmos nosso trabalho.

Ao Dr. Mauro Secco e demais médicos e servidores da UNACON por confiarem e por nos ajudarem em nossas coletas.

Ao farmacêutico Diego Yoshio, por ajudar imensamente patrocinando nosso estudo.

A minha amada mãe Jucinéa por não medir esforços para me dar a melhor educação possível em todas as etapas de minha vida.

Ao meu querido namorado Fábio por aguentar todos meus desabaços e lamentos durante este caminho e por me dar forças para permanecer de cabeça tranquila durante este tempo.

Ao colegas de laboratório e de turma que se tornaram amigos ao longo deste tempo por avisarem sobre as dificuldades que ali seriam enfrentadas e pelos momentos de diversão mesmo durante os dias de estresse.

E principalmente a Deus pela oportunidade de ter saúde e força suficiente pra finalizar mais uma etapa de minha vida acadêmica. Obrigada por tudo!

“Não basta ter informação, é preciso saber o que fazer com ela.”

(Mario Sérgio Cortella)

Introdução: Os polimorfismos Arg72Pro (rs1042522) do gene TP53 e Ile655Val (rs1136201) do gene HER2 têm sido relacionados à susceptibilidade a diversos tipos de câncer e diversos estudos evidenciam a sua associação com o maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. **Objetivo:** Investigar a associação dos polimorfismos Arg72Pro e Ile655Val com risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres da cidade de Macapá, localizada na região da Amazônia Legal, norte do Brasil. **Material e Métodos:** Foram analisadas 80 amostras de DNA de mulheres com câncer de mama e 83 amostras de DNA de mulheres sem a doença. Coletadas Instituto de Prevenção do Câncer do Amapá Joel Magalhães – IJOMA e na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima. As análises moleculares foram realizadas através da técnica molecular Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP). As análises estatísticas para investigação das frequências alélicas e genotípicas foram realizadas por meio do software R para os testes qui-quadrado (χ^2) e regressão logística por odds ratios (ORs), onde o valor de P inferior a 0,05 foi definido como estatisticamente significativo. **Resultados e discussão:** A frequência genotípica para os genótipos do gene TP53 foram: Arg/Arg 23,7%, Arg/Pro 47,5% e Pro/Pro 28,5% nos pacientes e nos controles foram Arg/Arg 69,8%, Arg/Pro 19,2% e Pro/Pro 10,8% ($\chi^2 = 34.798$, $p = < 0.0001$). Para o gene HER-2, a frequência dos genótipos Ile/Ile, Ile/Val e Val/Val, respectivamente, foi de 82,5%, 17,5% e 0% nos pacientes e 75,9%, 20,4% e 3,6% nos controles ($\chi^2 = 63.076$, $p = < 0.0001$). Os polimorfismos do gene TP53 Arg72Pro e HER-2 Ile655Val foram estatisticamente associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama nas mulheres da cidade de Macapá. O genótipo homozigoto Val/Val do gene HER-2 não foi observado nas amostras analisadas. **Conclusão:** Este estudo encontrou uma associação significativa entre os genótipos Arg/Pro e Pro/Pro para o polimorfismo rs1042522, no gene TP53 e o genótipo Ile/Val para o rs1136201 no gene HER-2 e o risco de desenvolvimento de câncer de mama, sugerindo a possibilidade de utilização destes polimorfismos como ferramenta para auxiliar em testes preditivos da evolução do câncer de mama em pacientes diagnosticadas.

Palavras-chave: Gene TP53; Gene HER-2; Câncer de mama; Macapá; Brasil.

Introduction: The polymorphisms Arg72Pro (rs1042522) of the TP53 gene and Ile655Val (rs1136201) of the HER2 gene have been linked to susceptibility to different types of cancer and several studies show their association with a higher risk of developing breast cancer. **Objective:** To investigate the association of Arg72Pro and Ile655Val polymorphisms with the risk of developing breast cancer in women from the city of Macapá, located in the Legal Amazon region, northern Brazil. **Material and Methods:** 80 DNA samples from women with breast cancer and 83 DNA samples from women without the disease were analyzed. Collected at the Cancer Prevention Institute of Amapá Joel Magalhães - IJOMA and at the High Complexity Oncology Unit (UNACON) of the Hospital de Clinicas Dr. Alberto Lima. Molecular analyzes were performed using the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism technique (PCR-RFLP). Statistical analyzes to investigate allelic and genotypic frequencies were performed using the R software for the chi-square (χ^2) and logistic regression by odds ratios (ORs) tests, where a P value less than 0.05 was defined as statistically significant. **Results and discussion:** The genotypic frequencies for the TP53 gene genotypes were: Arg / Arg 23.7%, Arg / Pro 47.5% and Pro / Pro 28.5% in patients and in controls were Arg / Arg 69.8 %, Arg / Pro 19.2% and Pro / Pro 10.8% ($\chi^2 = 34,798$, $p = <0.0001$). For the HER-2 gene, the frequency of the genotypes Ile / Ile, Ile / Val and Val / Val, respectively, was 82.5%, 17.5% and 0% in patients and 75.9%, 20.4 % and 3.6% in controls ($\chi^2 = 63,076$, $p = <0.0001$). The TP53 Arg72Pro and HER-2 Ile655Val gene polymorphisms were statistically associated with the risk of developing breast cancer in women in the city of Macapá. The homozygous Val / Val genotype of the HER-2 gene was not observed in the analyzed samples. **Conclusion:** This study found a significant association between the Arg / Pro and Pro / Pro genotypes for the rs1042522 polymorphism in the TP53 gene and the Ile / Val genotype for the rs1136201 in the HER-2 gene and the risk of developing breast cancer, suggesting the possibility of using these polymorphisms as a tool to assist in predictive tests for the evolution of breast cancer in diagnosed patients.

Keywords: Gene TP53; Gene HER-2; Breast cancer; Macapa; Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização cromossômica do gene TP53.	26
Figura 2 – Estrutura da proteína P53.	26
Figura 3 – Localização cromossômica do gene HER-2.....	29
Figura 4 – Produtos da extração de DNA, onde A apresenta as amostras de sangue de pacientes extraídas por Kit Biocience®, e B as amostras de células da mucosa oral por método de Chelex.	33
Figura 5 - Produto da amplificação para o gene TP53 das amostras de pacientes visualizado em transiluminador. Na figura A observa-se a amplificação das amostras extraídas de sangue e na B, a amplificação das amostras extraídas de células de mucosa oral.....	34
Figura 6 – Visualização de fragmentos após PCR-RFLP por digestão com enzima BstUI para o gene TP53 (em Gel de agarose 2%). Amostras 1-7 do grupo de pacientes. M indica o marcador de peso molecular; Amostras 1,5 e 6 apresentam a forma heterozigota para a variante (309pb, 175pb e 134pb); as amostras 2,3,4 e 7 apresentam forma homozigota para variante (175pb e 134pb).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de reagentes para PCR gene P53.....	35
Tabela 2 – Condições PCR P53.	35
Tabela 3 – Descrição de reagentes para RFLP gene P53.....	35
Tabela 4 – Interpretação de resultados gene P53.	36
Tabela 5 – Quantidade de reagentes para PCR gene HER2.	37
Tabela 6 – Condições PCR gene HER2.	37
Tabela 7 – Descrição de reagentes para RFLP gene HER2.	37
Tabela 8 – Interpretação de resultados polimorfismo rs1136201 gene HER-2.....	38
Tabela 9 – Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Arg72Pro em pacientes de câncer de mama e grupo controle do município de Macapá, onde X^2 = qui-quadrado.	39
Tabela 10 – Associação entre o risco de Câncer de Mama e os polimorfismos G72C do gene TP53 e o I655V do gene HER-2.....	40
Tabela 11 – Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Ile655Val em pacientes de câncer de mama e grupo controle do município de Macapá, onde X^2 = qui-quadrado.	42
Tabela 12 – Associação entre polimorfismos Arg72Pro e I655V em paciente de CM e grupo controle.	44
Tabela 13 – Associação das variantes em ambos os polimorfismos no grupo de pacientes e controle.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIOMOL	Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CM	Câncer de Mama
CMF	Câncer de mama de origem familiar
HCAL	Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima
HER 2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGSR	<i>International Genome Sample Resource</i>
IJOMA	Instituto de Câncer Joel Magalhães
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORs	<i>Odds ratios</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RE	Receptor de estrogênio
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RP	Receptor de progesterona
SESA	Secretaria de Estado da Saúde
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SUS	Sistema único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP53	Gene Tumor proteína p53
TTN	Tumores triplo-negativos
UNACON	Unidade de Alta complexidade em Oncologia do Estado do Amapá
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UV	Ultra violeta

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	O CÂNCER.....	16
3.2	CÂNCER DE MAMA.....	17
3.2.1	Epidemiologia do câncer de mama.....	19
3.2.2	O câncer de mama no Estado do Amapá	19
3.2.3	Subtipos moleculares de câncer de mama	20
3.3	BASE GENÉTICA DO CANCER	23
3.3.1	Ciclo celular e pontos de checagem.....	24
3.4	GENES DE INTERESSE PARA O ESTUDO.....	26
3.4.1	Gene Tumor proteína p53 – TP 53.....	26
3.4.2	Gene Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER-2)...	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	LOCAL DE COLETA DE AMOSTRAS.....	31
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	31
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	31
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	32
4.5	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	32
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	33
4.7	GENOTIPAGEM DO CÓDON 72 DO GENE TP53	34
4.8	GENOTIPAGEM DO CÓDON 655 DO GENE HER-2	36
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	GENÓTIPO ARG72PRO GENE TP53.....	39
5.2	GENÓTIPO I655V GENE HER-2.....	41
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES ARG72 PRO E I655V	43
5.4	VARIANTES ARG72 PRO E I655V E UMA BREVE ASSOCIAÇÃO POPULACIONAL	47
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	50
	LISTA DE APÊNDICES.....	58
	LISTA DE ANEXOS	61

O câncer de mama, assim como os demais cânceres, possui origem multifatorial onde fatores genéticos estão intimamente ligados ao seu desenvolvimento. De maneira geral, o câncer de mama tem origem familiar – Câncer de mama familiar (CMF) – ou esporádica, tendo o CMF cerca de 5 a 7% dos casos enquanto 93 a 95% tem origem esporádica. Ou seja, a suscetibilidade a fatores ambientais e hábitos de vida são fatores extremamente importantes para o desenvolvimento desses cânceres (RENAULT, 2017).

O gene TP53 está localizado no cromossomo 17p17.1 (NCBI, 2019). Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear chamada p53 em consequência do seu peso molecular de 53 KiloDaltons (kDa), que é uma proteína supressora de tumor e responde a diversos estresses celulares para regular a expressão dos genes-alvo, induzindo assim a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo (LANE; CRAWFORD, 1979; GOTTLIEB, 2010). Este gene está ligado ao desenvolvimento de cânceres. Mais de 50% dos tumores humanos adquirem uma mutação ou exclusão do gene *TP53* durante sua progressão (St. Jude Children's Research Hospital, 2020).

O receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) é um importante fator prognóstico e preditivo no câncer de mama (CHEN *et al.*, 2011, BORGES *et al.*, 2013). O HER-2 é um proto-oncogene, membro da família dos fatores de crescimento epidérmico, está localizado no cromossomo 17q.12 e codifica um produto proteico de 185 kDa, um receptor transmembrana com atividade de tirosina-quinase (YARDEN *et al.*, 2001, BORGES *et al.*, 2013).

No códon 655 do HER-2 ocorre a substituição da isoleucina (ATC) por valina (GTC), polimorfismo no domínio transmembranar, identificado como rs1136201 e associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama (ABDRABOH *et al.*, 2013), aumentando significativamente a tumorigênese do câncer. Em virtude disso, genótipos específicos no HER-2 estão associados à maior agressividade, pior prognóstico, menor sobrevida livre de doença, rápido crescimento tumoral, aumento do risco de recorrência após cirurgia, resistência à terapia hormonal e pouca resposta à quimioterapia convencional (BORGES *et al.*, 2013).

Diante do exposto, neste estudo foi analisado o DNA extraído de amostras de sangue periférico de 80 mulheres com diagnóstico de câncer de mama e 83 mulheres saudáveis com o objetivo de investigar a associação entre o polimorfismo TP53 do códon 72 e HER-2 do códon 655 e o risco de câncer de mama na cidade de Macapá/AP.

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a correlação entre os genótipos dos polimorfismos Arg72Pro (rs1042522) no gene **TP53** e Ile655Val (rs1136201) no gene **HER2** com o desenvolvimento do câncer de mama na cidade de Macapá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização das técnicas moleculares de PCR, PCR-RFLP para identificação dos polimorfismos Arg72Pro (rs1042522) e Ile655Val (rs1136201) nos genes *TP53* e *HER2*, respectivamente.
- Testar estatisticamente a hipótese da relação dos polimorfismos Arg72Pro (rs1042522) e Ile655Val (rs1136201) com o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres amapaenses.
- Comparar a significância biológica e estatística dos resultados obtidos com outros trabalhos encontrados na literatura.

3.1 O CÂNCER

Atualmente os cânceres são entendidos não apenas como massas insulares de células em proliferação descontrolada como descritas por Willis e colaboradores em 1952, mas sim, como tecidos altamente complexos compostos por diversos tipos celulares que participam de interações heterotípicas, que formam um “microambiente tumoral” necessário para o seu desenvolvimento (HANAHA; WEINBERG, 2020).

Os cânceres formam um conjunto de doenças altamente complexas e com origem multifatorial. Os níveis evolutivos para que uma célula saudável dê origem a um câncer são diversos e inconstantes, e dependem de vários fatores intrínsecos como localização, estado imunológico do paciente e fatores hereditários e fatores externos como exposição a fatores carcinogênicos (CHAMMAS, 2013).

Conceitualmente a carcinogênese pode ser dividida em quatro etapas: iniciação do tumor, promoção, conversão maligna e progressão, onde a metástase encontra-se como extensão da última etapa (AINSLEY, 2003).

O processo de iniciação do câncer demanda de interações entre fatores exógenos como agentes carcinogênicos (químicos - industrializados, físicos - radiações e biológicos - vírus) e endógenos como a suscetibilidade individual, idade, estado hormonal, de forma que tais fatores levam a um aumento do estresse oxidativo podendo assim gerar danos ao DNA desencadeando o processo de formação do tumor. Em organismos não susceptíveis ocorre a manutenção da capacidade celular de responderem a essas injúrias sofridas (NAGAI, 2013).

A promoção ocorre após uma alta taxa de acúmulo de mutações e a expansão clonal de células já iniciadas ocorre, por consequência, o aumento da população de células de estão em risco de novas alterações. Os agentes promotores são substâncias ou fatores caracterizados por sua capacidade de reduzir o período de latência para a formação do tumor após a exposição de um tecido a um iniciador (AINSLEY, 2003).

A conversão maligna é a transformação de uma célula pré-neoplásica em outra que expressa o fenótipo maligno. Um fato interessante é que se um agente

promotor for descontinuado antes que o processo de conversão maligna ocorra as lesões pré-neoplásicas ou benignas podem regredir. Porém quando a transformação acontece a taxa de proliferação encontra-se acelerada, e o processo é mediado pela ativação de proto-oncogenes e pela inativação de genes supressores tumorais. A progressão se caracteriza pela expressão do fenótipo maligno e a tendência das células malignas a adquirirem características mais agressivas. Essa fase é caracterizada pela irreversibilidade das alterações genéticas apresentadas pelas células (AINSLEY, 2003).

Dessa forma, essas doenças são caracterizadas por apresentar cunho genético e multifatorial originada a partir da interação de diversos fatores genéticos e ambientais. Que resultam em um acúmulo de mutações em genes de importância na regulação do ciclo celular. Esse acúmulo de mutações que levam ao desenvolvimento de fenótipos mutantes e da seleção clonal demandam, além da exposição a carcinógenos e fatores predisponíveis, de tempo para a evolução desde a iniciação à neoplasia maligna propriamente dita (HANAHAHAN; WEINBERG, 2020).

Eles estão entre os principais problemas de saúde pública do mundo e está entre as principais causas de mortes prematuras na humanidade (antes dos 70 anos). Tal aumento pode ser justificado pelo aumento da população mundial, maior expectativa de vida da população de maneira geral, que causa um envelhecimento populacional, além de fatores relacionados ao ambiente como hábitos de vida e alimentação (INCA,2020).

3.2 CÂNCER DE MAMA

Os cânceres de mama são causados resumidamente pelo crescimento anormal e desordenado de células do tecido mamário. Surgindo nas células epiteliais dos ductos (85%) ou lóbulos mamários (15%) (OMS,2020). Se apresentam em vários tipos, formas de evolução e graus de agressividade que dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos (BRASIL, 2018), sendo assim, a história natural e o prognóstico variam consideravelmente de paciente para paciente (MARGOLESE, 2003). O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina em todo o mundo, seja em países desenvolvidos ou subdesenvolvidos. É considerado um câncer com relativo bom prognóstico quando diagnosticado e

tratado precocemente, porém quanto mais tardiamente é diagnosticado, geralmente mais difícil se torna o sucesso do tratamento.

A idade é o principal fator de risco para o câncer de mama feminino, as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Outros fatores de risco estabelecidos incluem aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), história familiar de câncer da mama, alta densidade do tecido mamário, obesidade, urbanização e elevação do status socioeconômico, entre outros (BRASIL, 2018).

O CM tem seu prognóstico e tratamento definidos pela localização, idade de apresentação e estadiamento, e ainda fatores de risco que levam em consideração critérios histopatológicos, biológicos e, mais recentemente, moleculares e genéticos (BRASIL, 2018). O estadiamento do CM (aspectos, localização, disseminação, alteração de função de outros órgãos) no Brasil é feito através do sistema TNM da *American Joint Comitee on Cancer* (VIEIRA; JÚNIOR; MENDES, 2017). Esse sistema utiliza três critérios para avaliar o câncer, que são o próprio tumor, os linfonodos ao redor do tumor, e se houve disseminação para outras partes do corpo (HORTOBAGYI *et al.*, 2018).

De maneira geral o câncer de mama tem origem familiar (CMF) ou esporádica. Onde, da totalidade de casos, de 5 a 7% são CMF e 93 a 95% tem origem esporádica, ou seja, a suscetibilidade a fatores ambientais e hábitos de vida são fatores extremamente importantes para o desenvolvimento desses cânceres (RENAULT, 2017).

No câncer de mama esporádico o aparecimento dá-se entre os 65 anos e os 80 anos de idade (LACROIX; LECLERCQ, 2005). No câncer de mama familiar os indivíduos são mais afetados pelo câncer de mama do que o esperado na população geral, a idade de aparecimento de câncer ronda os 55 e os 70 anos de idade, nessas famílias a possibilidade de disseminação de genes herdados para a predisposição genética contribuindo para o câncer de mama familiar é maior, além de outros fatores externos (MORAIS, 2016; LACROIX; LECLERCQ, 2005).

A grande diferença entre um indivíduo com câncer hereditário e um indivíduo com câncer de mama esporádico é que, no primeiro, herda-se estas alterações genéticas dos progenitores em genes de importância no reparo de danos ao DNA,

ou seja, no seu organismo e em todas as suas células, estão presentes as mutações germinativas (herdadas) para aquele determinado gene que podem implicar uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de um processo carcinogênico (OSBORNE, WILSON E TRIPATHY, 2004).

Não se verifica herança genética alterada no câncer de mama esporádico (90% a 95% dos casos de câncer de mama). As mutações genéticas para aquele determinado gene, no caso de ser um câncer esporádico, ocorrem de uma causa espontânea, aparecendo, única e exclusivamente nas células alteradas, ou seja, nas células tumorais, enquanto as restantes células do organismo possuem um material genético livre de alterações. A estas alterações de ocorrência espontânea dá-se o nome de mutações somáticas (LACROIX; LECLERCQ, 2005).

Há evidências que a incidência de câncer em indivíduos que possuem em seu material genético, mutações germinativas, é maior e mais precoce. É importante que os rastreios de diagnóstico de câncer de mama sejam mais cedo, de forma a prevenir e a diagnosticar o mais precoce possível. Se o tratamento for administrado no início de um tumor, este é mais suscetível aos fármacos, e a hipótese de cura é mais provável (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013).

3.2.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente entre mulheres ao redor do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020 cerca de 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama e 685 mil mortes no fim deste ano. Tendo um total de 7,8 milhões de mulheres vivas com diagnóstico de câncer de mama nos últimos 5 anos, se tornando assim, o câncer mais prevalente do mundo.

No Brasil, segundo o INCA é o tipo de câncer mais incidente nas mulheres em todas as regiões (exceto câncer de pele não melanoma). “As taxas são mais elevadas nas regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste) e a menor é observada na região Norte. Em 2021, estima-se que ocorrerão 66.280 casos novos da doença”.

3.2.2 O câncer de mama no Estado do Amapá

O Estado do Amapá está localizado na região Norte do Brasil, possuindo uma área territorial de 142.470,762 km² e uma população estimada de 861.773 habitantes, possuindo um Índice de Desenvolvimento Humano-IDH de 0,708.

Nos anos de 2016-2017 foram diagnosticados oficialmente 82 novos casos no Estado do Amapá segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde (SESA) baseado nos tratamentos realizados na Unidade de Alta complexidade em Oncologia do estado (UNACON).

Um dos maiores problemas, que afeta os números reais de novos casos em estados subdesenvolvidos como o Amapá, é a falta de aparato e estrutura para um correto diagnóstico, acolhimento e tratamento com dignidade para essas pacientes, uma vez que os profissionais acabam trabalhando com o mínimo possível para o atendimento de casos suspeitos de câncer. Onde os próprios profissionais de saúde indicam centros de referência fora do estado do Amapá para o correto diagnóstico dessas mulheres, o que acarreta uma subnotificação no estado.

Apesar de os dados não abrangerem os valores reais de pacientes do Estado, segundo o INCA a estimativa de casos para 2019 no estado para o câncer de mama foram de 50 novos casos para cada 100 mil mulheres. Levando em consideração os números de habitantes do IBGE para o ano de 2018 de 829.494 habitantes, sendo destes aproximadamente 51,5% do sexo feminino (aproximadamente 427.189 mulheres), em estimativas serão diagnosticadas aproximadamente 213 mulheres até o final do ano de 2019 seguindo os números estimados disponibilizados pelo INCA (2019).

O número de casos de Câncer de mama no sexo masculino não foi apresentado por nenhuma das instituições oficiais pesquisadas. Pelo INCA são contabilizados apenas cânceres de mama femininos. Fato esse que não exclui a possibilidade de ocorrência de casos, mesmo que as taxas de incidência em homens serem muito baixas (1% do total de casos) (BRASIL, 2019).

3.2.3 Subtipos moleculares de câncer de mama

Existe uma classificação molecular para o câncer de mama, essa análise é feita através de exame imuno-histoquímico do material biopsiado. A classificação molecular possui divergência entre os subtipos. Alguns marcadores podem ser ao

mesmo tempo prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais e à amplificação e/ou super expressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), entre os subtipos moleculares estão, luminal A, luminal B, Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 - HER2, Basaloide ou Basal-Like e Claudin-low (BC CANCER AGENCY, 2014b).

O subtipo molecular luminal A, que representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau histológico (WEIGEL, 2010). Classificam-se como luminais A os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (CIRQUEIRA, 2011).

Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SORLIE, 2003.; CIRQUEIRA, 2011). A expressão de RE, RP, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (CHEANG, 2009).

O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CHEANG, 2009) e, ainda, associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (KENNECKE, 2010).

O luminal B pode ser classificado em dois subtipos, pode ser caracterizado por expressar positivamente o receptor de estrogênio e negativamente o HER2, no entanto pode expressar positivamente ambos os marcadores, ER e HER2. Ao contrário do que acontece com o luminal A, os valores de Ki-67 estão aumentados, originando uma maior proliferação e um pior prognóstico clínico da doença com este subtipo (MORAIS, 2016)

O subtipo superexpressão de HER2, como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para

receptores hormonais (CIANFROCCA, 2004). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais. Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. Assim sendo, justifica-se a incorporação do status de HER2, juntamente com o status de outros fatores prognósticos, a uma decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica; entretanto, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe), melhora acentuadamente o prognóstico dessas pacientes (RAKHA, 2010).

A positividade de HER2 parece estar associada relativamente, mas não em absoluto, à resistência às terapias endócrinas. Esse efeito pode ser específico para as terapias moduladoras seletivas do receptor de estrogênio, como o tamoxifeno, e talvez não para terapias de depleção de estrogênio, como os inibidores de aromatase, utilizados em mulheres após a menopausa (WOLFF, 2007).

O HER2 positivo representa cerca de 15 a 20% dos casos totais de câncer de mama, é característico pelo elevado valor de expressão do gene HER2. É um subtipo com uma capacidade proliferativa bastante elevada, em que cerca de 40% dos casos apresenta mutações no gene TP53 (EROLES *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2019).

O subtipo basaloide, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, demonstra padrão prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global (CHEANG MCU, 2008). Apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2. Esses pacientes com esse perfil, não se beneficiam do uso do trastuzumabe, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase (IRVIN; CAREY, 2008).

Devido à ausência de imunomarcagem de RE, RP e HER2, tumores basaloides são ainda chamados por alguns autores de “tumores triplo-negativos” (TTN), no entanto, sabe-se que parte dos tumores triplo-negativos não se equivalem aos basaloides, podendo ser mais bem descritos como “tumores triplo-negativos não basaloides” (KENNECKE, 2010; RAKHA, 2010).

O subtipo *Claudin-low* representa entre 12 e 14% de todos os casos de câncer de mama, apresenta um mau prognóstico, uma proliferação genética elevada, associada a mutações em genes como o TP53. Caracteristicamente, este

subtipo não tem um mau prognóstico associado à elevada proliferação celular, uma vez que a taxa de expressão de genes relacionados com a proliferação celular neste subtipo de câncer de mama é baixa (*American Cancer Society*, 2019).

3.3 BASE GENÉTICA DO CANCER

Atualmente é aceito que o surgimento de neoplasias malignas se dá por meio de estágios múltiplos nos quais mutações somáticas e germinativas levam à seleção clonal de descendentes variantes com propriedades de crescimento acelerado e agressivo (PARK; VOGELSTEIN, 2003).

O papel de mutações de origem germinativas no desenvolvimento do câncer foi proposto pela primeira vez por Baveri (1929), em ovos fertilizados de ouriços-do-mar por dois espermatozoides, ele observou divisões mitóticas anormais que levavam a perdas cromossômicas e resultavam no crescimento anormal das gástrulas com massas teciduais atípicas. Tal fato na época não apresentou grande repercussão principalmente pela falta de suporte experimental, em sua hipótese Baveri dizia que o câncer surgia a partir de aberrações celulares que produziam células anormais.

A grande maioria das mutações que levam a processos carcinogênicos são as de origem somática, ou seja, são mutações que se iniciam em linhagens celulares específicas, e que embora apenas uma pequena porção de mutações tenham origem germinativas, estas predispõem não apenas o indivíduo ao câncer, mas também podem ser transmitidas às gerações futuras (PARK; VOGELSTEIN, 2003). É importante salientar que as mutações somáticas são parte do processo de envelhecimento e ocorrem em todo o ciclo de vida dos organismos, sejam espontaneamente ou por respostas a estresses externos, o desenvolvimento de processos neoplásicos se dá pela falha de genes e processos relacionados ao controle do ciclo celular (MILES; TADI, 2021).

Os genes que codificam as proteínas que participam do ciclo associado ao câncer são conceitualmente divididos em proto-oncogenes e genes supressores de tumor (WESTON; HARRIS, 2003). Sendo tanto proto-oncogenes quanto genes supressores tumorais os alvos de mutações para desencadeamento do desenvolvimento do processo carcinogênico (PARK; VOGELSTEIN, 2003).

Os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais são estruturas altamente conservadas durante a evolução podendo ser encontradas desde leveduras até o homem. Os oncogenes são a forma ativa dos proto-oncogenes e podem ser classificados de acordo com as funções de seus produtos de codificação, como receptores de tirosino-quinases, proteínas adaptadoras, segundo mensageiro, proteínas ativadas por mitógenos e fatores de transcrição (NAGAI, 2013). Resumidamente oncogene é qualquer gene que codifique proteínas que participem do mecanismo de transformação celular ou indução de câncer, atuando nas vias positivas do ciclo celular (LODISH *et al.*, 2000).

A conversão de proto-oncogenes em oncogenes pode ocorrer por mecanismos como translocações, amplificação gênica, mutações e eventos epigenéticos. Nos genes supressores tumorais as mutações que levam ao processo carcinogênico são as que acarretam na redução das atividades, inatividade ou perda de função dos produtos de codificação desses genes (NAGAI, 2013).

3.3.1 Ciclo celular e pontos de checagem

Na divisão celular uma célula prestes a se dividir é denominada célula mãe e os produtos dessa divisão são chamados de células filhas. A duração do ciclo celular varia nos diferentes tipos celulares, de minutos (em células embrionárias) até meses (em células de organismos adultos) (SNUSTAD, 2017).

Em diversas fases do ciclo celular ocorrem pontos de checagem (*checkpoint*) onde é verificado se a divisão continuará ou não. Dentre os pontos de checagem, destacam-se os três mais relevantes, que são ponto G1, G2 e M. O ponto G1 é o principal, uma vez que ele ocorre antes da duplicação do material genético; dentre os fatores relevantes neste ponto estão o tamanho da célula, reserva energética para a divisão, sinais moleculares (como sinalização e fatores de crescimento) e integridade do DNA. No ponto de checagem G2, é verificada a integridade do DNA e o processo de replicação, para saber se durante a fase S o DNA foi completamente duplicado, se erros ou danos são detectados e a célula irá pausar e permitir que reparos sejam feitos. Se forem detectados problemas com o DNA, o ciclo celular é interrompido e a maquinaria celular tenta reparar o dano, caso o dano seja

irreparável a célula pode sofrer apoptose, que é a morte celular programada (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014).

O terceiro ponto de checagem é o *Spindle checkpoint*, conhecido como ponto de checagem M ou do fuso. Nesse ponto são examinadas se todas as cromátides irmã estão corretamente ligadas aos microtúbulos do fuso, se um cromossomo está em um lugar errado a célula irá pausar a mitose permitindo que o fuso capture o cromossomo perdido (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014).

Além dos *checkpoints*, existem ainda grupos de moléculas que regulam o ciclo celular, fazendo isso de duas maneiras, uma regulação positiva ou regulação negativa. As moléculas reguladoras podem agir individualmente ou podem influenciar a atividade ou produção de outras proteínas reguladoras, portanto, a falha de um único regulador pode ter quase nenhum efeito no ciclo celular, especialmente se mais de um mecanismo controlar o mesmo evento. Por outro lado, o efeito de um regulador deficiente ou não-funcional pode ser amplo e possivelmente fatal para a célula se vários processos forem afetados (KHODJAKOV; RIEDER, 2009).

Quando fatores como a presença de mutações, polimorfismos herdados, ação de agentes mutagênicos e erros nos processos de reparo do DNA ocorrem em conjunto pode dá-se início a algum tipo processo carcinogênico.

Atualmente, sabe-se que mutações em aproximadamente 21.000 genes são responsáveis pelo crescimento anormal da célula, resultando no câncer, isso devido a erros acumulados durante o ciclo e divisão celular. Tais genes de suscetibilidade codificam componentes proteicos das vias de sinais de transdução, que agem de forma conjunta para o reconhecimento de sinais externos – como os fatores de crescimento pelos receptores de superfícies das células – até a ligação e ativação do promotor nas regiões potenciadoras ao longo dos 24 pares de cromossomos humanos (WATSON, 2013).

Entre as diversas moléculas reguladoras do ciclo celular estão as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs), que são consideradas reguladoras positivas do ciclo celular, uma vez que induzem vias positivas para a proliferação celular (MARTÍNEZ-CARPIO; NAVARRO, 2003). Em contrapartida, existem moléculas que realizam o controle negativo do ciclo celular, onde estão inseridas as proteínas reguladoras negativas (BORGES-OSÓRIO; ROBSON, 2013) essas moléculas são ativas por fosforilação e alterações de conformação quando ocorre dano ao DNA (NORBURY; NURSE, 1992; HIRAO *et al.*, 2002).

Os genes que codificam tais moléculas apresentam grande importância, uma vez que seus produtos desempenham papéis necessários no reparo de danos ao DNA, preservando a integridade do genoma durante o ciclo celular. Por isso uma mutação que provoca alteração na função da proteína, poderia modular o risco para desenvolvimento de câncer (APOUSTOLOU; FOSTIRA, 2013).

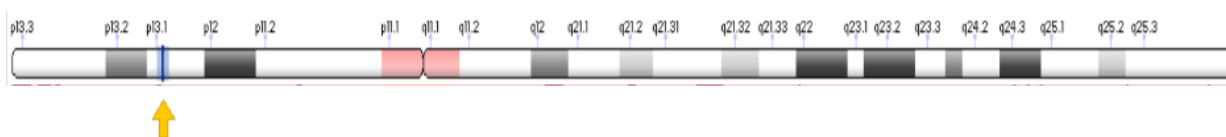
3.4 GENES DE INTERESSE PARA O ESTUDO

Os genes escolhidos para esse estudo estão envolvidos em etapas de regulação do ciclo celular TP53 supressores tumorais (vias negativas), ou participando de vias positivas da proliferação como o HER2 que é um receptor e sinalizador para progressão do ciclo celular.

3.4.1 Gene Tumor proteína p53 – TP 53

O gene está localizado no cromossomo 17 braço curto na posição 13.1 (17p17.1) (Figura 1) (NCBI, 2019), possui 20 Kb e é composto por 11 éxons (Figura x), sendo o primeiro não-codificante, e altamente conservado, apresentando homologia estrutural entre diferentes espécies (ALMEIDA *et al.*, 1999).

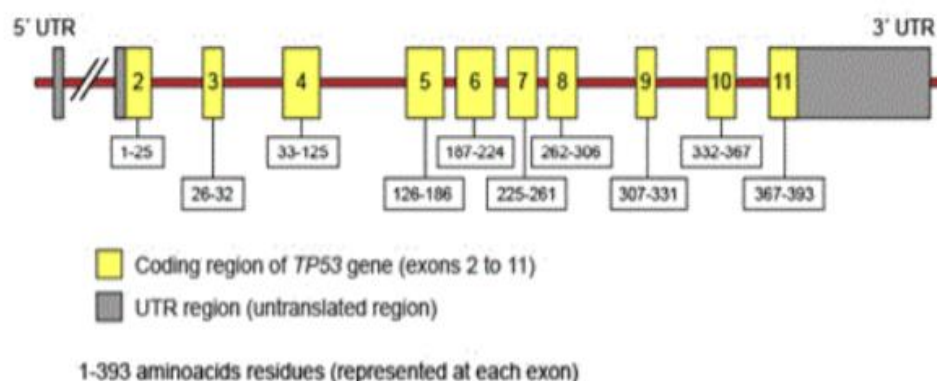
Figura 1 – Localização cromossômica do gene TP53.



Fonte: NCBI (2019)

Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear chamada p53 (Figura 2) em consequência do seu peso molecular de 53 KiloDaltons (kDa). Essa fosfoproteína é supressora de tumor que responde a diversos estresses celulares para regular a expressão dos genes-alvo, induzindo assim a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo. Essa proteína foi descrita pela primeira vez em 1979, associada a células transformadas pelo vírus SV40 estando associada ao seu antígeno T (LANE; CRAWFORD, 1979).

Figura 2 – Estrutura da proteína P53.



Fonte: Adaptado de *St. Jude Children's Research hospital* (2019).

A proteína p53 é expressa em baixa quantidade na maioria dos tecidos, porém quando ocorre processos de estresse oxidativos indicando possíveis danos ao DNA essa proteína é ativa e se acumula na célula (PLUQUET; HAINAUT, 2001).

Mutações de p53 podem levar ao crescimento de proteínas com alterações conformacionais, funcionalmente defeituosas, que têm uma meia vida maior em relação à proteína p53 selvagem (YAN *et al.*, 1996). Mais de 50% dos tumores humanos adquirem uma mutação ou exclusão do gene TP53 durante a progressão do tumor (*St. Jude Children's Research Hospital*, 2019).

Mutações nesse gene estão associadas a uma variedade de cânceres humanos, incluindo cânceres hereditários, como a síndrome de Li-Fraumeni (NCBI, 2019b).

Acredita-se que a síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é responsável por aproximadamente 1% do câncer de mama geral. Quase um terço dos casos de CM relacionados a SLF ocorrem antes dos 30 anos e a maioria ocorre aos 50 anos (RICH *et al.*, 2015).

O polimorfismo de interesse é conhecido como Arg72, Arg72Pro ou R72 (rs1042522) ocorre no gene TP53, éxon 4 mais especificamente no códon 72. O códon 72 do gene TP53 codifica um aminoácido Arginina (CGC) e uma Prolina (CCC), correspondendo a uma sequência Arg/Pro em alelo selvagem. Alelos mutantes são originados a partir de uma substituição de bases (G/C) resultando em uma alteração da estrutura primária da proteína (Arg/Arg) (THOMAS, 1999; TADA, 2001; BOJESSEN, 2008).

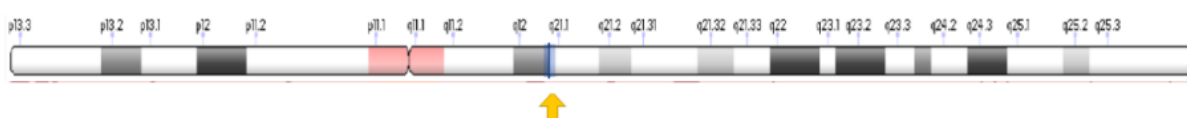
Essas alterações ocorrem pelo aminoácido Arginina ser encontrado em uma região hidrofóbica da proteína, contribuindo com sua conformação espacial, com isso a ligação ao DNA pode ser afetada, logo, se ocorre processo de substituição de um aminoácido Arginina por um Prolina a conformação pode ser alterada. Interferindo assim no ciclo celular, apoptose e reparo do DNA (MCGRAW *et al.*, 2015).

Pela complexidade de funções relacionadas ao gene TP53, mutações que atingem tal gene, podem estar envolvidas em diversas alterações patológicas. Observou-se a relação entre o polimorfismo ARg72Pro com doenças coronarianas (CAAMAÑO, 2009), lúpus eritematoso sistêmico no Brasil (GONÇALVES, 2015) e em população chinesa (YANG, 2017). E mais classicamente, tem-se relacionado esta variante com alguns tipos de câncer, como Leucemia Linfoblástica aguda infantil (DO *et al.*, 2009), câncer de bexiga (LIN *et al.*, 2013), retinoblastoma (ANAYA-PAVA *et al.*, 2017), nefroblastoma (FU *et al.*, 2017), adenoblastoma hipofisário (YAGNIK *et al.*, 2017).

3.4.2 Gene Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER-2)

O HER2 está localizado no cromossomo de número 17 no braço longo na posição 12 (17q12) (Figura 4). Este gene codifica um membro da família de receptores tirosina-quinases para fator de crescimento epidérmico (EGF) também chamado de receptor ERBB2 (humano), CD340 (Cluster de diferenciação 340). A superexpressão deste gene tem sido relatada em vários cânceres, incluindo tumores da mama e do ovário (NCBI, 2019a).

Figura 3 – Localização cromossômica do gene HER-2.



Fonte: NCBI (2019)

O produto desse gene faz parte de da família de receptores para fatores de crescimento epidérmico, ao todo fazem parte dessa família quatro receptores homólogos: HER-1 ou ErbB1, HER-2 ou ErbB2, HER-3 ou ErbB3 e HER-4 ou ErbB4

(VALERO; ALVAREZ, 2013). Essa família de receptores tem como ligantes o fator de crescimento epidérmico e outras moléculas com semelhança estrutural, sendo essencial para o desenvolvimento de órgãos e sistemas, porém em sua superexpressão está ligada ao mau prognóstico de diversos tumores (MARMOR *et al.*, 2004).

Esse receptor é composto por uma porção extracelular (onde está presente seu sítio de ligação), uma porção transmembrana e um domínio citoplasmático tirosino-quinase (SANCHES; SILVA, 2008). O domínio intracelular do receptor HER2 possui atividade tirosino-quinase que regula aspectos importantes da fisiologia, crescimento e diferenciação celular. Os domínios extracelulares desse receptor interagem com outros membros da família (EGFR, HER 3 e HER 4) funcionando então como um co-receptor. Sugere-se que o papel principal do HER 2 é modular sinais após a ligação a outros receptores da família (BURSTEIN; PH, 2005).

O HER-2 é um proto-oncogene e a amplificação de sua expressão foi relatada pela primeira vez por Slamon *et al.* 1987 em um estudo de 189 carcinomas primários de mama humano. Os resultados apresentados revelaram que 30% das amostras apresentaram amplificação no gene, onde tumores com alterações nesses receptores apresentam uma evolução mais agressiva, com pior evolução clínica para seus portadores.

A sua superexpressão é suficiente para induzir a célula a uma transformação neoplásica, e está presente em câncer de mama invasivo e metastático, lesões pré-neoplásicas, carcinoma mamário *in situ*, e diversas neoplasias (MENENDEZ; VELLON; LUPU, 2004). Do total de casos de CM, de 15 a 20% apresentam superexpressão da proteína HER-2, são então chamados HER-2 positivo, essa condição é considerada do tipo de pior prognóstico, uma vez que confere à célula cancerígena um comportamento mais agressivo, com aumento do crescimento e proliferação, maior capacidade de invasão e metástase (CONITEC, 2017)

Os receptores HER-2 são alvo de diversos agentes quimioterápicos, que por meio de divisão terapêutica podem ser divididos em duas classes principais: os anticorpos monoclonais (trastuzumabe, pertuzumabe, cetuximabe) que se ligam as regiões extracelulares do receptor interferindo na função de ligação de fatores de crescimento; a segunda classe apresenta como alvo a inibição da tirosino-quinase, inibindo assim a cascata que culminaria em processos transcrpcionais proliferativos

como exemplos tem-se o lapatinibe, neratinibe, canertinibe (VALERO; ALVAREZ, 2013).

Em mulheres com câncer de mama metastático HER-2 positivo, o tratamento objetiva a melhora da qualidade de vida e o prolongamento da sobrevida, com a utilização de terapias que incluem quimioterapia, hormonioterapia, além de terapia alvo (que ataca especificamente as células cancerígenas) (CONITEC, 2017).

4.1 LOCAL DE COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas no Instituto de Prevenção do Câncer do Amapá Joel Magalhães – IJOMA, localizado na Avenida Dr. Silas Salgado, Nº 3586, bairro Alvorada, Macapá/AP e na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima (HCAL), localizado na Avenida FAB, nº 70, no bairro Central de Macapá/AP.

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia (BIOMOL) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) do curso de Ciências Biológicas, que fica localizado na cidade de Macapá.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi enviado para a apreciação dos membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá – CEP UNIFAP, com o parecer de Aprovado e registrado com o número CAAE 07398519.3.0000.0003 (Anexo A).

Todos os participantes da pesquisa tiveram seus direitos respeitados conforme o que estabelece a Resolução 466/12 que regulariza as pesquisas que envolve seres humanos, sendo devidamente esclarecidos a respeito da pesquisa e solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A).

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população escolhida foi composta por pacientes que foram devidamente diagnosticadas que estão ou estiveram em tratamento e pacientes que tiveram remissão para o câncer de mama desde que fossem residentes no Estado do Amapá.

Além da população alvo descrita, foram coletadas amostras de indivíduos saudáveis do sexo feminino para formação de grupo controle, a modo de realizar comparação com finalidades de relevância estatística para o estudo.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como parâmetro de inclusão para participar da pesquisa foram requeridos:

- Pessoas com idade maior de 18 anos;
- Mulheres com câncer de mama ou que já tiveram a doença (grupo de pacientes);
- Indivíduos do sexo feminino sem câncer de mama (grupo controle);
- Ter concordado em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE.

Como parâmetro de exclusão:

- Pessoas com idade inferior a 18 anos;
- Portadores de outros tipos de câncer iniciais que não o de mama (grupo de pacientes);
- Portadores de outros tipos de câncer (grupo controle);
- Não ter concordado em assinar o TCLE.

4.5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas 80 amostras de DNA a partir de sangue periférico ou swab® de pacientes diagnosticadas com câncer de mama atendidos na Unidade de Alta complexidade em Oncologia do Estado do Amapá (UNACON) ou em acompanhamento clínico no Instituto de Câncer Joel Magalhães (IJOMA) e 83 amostras controles de mulheres saudáveis que aceitaram participar do estudo. A pesquisa foi realizada de acordo com a declaração de Helsinki e aprovação de comitê de ética da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

As amostras de sangue periférico coletadas foram feitas tanto por método à vácuo quanto por seringa (dependendo das condições de espessura das veias), a quantidade padrão de sangue coletado foi de 4 ml e armazenadas em tubos contendo EDTA para preservação celular necessária.

Para pacientes impossibilitadas de realização de coleta de sangue, o método de coleta utilizado foi o de swab® por método seco para coleta de células da mucosa oral. Para realização da coleta era solicitado que a paciente tivesse feito higienização bucal antes da coleta para melhor aproveitamento das amostras. Todas as amostras coletadas por swab® foram feitas em duplicata. As amostras foram armazenadas em tubos estéreis e secos.

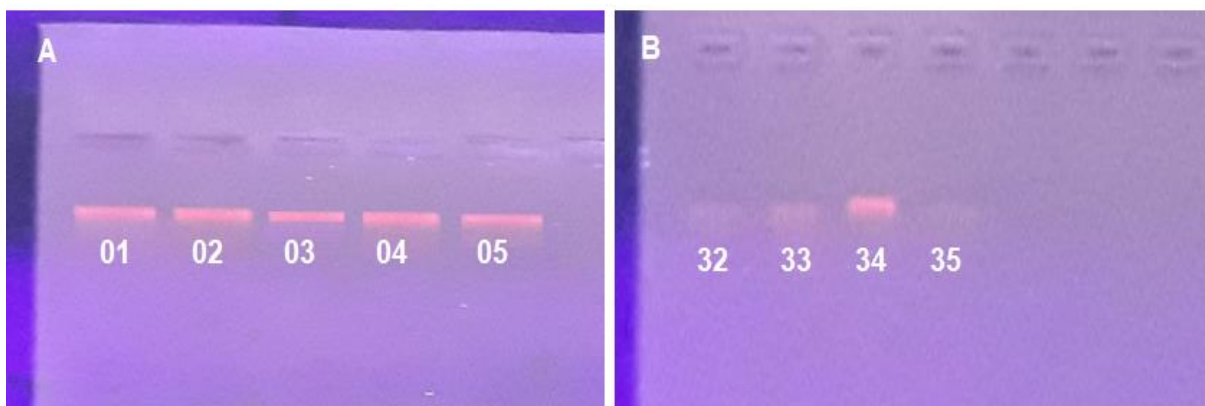
Após a etapa de coleta o material biológico era direcionado imediatamente ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da UNIFAP para realização do processo de extração de DNA.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram realizados dois métodos de extração, para as amostras de sangue periférico o método utilizado foi por meio de Kit comercial e para as amostras de swab® foram utilizados protocolos de extração por Chelex 5% (Anexo C).

Tanto a extração de DNA por meio de kit da empresa *Biociencia*® quanto pelos protocolos de Chelex 5% foram eficientes, no entanto, as amostras com melhor qualidade se deram por meio de kit em comparação as amostras por método de Chelex (Figura 5). Este fato pode ser explicado pela maior quantidade de material presente em amostras de sangue se comparadas à coleta com swab de células da mucosa oral.

Figura 4 – Produtos da extração de DNA, onde A apresenta as amostras de sangue de pacientes extraídas por Kit *Biociencia*®, e B as amostras de células da mucosa oral por método de Chelex.

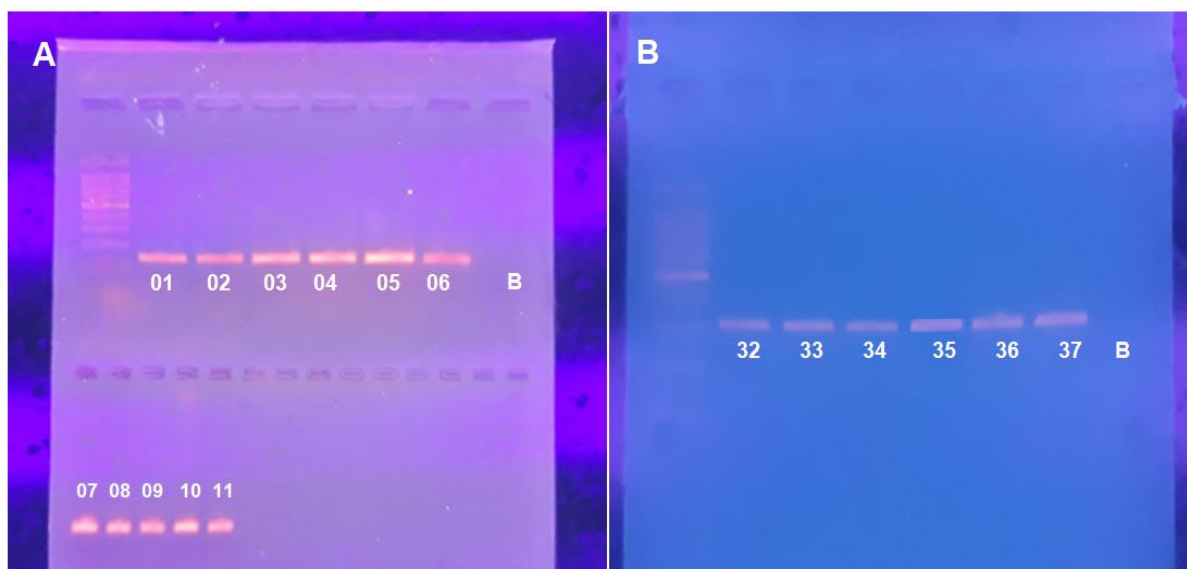


Fonte: Autor, 2019.

Após as extrações foi realizada uma etapa de verificação da qualidade do material proveniente das extrações através de corrida em gel de agarose 1%. A boa

qualidade das extrações permitiu a amplificação por PCR e posterior restrição enzimática, garantindo então confiabilidade aos resultados obtidos (Figura 6). Os protocolos utilizados para o Kit *Biocience*® foram os da bula do produto. Para o Chelex 5% o protocolo s foi padronizado em laboratório tendo como base o protocolo de Francez (2016).

Figura 5 - Produto da amplificação para o gene TP53 das amostras de pacientes visualizado em transluminador. Na figura A observa-se a amplificação das amostras extraídas de sangue e na B, a amplificação das amostras extraídas de células de mucosa oral.



Fonte: Autor, 2019.

4.7 GENOTIPAGEM DO CÓDON 72 DO GENE TP53

A identificação do genótipo ocorreu através do método de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição da Reação em Cadeia da Polimerase do inglês *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), de acordo com Rivu *et al.* (2017), com modificações.

Para a identificação do polimorfismo Arg72Pro (C72G) foram utilizados os primers *forward* 5' - TTC ACC CAT CTA CAG TCC - 3' e *reverse* 5' - CTC AGG GCA ACT GAC CGT - 3', com concentração utilizada na reação de trabalho de 10 nmol. O ciclo de amplificação foi de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, extensão final de 5 minutos a 72 °C e 4 °C. A identificação do fragmento de 309 pb foi visualizada em um gel de agarose 2,0% com brometo de etídio. O produto da PCR foi digerido com enzima de

restrição BstUI (0,5 µl) (*New England Biolabs*) com concentração de 5.000U/mL com incubação a 60 °C por 16 horas. As Tabelas 1, 2 e 3 descrevem os protocolos dos ciclos e quantidades utilizados para os procedimentos.

Reagentes PCR:

Tabela 1 – Quantidade de reagentes para PCR gene P53.

Reagentes	Quantidade (em microlitros) *
Água estéril	13 µl
Mix de reação	10 µl
Primer Ford	1 µl
Primer Reverse	1 µl
Amostra de DNA	5 µl
Volume final	30 µl

*As quantidades descritas na tabela são referentes a uma amostra.

Fonte: Autor, 2019.

Condições do PCR:

Tabela 2 – Condições PCR P53.

Temperatura	Tempo (seg/min)	Número de ciclos
95 ⁰ C	5 minutos	1 ciclo
95 ⁰ C	30 segundos	35 ciclos
55 ⁰ C		
72 ⁰ C		
72 ⁰ C	5 minutos	1 ciclo

Fonte: Autor, 2019.

Para RFLP:

Tabela 3 – Descrição de reagentes para RFLP gene P53.

Reagentes	Quantidades (em microlitros)
Enzima: BstUI	0,5 µl

Tampão	2 µl
Água estéril	3 µl
PCR	10 µl
Volume final da reação	15,5 µl

Fonte: Autor, 2019.

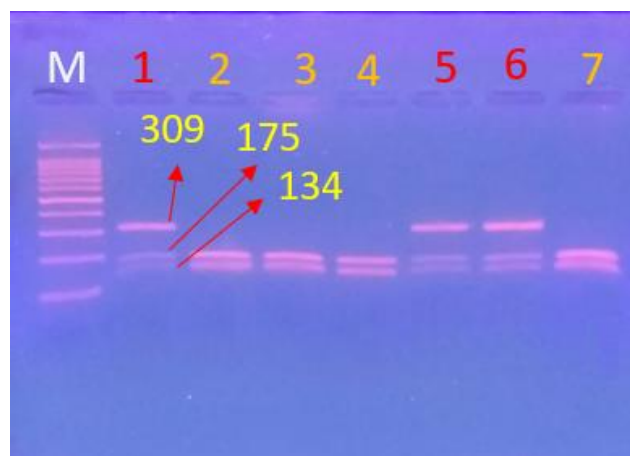
As amostras ficaram em Banho-Maria a 60°C *overnight*. O gel de corrida de eletroforese tem concentração 2%, corrente elétrica de 100 V a 20 minutos. Os resultados foram visualizados em luz UV no transiluminador, e o resultado pode ser observado na Tabela 4 e Figura 7.

Tabela 4 – Interpretação de resultados gene P53.

Resultado	Fragmento apresentado
Negativo	309 pb
Positivo homozigoto	175 pb e 134pb
Positivo heterozigoto	309pb, 175pb e 134pb

Fonte: Autor, 2019.

Figura 6 – Visualização de fragmentos após PCR-RFLP por digestão com enzima BstUI para o gene TP53 (em Gel de agarose 2%). Amostras 1-7 do grupo de pacientes. M indica o marcador de peso molecular; Amostras 1,5 e 6 apresentam a forma heterozigota para a variante (309pb, 175pb e 134pb); as amostras 2,3,4 e 7 apresentam forma homozigota para variante (175pb e 134pb).



Fonte: Autor, 2019.

4.8 GENOTIPAGEM DO CÓDON 655 DO GENE HER-2

A identificação do polimorfismo A655G foi através da técnica de PCR-RFLP de Xie *et al.* (2000). O fragmento 148 pb foi amplificado com o primer *forward* 5' -

AGA GCG CCA GCC CTC TGA CGT CCAT - 3' e primer *reverse* 5' - TCC GTT TCC TGC AGC AGT CTC CGCA - 3'. A identificação do fragmento de 148 pb foi visualizada em um gel de agarose 2,5% com brometo de etídio. O produto da PCR foi digerido com enzima de restrição BsmAI (*New England Biolabs*) em concentração de 10.000U/ml, a reação foi incubada a 55 °C por 16 horas, podendo gerar dois fragmentos de 116pb e 32 pb (alelo Valina) ou um de 148 bp (alelo Ileucina). As Tabelas 5, 6 e 7 descrevem os protocolos dos ciclos e quantidades utilizados para os procedimentos.

Reagentes PCR:

Tabela 5 – Quantidade de reagentes para PCR gene HER2.

Reagentes	Quantidade (em microlitros)
Água estéril	13 µl
Mix de reação	10 µl
Primer Ford	1 µl
Primer Reverse	1 µl
Amostra de DNA	5 µl
Volume final	30 µl

Fonte: Autor, 2019.

Condições do PCR:

Tabela 6 – Condições PCR gene HER2.

Temperatura	Tempo (minutos)	Número de ciclos
94 ⁰ C	5 min	1 ciclo
94 ⁰ C	0,5 min	35 ciclos
56 ⁰ C	1 min	
72 ⁰ C		
72 ⁰ C	7 min	1 ciclo

Fonte: Autor, 2019.

Para RFLP:

Tabela 7 – Descrição de reagentes para RFLP gene HER2.

Reagentes	Quantidades (em microlitros)
-----------	------------------------------

Enzima: BsmAI	0,5 µl
Tampão	2 µl
Água estéril	3 µl
PCR	10 µl
Volume final da reação	15,5 µl

Fonte: Autor, 2019.

As amostras permaneceram em Banho-Maria a 55°C overnight. O gel de corrida de eletroforese tem concentração 2,5%, corrente elétrica de 100 V a 20 minutos. Os resultados foram visualizados em luz UV no transiluminador, e o resultado pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Interpretação de resultados polimorfismo rs1136201 gene HER-2

Resultado	Fragmento apresentado
Negativo	148 pb
Positivo homozigoto	116 pb e 32pb
Positivo heterozigoto	148pb, 116pb e 32pb

Fonte: Autor, 2019.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para a determinação das frequências alélicas e genotípicas conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg. A regressão logística foi realizada por meio dos testes de *odds ratios* (ORs) e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para avaliação das possíveis associações entre as variantes genéticas da doença e a suscetibilidade ao câncer, onde o valor de *p* inferior a 0,05 foi definido como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 GENÓTIPO ARG72PRO GENE TP53

Mutações do gene TP53 são consideradas as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 60% das neoplasias. Essas mutações da TP53 estão associadas à instabilidade do desenvolvimento celular e progressão do ciclo (KARA *et al.*, 2010; MCGRAW *et al.*, 2015). Em nosso estudo, o genótipo para o polimorfismo 1042522 mais frequente nos pacientes foi o heterozigoto GC com 47,5%, seguido do CC (28,7%) e o GG (23,7%). Nas amostras controle, a frequência genotípica encontrado para os genótipos GG, GC e CC tiveram as porcentagens 69,9%, 19,3% e 10,8% respectivamente. Os resultados da frequência genotípica e alélica de casos e controles para o polimorfismo rs1042522 do gene TP53 estão apresentados na Tabela 9.

O percentual de distribuição do genótipo Arg/Arg foi mais de duas vezes menor nos pacientes (23,8%), quando comparado aos controles (69,9%). Pacientes com o genótipo heterozigoto Arg/Pro apresentaram um percentual de 47,5% e os controles (19,3%). Um resultado significativo também foi observado com o genótipo homozigoto Pro/Pro, que apresentou 28,7% nos pacientes. Os resultados da frequência alélica entre os alelos dos pacientes e controles também foram significativos em nossa amostragem ($X^2 = 32.165$, $p = < 0.0001$).

Tabela 9 – Frequência genotípica e alélica do polimorfismo Arg72Pro em pacientes de câncer de mama e grupo controle do município de Macapá, onde X^2 = qui-quadrado.

Amostra	Frequência genotípica (%)			Frequência alélica (%)	
	Arg/Arg(G/G)	Arg/Pro(G/C)	Pro/Pro(C/C)	G	C
Pacientes(n=80)	19 (23.7)	38 (47.5)	23 (28.7)	76(47.5)	84(52.5)
Controles(n=83)	58 (69.9)	16 (19.3)	9(10.8)	132(79.5)	34 (20.5)
Total (n=163)	77 (48.1)	54(33.7)	32(20.0)	208(65.0)	118(36.8)
Qui-quadrado	$X^2 = 34.798$, $p = < 0.0001$			$X^2 = 36.165$, $p = < 0.0001$	

Fonte: Autor, 2019.

Em nossas amostras, o genótipo GC e o alelo C (72Pro) foram estatisticamente associados ao câncer de mama, onde a frequência genotípica foi de 47,5%, ou seja, quase metade do grupo de pacientes apresentou tal genótipo

(Tabela 9). O aumento significativo do risco de câncer em relação as variantes TP53 foi encontrado quando observamos as comparações entre as associações heterozigotos e alelos contrastantes (CG vs GG: OR = 7.2500, 95% CI 3.3208-15.8280, X^2 = 26.964, p = < 0.0001), (G vs C: OR= 4.2910, 95% CI= 2.6334-6.9919, X^2 = 36.165, p = < 0.0001), respectivamente (Tabela 10). Resultados semelhantes associando este genótipo e alelo foram encontrados nos estudos de Sjalanderet *et al.* (1996), Buyru *et al.* (2003), Rivu *et al.* (2017), Ayoubi *et al.* (2018) e Akhter *et al.* (2018).

Tabela 10 – Associação entre o risco de Câncer de Mama e os polimorfismos G72C do gene TP53 e o I655V do gene HER-2.

Polimorfismo	Comparação	Teste de associação		
		OR (95% CI)	X^2	P-value
G72C	Comparação Homozigoto (CC vs GG)	7.8012(3.0823-19.7444)	21.263	< 0.0001
G72C	Comparação Heterozigoto (CG vs GG)	7.2500(3.3208-15.8280)	26.964	< 0.0001
	Alelos Contrastante (G vs C)	4.2910(2.6334-6.9919)	36.165	< 0.0001
A655G	Comparação Homozigoto (GG vs AA)		0.961	0.3269
	Comparação Heterozigoto (AG vs AA)	17.4706 (7.9518-38.3840)	60.110	< 0.0001
	Alelos Contrastante (A vs G)	5.0202 (2.8563-8.8234)	34.711	< 0.0001

OR – odds ratio

CI – confidence intervals

X^2 – qui-quadrado

Fonte: Autor, 2019.

Estudos revelaram que o alelo em homozigose GG tem 15 vezes maior capacidade para induzir a atividade de apoptose do que o alelo 72Pro. Esta alta capacidade de induzir a apoptose é devido à sua localização mitocondrial que permite que a p53 tenha uma interação direta com a proteína BAK. Consequentemente, o alelo menos apoptótico 72Pro (alelo C) representa uma

capacidade maior de levar a proliferação das células cancerígenas (DUMONT *et al.*, 2003; LEU *et al.*, 2004; RIVU *et al.*, 2017) porém, por se tratar de uma doença multifatorial outros fatores devem ser levados em consideração, pois, levando em consideração somente o genótipo o resultado esperado seria um maior quantitativo de indivíduos homozigotos para o polimorfismo (C/C). Em nosso estudo 52,5% dos pacientes apresentaram o alelo C e nos controles o mais frequente foi o alelo G (79.5%).

5.2 GENÓTIPO I655V GENE HER-2

O HER-2 pertence à família do fator de crescimento epidérmico humano, comumente expressa na superfície das células epiteliais. Além da contribuição para a proliferação e diferenciação celular, a ativação do HER-2 em células normais promove adesão e motilidade celular (RIAZ *et al.*, 2016). O papel das alterações genéticas no domínio de ligação à quinase do HER-2 contribui para a tumorigênese e também tem sido relatado em muitos tipos de câncer (OLAYIOYE *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2008).

O genótipo AG é o mais associado com o desenvolvimento com vários tipos de câncer, principalmente o câncer de mama, o qual é extensivamente associado mundialmente com esse genótipo (RIAZ *et al.*, 2016). Em nosso estudo, associamos o polimorfismo Ile655Val e o risco de câncer de mama em nossa população (Tabelas 10 e 11). Em nossas amostras 82,5% das pacientes apresentaram o genótipo Ile655Val, corroborando estudos descritos na literatura (KARA *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010; CHEN, 2014). Nos controles, o genótipo mais frequente foi A/A (75,9%), seguido do A/G (20,4%) e G/G (3,6%).

A frequência genotípica e alélica do códon 655 do gene HER-2 encontra-se na tabela 3. Os resultados demonstraram que o genótipo heterozigoto (AG) Ile655Val foi o mais frequente nos pacientes (82,5%) e nos controles o genótipo homozigoto (AA) Ile655Ile foi o mais frequente (75,9%). O genótipo homozigoto Val655Val foi encontrado apenas nas amostras controles (6,6%). Quando analisamos a frequência dos alélica observamos o alelo A com frequência significativa nos controles (86,1%) assim como foi o alelo mais frequente nos pacientes A (58,7%).

A associação entre o risco de câncer entre os genótipos e alelos do polimorfismo A655G do gene HER-2, estão apresentados na tabela 11. O aumento significativo do risco também com gene HER-2 foi encontrado quando comparamos as associações entre heterozigotos e alelos contrastantes (AG vs AA: OR = 17.4706, 95% CI= 7.9518-38.3840, $X^2= 60.110$, $P= < 0.0001$), (A vs G: OR= 5.0202, 95% CI= 2.8563-8.8234, $X^2= 34.711$, $P= < 0.0001$) (Tabela 3).

Observou-se na Tabela 10 a significância estatística das comparações entre o genótipo heterozigoto Ile655Val como o homozigoto Ile655Ile e os alelos contrastantes (AG vs AA: OR = 17.4706, 95% CI 3.3208-15.8280, $X^2=26.9640$, $p= < 0.0001$), (A vs G: OR= 5.0202, 95% CI= 2.8563-8.8234, $X^2= 34.711$, $p= < 0.0001$). Em nossas amostras não encontramos o genótipo homozigoto Val655Val nos pacientes, somente nos controles.

Lu *et al.* (2010) encontraram associação do polimorfismo HER-2 Ile655Val com os subgrupos asiáticos e africanos no câncer de mama e nenhuma correlação foi observada para os caucasianos. Já Chen (2014) sugeriu uma relação inversa, em uma meta-análise não encontrou nenhuma associação no grupo étnico asiático, mas sim, com grupos afro-americanos e caucasianos. A população da região norte do Brasil, principalmente a cidade de Macapá, apresenta uma grande miscigenação. Sua constituição genética é composta por indígenas, africanos e europeus.

Tabela 11 – Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Ile655Val em pacientes de câncer de mama e grupo controle do município de Macapá, onde X^2 = qui-quadrado.

Amostra	Frequência genotípica (%)			Frequência alélica (%)	
	Ile/Ile(A/A)	Ile/Val(A/G)	Val/Val(G/G)	A	G
Pacientes(n=80)	14 (17.5)	66 (82.5)	0	94(58.8)	66(41.2)
Controles(n=83)	63(75.9)	17(20.4)	3(3.6)	143(86.1)	23(13.9)
Total (n=163)	77 (48.1)	83(51.8)	3(1.8)	237(74.0)	86(26.8)
Qui-quadrado	$X^2 = 63.076$, $p= < 0.0001$			$X^2 = 34.711$, $p= < 0.0001$	

Fonte: Autor, 2019.

A frequência da variante rs1136201 pode ser relacionada com a possibilidade de individualização do tratamento dos cânceres de mama. Um estudo prospectivo com 61 pacientes com CM com expressão aumentada de HER-2 em

quimioterapia com Trastuzumabe, foi realizada genotipagem por PCR-RFLP e com os resultados foram vistos que 36 (59.4%) apresentaram genótipo AA; 21 (34.4%) AG e 4 (6.6%). Destes 61 pacientes 5 (8.2%) apresentaram cardiotoxicidade ao decorrer do tratamento, sendo que todos (100%) possuem genótipo heterozigoto (AG) (BEAUCCLAIR et al., 2007). Em uma breve conclusão realizada no estudo, pacientes com genótipo AA e GG apresentaram menor risco para desenvolver cardiotoxicidade que pacientes heterozigotos.

Nosso estudo não teve como um dos objetivos observação de terapias realizadas para o tratamento de CM, porém, extrapolando os dados obtidos, 66 (82,5%) das pacientes do estudo apresentaram genótipo heterozigoto (AG), ou seja, a grande maioria das pacientes do estudo poderiam apresentar risco ao desenvolvimento de cardiotoxicidade no uso de Trastuzumabe. Segundo a I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia a incidência de carciotoxicidade em pacientes em uso de trastuzumabe varia de 2-28%. Sendo o Trastuzumabe um dos medicamentos para tratamento de CM disponíveis no Sistema único de Saúde – SUS tais dados são de suma importância uma vez que a partir de dados concretos possa ser realizado o manejo clínico de monitoramento da cardiotoxicidade e possível intervenção para melhoria da qualidade de vida do paciente.

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES ARG72 PRO E I655V

A frequência genotípica associada encontra-se nas tabelas 12 e 13. Os resultados demonstraram que a presença dos genótipos alterados associados no grupo de pacientes é de (91,25%). Enquanto no grupo controle tal diferença chega a menos da metade (49,40%) quando comparada com controles sem os polimorfismos (Tabela 12). Para tal análise foi levado em consideração a presença seja em heterozigose ou homozigose para as duas variantes (Arg72Pro e I655V), sendo assim, o intuito desta análise foi analisar a presença ou ausência das variantes. Os resultados encontrados mostraram que a ausência em ambas as mutações foi de 50.60% no grupo controle e que no grupo de pacientes a grande maioria apresentou alteração nas variantes estudadas (91.25%), reafirmando assim os riscos da presença desses polimorfismos com o desenvolvimento de câncer ($p < 0.001$).

Tabela 12 – Associação entre polimorfismos Arg72Pro e I655V em paciente de CM e grupo controle.

Amostra	Com SNP's Arg72Pro + I655V n (%)	Sem SNP's Arg72Pro e I655V n (%)
Pacientes (n=80)	73 (91.25)	7 (8.75)
Controles (n=83)	41 (49.40)	42 (50.60)
Total (n=163)	114 (69.94)	49 (30.06)
OR= 10.6829 IC= 95% 4.4006-25.9338 χ^2 = 33.939 P= <0.0001		

OR – odds ratios

CI – confidence intervals

χ^2 – qui-quadrado

Fonte: Autor, 2019.

Baseado nas origens de colonização e formação da população amapaense e nas grandes dimensões do Brasil, existe uma grande miscigenação de etnias entre regiões do país (GRIOLO, 2012). Logo é impossível inferir que resultados para estas variantes encontradas em nosso estudo sejam os mesmos encontrados em outras regiões do país. Estudos regionalizados são necessários para confirmar se a composição genética populacional é fator importante para a distribuição destes alelos na população. Trabalhos sobre o tema em populações brasileiras são escassos, abrindo caminho para investigações da relação entre o câncer de mama e os polimorfismos Arg72Pro (rs1042522) e Ile655Val (rs1136201) no país.

Uma das possíveis explicações para a presença de alelos Pro72, mesmo na população controle, pode ser a composição étnica como fator de diferenças entre a distribuição das variantes ao redor do mundo, apresentando frequências distintas em populações diferentes.

A tabela 13 foi elaborada a fim de melhor visualização e detalhamento das relações entre os genótipos homo e heterozigotos de ambos os polimorfismos.

Tabela 13 – Associação das variantes em ambos os polimorfismos no grupo de pacientes e controle.

Polimorfismos		Grupo n (%)	
72Pro (rs1042522)	655V (rs1136201)	Pacientes	Controle
Heterozigose	Heterozigose	35 (43.75)	2 (2.41)
Homozigose	Homozigose	0	0
Homozigose	Heterozigose	19 (23.75)	1 (1.20)

Continua

Conclusão			
Polimorfismos		Grupo n (%)	
72Pro (rs1042522)	655V (rs1136201)	Pacientes	Controle
Heterozigose	Homozigose	0	1 (1.20)
S/P*	Heterozigose	12 (15.00)	14 (16.87)
Heterozigose	S/P*	3 (3.75)	13 (15.67)
Homozigose	S/P*	4 (5.00)	8 (9.64)
S/P*	Homozigose	0	2 (2.41)
S/P*	S/P*	7 (8.75)	42 (50.60)

* S/P = Sem o polimorfismo em questão

Fonte: Autor, 2019.

Entre o grupo de pacientes dos que apresentaram alterações nos polimorfismos, 35 (43.75%) possuem ambos polimorfismos em heterozigose; 19 (23.75%) homozigose para Arg72Pro e heterozigose para Ile655Val. Nenhum dos pacientes apresentou homozigose para ambos os polimorfismos; e 7 (8.75%) não apresentaram nenhum dos genótipos alterados.

Dos 20 pacientes que não se incluíram nos perfis mencionados acima os resultados foram distribuídos da seguinte forma: sem polimorfismo Pro72 e heterozigose para o 655V 12 pacientes (15.00%), heterozigose para Pro72 e sem polimorfismo para V655 3 pacientes (3.75%) e homozigotos para Pro72 e sem para 655V 4 (5.00%).

No grupo controle as relações entre polimorfismos de deram da seguinte maneira: ambos os polimorfismos em heterozigose 2 pessoas (2.41%), homozigose para Pro72 e heterozigose para 655V 1 participante (1.20%), assim como no grupo de pacientes o grupo controle não apresentou nenhum indivíduo em homozigose para as duas variantes. Aproximadamente metade dos participantes, 42 (50.60%) não apresentou nenhuma das variantes divergindo consideravelmente dos resultados encontrados no grupo de pacientes.

A outra parte do grupo controle se dividiu em 14 (16.87%) indivíduos sem alteração para o polimorfismo 72Pro e heterozigose para o 655V; 13 (15.67%) indivíduos heterozigotos para 72 Pro e sem a variante 655V e por fim, 8 (9.64%) apresentaram homozigose para 72Pro e sem alterações para 655V.

Quando comparada a presença em associação dos polimorfismos Arg72Pro e I655V, foi demonstrado que a presença concomitante dos polimorfismos apresentou risco aumentado entre pacientes, já no grupo controle a diferença encontrada foi mínima. O perfil fenotípico mais frequente entre pacientes foi de heterozigose tanto para Arg72Pro quanto para I655V (n= 35, 43.75%), seguido de homozigose para Arg72Pro e heterozigose para I655V (n= 19, 23.75%).

Foi realizado o teste estatístico de odds ratio a fim de uma breve análise sobre a possibilidade de associação entre a presença de alterações em ambos os polimorfismos e os casos de cancer comparando-os ao grupo controle. De tal forma que foram considerados a presença de alterações em ambos os polimorfismos (em homozigose ou heterozigose) onde 54 pacientes apresentaram tal característica e 26 dos indivíduos apresentaram apenas uma ou nenhuma das alterações. Para o grupo controle 3 apresentaram ambas as alterações e 80 indivíduos apresentaram apenas uma ou nenhuma das variantes.

Os resultados encontrados (OR= 55.3846 IC: 15.96-192.15 $p < 0.0001$) indicam uma altíssima relevância na presença de ambas as variantes e o desenvolvimento de câncer de mama. Mostrando assim um alto risco para indivíduos que possuem essas alterações genéticas. É imprescindível salientar que diversos outros fatores e outras variantes genéticas para diversos outros genes devem ser levados em consideração, bem como a necessidade de ampliação dessas pesquisas no Estado do Amapá, Brasil e no mundo. Porém, podemos concluir a partir dos resultados expostos que a presença de ambas as variantes seja em homozigose ou heterozigose podem aumentar a probabilidade de risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Outro dado importante e passível de investigação na população amapaense é a de alteração de toxicidade para radioterapia como mencionado por Rosenstein *et al.* (2009), que realizaram um estudo em pacientes de câncer de mama onde o haplótipo tp53 contendo ambos os alelos variantes (homozigose para a mutação C/C) foram associados a um aumento quase duas vezes no risco (OR 1,97, IC 95%: 1,11-3,52) para telangiectasia e fibrose, mostrando que variantes no gene tp53 podem, portanto, modificar o risco de toxicidade tardia da pele após a radioterapia. Tais informações trazem a possibilidade de uma mudança na forma de abordagem do tratamento para os pacientes em nosso Estado, de forma individualizada

baseando-se não somente em fatores clínicos, mas também por fatores genéticos intrínsecos do paciente.

5.4 VARIANTES ARG72 PRO E I655V E UMA BREVE ASSOCIAÇÃO POPULACIONAL

Em uma análise populacional comparativa, fundamentada na base de dados *Ensembl*, criado pela *European Bioinformatics Institute* e o *Wellcome Trust Sanger Institute* que apresentam dados estatísticos baseados em estudos e no sequenciamento de amostras ao redor do mundo e como base nos dados do IGSR-*The International Genome Sample Resource* analisando 2504 amostras sequenciadas de indivíduos ao redor do mundo.

A variante (rs1042522) está localizada no cromossomo de número 17 na posição 7676154 (*Forward strand*). De maneira geral a frequência genotípica mundial de tal variante é de GG: 0,230, CC: 0,316 e GC: 0,454 com frequência alélica de G: 45,7% e C: 54,3%. Foi visto que nos dados mundiais existe uma homogeneidade entre os genótipos, com valores semelhantes aos encontrados no grupo de pacientes (tabela 9).

Ainda analisando os resultados da base de dados *Ensembl* para fins de associação e comparação, quando visualizado populações específicas com proximidade ancestral as origens da população do estado do Amapá como as de origem americana e africana a frequência alélica para o polimorfismo Arg72Pro foi de G: 31,7% e C: 68,3%, com frequências genotípicas GG: 0,098, CC: 0,464 e GC: 0,438 para a população americana (347 amostras). E para população Africana a frequência alélica de G: 66,9% e C: 33,1%, com frequências genotípicas de GG: 0,452, CC: 0,115 e GC: 0,433.

Quando comparado com os resultados obtidos é visto que a frequência alélica da população com câncer de mama é de G: 47,5% e C: 52,5% se aproximam muito das frequências alélicas da população geral mundial, assim como suas frequências genotípicas. O grupo controle apresentou G: 79,5% e C: 20,5% diferindo das populações mencionadas. Dados de populações com descendência indígena não estavam disponíveis no banco de dados.

Pra a variante I655V (rs1136201) as proporções encontradas no banco de dados *Ensembl* para população geral a frequência alélica é de A: 87,9% e G: 12,1%, a frequência genotípica AA: 0,778, AG: 0,201 e GG: 0,021. Os resultados de nosso

estudo mostraram que o grupo de pacientes apresenta a frequência alélica do grupo pacientes é de A 58,7% e G:41,2% diferindo consideravelmente dos dados obtidos da população mundial, porém, o grupo controle apresentou grande semelhança em tal frequência, A: 86,1% e G: 13,9%. Para populações específicas como africanas e americanas as porcentagens seguem os dados mundial com pouca variância, por tal motivo não serão expostas.

É importante salientar que as amostras das populações presentes no banco de dados são heterogêneas e não foram utilizados os mesmos critérios para inclusão que as utilizadas em nosso estudo, já que não possuem interesse voltado ao câncer de mama. De toda forma, o objetivo desde tópico foi a melhor visualização da distribuição dessas variantes ao redor do mundo.

Neste estudo concluímos que:

- Os genótipos GC para o gene TP53 polimorfismo rs1042522 e AG para o polimorfismo rs1136201 do gene HER-2 foram os mais frequentes na população de pacientes;
- Nossos resultados demonstraram estatisticamente que ambos os polimorfismos podem ser associados ao câncer de mama em nossa população.
- Em conjunto as duas variantes se apresentaram de forma predominante no grupo de pacientes, o que pode indicar que a presença de alteração em ambos os genes aumentem o risco do indivíduo desenvolver algum tipo de câncer. Porém, para confirmação de tal afirmativa seria necessário o acompanhamento dos indivíduos do grupo controle que apresentaram tais alterações o que seria inviável para os objetivos deste estudo. Trazendo possibilidades de novos estudos com tal objetivo.
- Tais genótipos poderão ser usados como marcadores genéticos para o câncer de mama na população amapaense. Todavia, enfatizamos a ampliação do número amostral para que os resultados obtidos sejam consolidados;
- Ressaltamos ainda, a necessidade de estudos com a relação entre a presença de tais variantes e possíveis linhas de tratamento específicas, levando em consideração alternativas farmacogenéticas para esses pacientes;

- ABDRABOH, Naglaa R.; SHEHATA, Hanan H.; AHMED, Manal B.; BAYOUMI, Fatehia A. HER1 R497K and HER2 I655V polymorphisms are linked to development of breast cancer. **Dis Markers.**, 34(6):407-17, 2013.
- AINSLEY WESTON; CURTIS C; HARRIS, MD. In: KUFÉ, Donald W.; POLLOCK, Raphael E.; WEICHSELBAUM, Ralph R.; et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6. ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- AKHTER, Naseem; DAR, Sajad A.; CHATTOPADHYAY, Shilpi; et al. Impact of p53 arg72pro SNP on Breast Cancer Risk in North Indian Population. **Curr genomics**, 19(5):395-410, 2018.
- ALMEIDA, Janete Dias; MORAES, Elisabete; CARVALHO, Yasmin Rodarte; et al. Expressão do gene p53 no carcinoma bucal: Revista da literatura. **Rev. Fac. Odontol.**, 1(1), 1999.
- ÁLVAREZ, Vicente Valero Ricardo Hugo. Biologia Molecular do Câncer de Mama. In: HOFF, Paulo Marcelo Gehm; KATZ, Artur; ODONE FILHO, Vicente; NOVIS, Yana Sarkis (Org.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
- APOUSTOLOU, Paraskevi; FOSTIRA, Florentia. Hereditary Breast Cancer: The era of new susceptibility genes. **Biomed Res Int.**, 2013:747318, 2013.
- AYOUBI, S.E.; ELKARROUMI, M.; EL KHACHIBI, M.; et al. The 72Pro Variant of the tumor protein 53 is associated with an increased breast cancer risk in the Moroccan population. **Pathobiology**, 85(4):247-253, 2018.
- BEAUCLAIR, S.; FORMENTO, P.; FISCHER, J.; et al. Role of the HER2 [Ile655Val] genetic polymorphism in tumorigenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity. **Ann Oncol.**, 18(8):1335-1341, 2007.
- BOJESSEN, Stig E; NORDESTGAARD, Børge G. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. **Cell Cycle**, 7(2):158-163, 2008.
- BORGES, Tatiane Oliveira; VOGT, Maria de Fátima, SALUM, Fernanda Cristina; et al. Avaliação da taxa de positividade do receptor HER2 e da influência de três tipos de biópsia mamária no resultado imunohistoquímico em mulheres com câncer de mama invasivo no Hospital Universitário de Brasília. **Rev Bras Mastologia.**, 22(3):83-89, 2013.
- BORGES-OSÓRIO, Maria R.; ROBINSON, Wanyce M. **Genética humana**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 117-28, 2013.

BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde – CONITEC. **Trastuzumabe para o tratamento do câncer de mama her-2 positivo metastático em primeira linha de tratamento.** Ministério da Saúde, 2017.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2019.

_____. Ministério da Saúde. Instituto nacional de câncer José de Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** 6. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Portaria conjunta nº 04, Brasília, 23 de janeiro de 2018. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama.** 2018.

_____. Ministério da Saúde. Instituto nacional de câncer josé alencar gomes da silva. **Atlas da mortalidade.** Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade> Acesso em: 18 jan 2021.

BURSTEIN, Harold J. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. **N Engl J Med.**, 20;353(16):1652-4, 2005.

BUYRU, Nur; HATICE Tigli; NEJAT Dalay. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncol Rep.**, 10(3):711–714, 2003.

CAAMAÑO, José; SAAVEDRA, Nicolas; JARAMILLO, Priscilla; et al. Polimorfismo Pro72Arg del gen TP53 se asocia a enfermedad coronaria en individuos Chilenos. **Revista chilena de cardiología**, 28(2):151-157, 2009.

CHAMMAS, Roger. Biologia do Câncer: uma Breve Introdução. In: HOFF, Paulo Marcelo Gehm; KATZ, Artur; ODONE FILHO, Vicente; NOVIS, Yana Sarkis (Org.). **Tratado de Oncologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

CHEANG, Maggie; VODUC, David; BAJDIK, Chris; et al. Basallike breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res.**, 14(5):1368-76, 2008.

CHEN, Wei; YANG, Heng; TANG, Wen-Ru; FENG, Shi-Jun, WEI, Yun-Lin. Updated meta-analysis on HER2 polymorphisms and risk of breast cancer: evidence from 32 Studies. **Asian Pac J Cancer Prev.**, 15(22):9643-47, 2014.

CIANFROCCA, Mary; GOLDSTEIN, Lori. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist.**, 9(6):606-16, 2004.

CIRQUEIRA, Magno Belém; MOREIRA, Marise Amaral; SOARES, Leonardo Ribeiro; FREITAS-JÚNIOR, Ruffo. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, 39(10):499-503, 2011.

DIAS-FILHO, Claudemir Rodrigues; FRANCEZ, Pablo Abdon. **Introdução à Biologia Forense**. Millennium Editora, 2016, p. 201-202.

DO, T.N.; UCISIK-AKKAYA, E.; DAVIS, C.F.; MORRISON, B.A.; DORAK, M.T. Polimorfismos TP53 R72P e MDM2 SNP309 na modificação da suscetibilidade à leucemia linfoblástica aguda na infância. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 195(1):31-36, 2009.

DUMONT, Patrick; LEU, J I-Ju; PIETRA, Anthony C Della; et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat. Genet.**, 33(3):357-65, 2003.

EROLE, Pilar; BOSCH, Ana; PEREZ-FIDALGO, J Alejandro; LLUCH, Ana. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev.**, 38(6):698-707, 2012.

ESCÓRCIO-DOURADO, Carla Solange; ALVES-RIBEIRO, Francisco Adelton; LIMA-DOURADO, Jose Charles; *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism and breast cancer risk in women from the Northeastern region of Brazil. **Clinics**, 75 :e2360, 2020.

FU, Wen; ZHUO, Zhen-Jian; JIA, Wei; et al. Association between TP53 gene Arg72Pro polymorphism and Wilms' tumor risk in a Chinese population. **Onco Targets ther.**, 10:1149-1154, 2017.

GONÇALVES, Geslaynne de Oliveira. **Associação entre o polimorfismo do gene p53 no códon 72 e Lúpus Eritematoso Sistêmico em uma amostra brasileira**. 2015. 30 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GOTTLIEB, Eyal; VOUSDEN, Karen. p53 regulation of metabolic pathways. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, 2(4):a001040, 2010.

GRIOLO, Suely; SOLER, Júlia; GREENWAY, Steven; et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. **Eur J Hum Genet.**, 20(1):111-116, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 7;100:57-70, 2000.

HORTOBAGYI, G.N; STEMMER, S.M.; BURRIS, H.A.; *et al.* Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. **Ann Oncol.**, 29(7):1541-1547, 2018.

HYNES, Nancy E.; LANE, Heide A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer.**, 5(5):341-54, 2005.

IRVIN Jr, William J; CAREY, Lisa A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer.**, 44(18):2799-805, 2008.

KALIL FILHO, Roberto; HAJJAR, Ludhmila Abrahão; BACAL, Fernando; HOFF, Paulo Marcelo; DIZ, Maria Del Pilar; GALAS, Filomena Regina; et al. I Diretriz Brasileira de cardio-oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, 96(2 supl.1):01-52, 2011.

KARA, Nurten; KARAKUS, Nevin; ULUSOY, Ali Naki; et al. P53 Codon 72 and HER2 Codon 655 Polymorphisms in Turkish Breast Cancer Patients. **DNA and Cell Biology**, 29(7), 2010.

KENNECKE, Hagen; YERUSHALMI, Rinat; WOODS, Ryan; *et al.* Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **J Clin Oncol.**, 28(20):3271-7, 2010.

KHODJAKOV, Alexey; RIEDER, Conly L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of biology**, 8(10):88, 2009.

LACROIX, Marc; LECLERCQ, Guy. The “portrait” of hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, 89, 297-304, 2005.

Lane, D.P.; Crawford, L.V. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, 278:261-263, 1979.

LEU, J I-Ju; DUMONT, Patrick; HAFEY, Michael; MURPHY, Maureen; GEORGE, Donna. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. **Nat. Cell Biol.**, 6(5):443-450, 2004.

LEVINE, Mark N. Trastuzumab cardiac side effects: only time will tell. **J Clin Oncol.**, 23: 7775-7776, 2005.

LODISH, Harvey; BERK, Arnold; ZIPURSKY, Lawrence; *et al.* **Molecular Cell Biology**. 4. ed. Nova York: WH Freeman, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>. Acesso em: 19 set. 2020.

LU, Su; WANG Zhanwei; LIU, Hong; HAO, Xishan. HER2 Ile655Val polymorphism contributes to breast cancer risk: evidence from 27 case-control studies. **Breast Cancer Res Treat.** 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20401632/>. Acesso em: 20 out. 2020.

MARGOLESE, Richard G.; HORTOBAGYI, Gabriel N.; BUCHHOLZ, Thomas A. Natural History and Prognostic Markers. In: KUFE, Donald W.; POLLOCK, Raphael E.; WEICHSELBAUM, Ralph R.; et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6. ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.

MARMOR, Mina D.; KOCHUPURAKKAL, Kochupurakkal Bose; YARDEN, Yosef. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, 58(3):903-13, 2004.

MARTÍNEZ-CARPIO, Pedro; NAVARRO, Miguel. Growth factors, cell damage, cyclin-dependent kinases and their inhibitors: relevance in molecular pathology of human cancer. **Med clin.**, 120(7):265-271, 2003.

MCGRAW, K.L.; ZHANG, L.M.; ROLLISON, D.E.; et al. The relationship of TP53R72P polymorphism to disease outcome and TP53mutation in myelodysplastic syndromes. **Blood Cancer J.**, 13;5(3):e291, 2015.

MENENDEZ, Javier; VELLON, Luciano; LUPU, Ruth. Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells. **Med Hypotheses.**, 64(5):997-1001, 2004.

MILES, Brielle; TADI, Prasanna. **Genetics, Somatic Mutation**. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557896/>. Acesso em: 27 abr. 2021.

MORAIS, Leonor de Sousa. **Cancro de mama Hereditário**: Marcadores moleculares. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde, 2016.

MORRIS, Shannon; CAREY, Lisa. Trastuzumab and beyond: New possibilities for the treatment of HER-2-positive breast cancer. **Oncology** (Williston Park), 20(14):1763-71, 2006.

NAGAI, Maria Aparecida. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor. In: HOFF, Paulo Marcelo Gehm; KATZ, Artur; ODOE FILHO, Vicente; NOVIS, Yana Sarkis (Org.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Genetic Testing for Hereditary Cancer Syndromes**. 2013. Disponível em <https://www.cancer.gov/aboutcancer/causes-prevention/genetics/genetic-testing-fact-sheet>. Acesso em: 18 set. 2020.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 [Homo sapiens (human)]**. 2019a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>. Acesso em: 19 ago. 2020.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]**. 2019b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>. Acesso em: 19 ago. 2020.

NORBURY, Chris; NURSE, Paul. Animal cell cycles and their control. **Annu Rev Biochem.**, 61(1):441-468, 1992.

NURSE, Paul. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, 61(1):441-468, 1992.

OLAYIOYE, M.A.; NEVE, R.M.; LANE, H.A.; HYNES, N.E. The ErbB Signaling Network: Receptor Heterodimerization in Development and Cancer. **EMBO J.**, 3;19(13):3159-67, 2000.

OSBORNE, Cynthia; WILSON, Paschal; TRIPATHY, Debu. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic. **Oncologist.**, 9(4), 361-377, 2004.

PARK, Ben Ho; VOGELSTEIN, Bert. Tumor-Suppressor Genes. In: KUFEL, Donald W.; POLLOCK, Raphael E.; WEICHSELBAUM, Ralph R.; et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6. ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13977/>. Acesso em: 17 dez. 2020.

PICKUP, Michael W.; MOUW, Janna K.; WEAVER Valerie M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of câncer. **EMBO reports**, 15(12):1243-53, 2014.

PLUQUET, Olivier; HAINAUT, Pierre. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer letters**, 174(1):1-15, 2001.

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, BAEHNER F, DABBS DJ.; ET AL. . Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20804570; PMCID: PMC2949637.

RENAULT, Ilana Zalcborg. Genética do câncer de mama: A complexa paisagem genética do câncer de mama familiar - para além de BRCA1 e BRCA2. **Inovar Saúde**, 19-24, 2017.

RIAZ, Syeda Kiran; RASHID, Muhammad Misbah; KAYANI, Mahmood; MALIK, Fraz. Role of HER-2 Ile655Val Polymorphism as Universal Cancer Susceptibility Marker among Different Cancers. **Arch Iran Med.**, 19(6):430-438, 2016.

RICH, Thereasa; WOODSON, Ashley; LITTON, Jennifer; ARUN, Banu. Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. **Journal of Surgical Oncology**, 111(1):66-80, 2015.

RIVU, Sanzana Fareen; APU, Mohd Nazmul; SHABNAZ, Samia; *et al*. Association of TP53 codon 72 and CDH1 genetic polymorphisms with colorectal cancer risk in Bangladeshi population. **Cancer epidemiol.**, 49:46-52, 2017.

ROSENSTEIN, B. S. Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer: Chang-Claude J, Ambrosone CB, Lilla C, *et al* (German Cancer Res Ctr, Heidelberg; Roswell Park Cancer Inst, Buffalo, NY; *et al*) *Br J Cancer* 100:1680-1686, 2009. **Breast Diseases: A Year Book Quarterly**, 21(2):172-173, 2010.

SANCHES, Solange Moraes; SILVA, Jairo Montemor Augusto. Interação entre especialidades: miocardiopatia dilatada e neoplasia de mama HER2 positiva. **Arq Bras Cardiol.**, 94(1):e11-e15, 2010.

SHAH, Sejal; CHEN, Beiyun; Testing for HER2 in breast cancer: a continuing evolution. **Patholog Res Int.**, (10):903:202, 2011.

SILVA, A. S.; ROPELATTO, C.; FILIPPINI, C. A. F.; BRANCHINI, E.; BAGATINI, F.; BROCARD, G. A. Ocorrência do CA de mama no Brasil e no estado de Santa Catarina. **NewsLab**, 52:98-110, 2003.

SJALANDER, A., BIRGANDER, R., HALLMANS, G.; *et al.* P53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*, 17(6):1313-1316, 1996.
SLAMON D.J, CLARK G.M, WONG S.G, LEVIN W.J, ULLRICH A, MCGUIRE W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82. doi: 10.1126/science.3798106. PMID: 3798106.

SNUSTAD, Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos de genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL. **TP53 Gene**. Disponível em: <https://www.stjude.org/research/tumor-registry/ipactr/clinicians/tp53-gene.html>. Acesso em: 16 jun. 2020.

TADA, M.; FURUUCHI, K.; KANEDA, M.; *et al.* Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. **Carcinogenesis**, 22(3):515-517, 2001.

THOMAS, Miranda; KALITA, Ann; LABRECQUE, Sylvie; *et al.* Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol cell biol.**, 19(2):1092-1100, 1999.

VIEIRA, Sabas Carlos. **Câncer de mama**: Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia - Regional Piauí. Teresina: EDUFPI, 2017. 328 p.

VYMETALKOVA, Veronika; SOUCEK, Pavel; KUNICKA, Tereza; *et al.* Genotype and haplotype Analyses of TP53 gene in breast cancer patients: association with risk and clinical outcomes. **PLOS ONE**, 10(7):e0134463, 2015.

WHO. World Health Organization. **Breast Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=In%202020%2C%20there%20were%202.3,the%20world's%20most%20prevalent%20cancer>. Acesso em: 27 abr. 2021.

WILLIS, RA. The spread of tumours in the human body. **Postgrad Med J.**, 29(329), 1952.

XIE, D., SHU, X.O., DENG, Z.; *et al.* Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. **J Natl Cancer Inst.**, 1;92(5):412-417, 2000.

YAGNIK, Garima; JAHANGIRI, Arman; CHEN, Rebecca; *et al.* Papel de um polimorfismo da p53 no desenvolvimento de adenomas hipofisários não funcionais. **Mol Cell Endocrinol.**, 446:81-90, 2017.

YAN, J.J.; TZENG, C.C.; JIN, Y.T. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: An immunohistochemical and clinicopathological study. **J. Oral Pathol Med.**, 25(2):55-9, 1996.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M.X. Untangling the ErbB signaling network. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 2(2):127-37, 2001.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues
Instituição: Universidade Federal do Amapá-UNIFAP
Laboratório: Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia/Ciências Biológicas/UNIFAP
Email: artemis@unifap.br Contato: 9-9975-3976, Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, End. Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02. Bairro: Bairro Universidade, CEP: 68.902-280, Macapá-Amapá.
Comitê de Ética e Pesquisa Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02 Bairro: Universidade. CEP: 68.902-280.
Telefone: (96) 4009-2805 Fax: (96): 4009-2804 Email: cep@unifap.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Identificação de polimorfismos genéticos associados aos principais tipos de neoplasias no estado do Amapá”**. Neste estudo pretendemos, Identificar as principais alterações no DNA associadas com o desenvolvimento do câncer de mama, gástrico, colo de útero, próstata e pulmão em pessoas do estado do Amapá.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é o número crescente de câncer em todo estado do Amapá. A cada dia são diagnosticadas mais pessoas com algum tipo de câncer. Sendo assim, com o conhecimento da biologia molecular do câncer, este estudo nos permitirá identificar pessoas com maior risco de desenvolver um câncer durante sua vida.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos METODOLOGIA: A metodologia adotada não apresenta risco ao participante, pois todas as análises

genéticas serão realizadas em equipamentos. RISCOS E BENEFÍCIOS: O maior desconforto pode ocorrer durante a coleta de sangue. Porém o Sr. (a) será acompanhado (a) por profissionais técnicos de saúde capacitados, que serão responsáveis pela coleta de sangue. Os responsáveis por este estudo se comprometem a realizar palestras com informações sobre a pesquisa, além disso, a orientá-los da melhor forma possível para o esclarecimento de qualquer dúvida. RESSARCIMENTO: Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.

Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr. (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em três (02) vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável na UNIFAP, e a outra será fornecida a você. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Eu, _____, portador do documento da Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Macapá, _____ de _____ de 20

Nome do Voluntário/participante



Profa. Dra. Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues
Pesquisadora Responsável

Contato: 9-9975-3976 email: artemis@unifap.br

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck Km.02. Bairro: Bairro Universidade
Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia

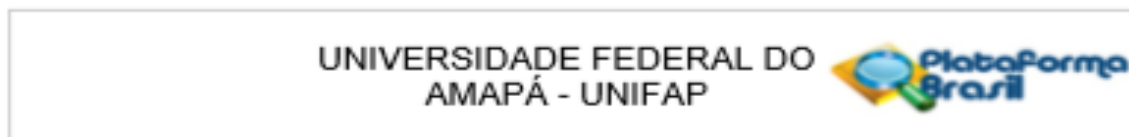
Contato: Comitê de Ética e Pesquisa

Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02

Bairro: Universidade. CEP: 68.902-280.

Telefone: (96) 4009-2805 Fax: (96): 4009-2804 Email: cep@unifap.br

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AOS PRINCIPAIS TIPOS DE NEOPLASIAS NO ESTADO DO AMAPÁ

Pesquisador: Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 2

CAAE: 07398519.3.0000.0003

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.192.190

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer anterior.

Recomendações:

Conforme parecer anterior.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequar o TCLE (ATENDIDA);

Esclarecer os critérios de inclusão e exclusão (ATENDIDA).

Sem pendências.

Endereço: Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade **Cel:** 68.902-260
UF: AP **Município:** MACAPÁ
Telefone: (96)4009-2805 **Fax:** (96)4009-2804 **E-mail:** cep@unifap.br

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo

PLOS ONE

Association between the Arg72Pro genotypes in the TP53 gene and Ile655Val in the HER2 gene and the risk of developing breast cancer in the population of Amapá, northern Brazil. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-21-09480
Article Type:	Research Article
Full Title:	Association between the Arg72Pro genotypes in the TP53 gene and Ile655Val in the HER2 gene and the risk of developing breast cancer in the population of Amapá, northern Brazil.
Short Title:	Association between the genotypes arg72pro, tp53 gene and ile655val, her-2 gene and the breast cancer risk
Corresponding Author:	YASMIN MARIA NUNES CARDOSO Universidade Federal do Amapá: Universidade Federal do Amapá macapá, BRAZIL
Keywords:	TP53 gene, HER-2 gene, breast cancer, Macapá, Brazil
Abstract:	The polymorphisms Arg72Pro in the TP53 gene (rs1042522) and Ile655Val in the HER2 gene (rs1136201) have been related to susceptibility to several types of cancer. Different studies show the association of these polymorphisms with breast cancer, so our aim in this study was to investigate whether the Arg72Pro and Ile655Val polymorphisms have any influence on the risk of developing breast cancer in women from the city of Macapá, Amapá, located in the brazilian amazon region. We then analyzed 80 DNA samples from women with breast cancer and 83 DNA samples from women without the disease, by the Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP) technique. The genotype frequencies for rs1042522 were Ar/Arg 23.7%, Arg/Pro 47.5% and Pro/Pro 28.5% in patients and in controls Ar/Arg 69.8%, Arg/Pro 19.2% and Pro/Pro 10.8%. For the HER-2 gene the frequency of Ile/Ile, Ile/Val and Val/Val genotypes was 82.5%, 17.5% and 0% in the patients and 75.9%, 20.4% and 3.6% in the controls. The presence of at least one altered allele in rs1042522 and rs1136201 polymorphisms was found in 91.25% of patient samples. Therefore, this study found a significant association between the Arg/Pro and Pro/Pro genotypes in the TP53 gene and the Ile/Val genotype in the HER-2 gene and breast cancer risk.
Order of Authors:	YASMIN MARIA NUNES CARDOSO Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues Rafael Lima Resque José Mauro Secco Ana Rita de Cássia Barbosa Miranda Diego Yoshio
Opposed Reviewers:	

ANEXO C – PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

EXTRAÇÃO POR CHELEX 5%

1. Colocar o Swab em um tubo de ensaio com 1 mL de água estéril. Manter em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos.
2. Soltar as fibras do Swab dentro do tubo. Descartar o Swab.
3. Centrifugar 3 min. A 12.000 rpm. Descartar 975 µl de água.
4. Ressuspender o pellet.
5. Adicionar 200 µl de chelex 5%
6. Adicionar 2 µl de proteinase K. Misturar levemente
7. Incubar em banho-maria a 56° C por 15 min.
8. Vórtex de 5 a 10 seg.
9. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 a 20 seg.
10. Banho seco a 100 °C a 8 min. Exatos.
11. Vórtex por 5 a 10 seg.
12. Centrifugar 3 min. A 12.000rpm.