



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VANESSA BECK SEMPÉ

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
DE P53 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E  
SUPEREXPRESSÃO DE HER2**

Porto Alegre  
Novembro/2014

VANESSA BECK SEMPÉ

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
DE P53 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E  
SUPEREXPRESSÃO DE HER2**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Co-orientadora: Mariana Fitarelli-Kiehl, MSc

Porto Alegre

Novembro/2014

“O universo é uma harmonia de contrários.”

*Pitágoras*

## **AGRADECIMENTOS**

À querida professora Dra. Patricia Ashton-Prolla, por ter me proporcionado tamanho crescimento profissional e pessoal, ao me orientar e me servir de exemplo em um meio onde a pesquisa é feita com responsabilidade e competência, baseada no estudo e na discussão.

À minha co-orientadora Mariana Fitarelli-Kiehl, a grande responsável pelo meu respeito e admiração à ciência, por ter tentado me ensinar tudo o que sabia e por ter conseguido me ensinar tudo o que sei sobre a prática de Genética e de Biologia Molecular. Obrigada pela humildade, pelo incentivo incansável e, principalmente, pela amizade.

A todos os demais colegas e amigos do Laboratório de Medicina Genômica do HCPA: Bárbara, Gabriel, Clévia, Cleandra, Nayê, Pati Silva, Fê Vianna, Lili Todeschini, Gustavo, Igor, Rudi e Larissa, pelo apoio, pelas discussões científicas, pelas conversas nada científicas, pelos conselhos e por fazerem do nosso ambiente de trabalho um lugar tão divertido, apesar da seriedade com que conduzimos nossos estudos.

Às grandes amigas que o curso de Biomedicina me proporcionou: Thayssa, Nathália, Laura, Juliana e Laís, pelo companheirismo, pela força que me deram ao longo do caminho e por fazerem da graduação uma experiência que só deixará saudades.

À minha família, sem a qual nenhum sonho seria sequer almejado: Fátima, Carlos, Carlos Jr, Edenir, Oscar e Helena, pelo amor e pela confiança, que parecem vir de outras vidas, e ao meu noivo, Davi, por ser a minha história de maior sucesso, a minha história de amor e inspiração. Vocês têm sido os alicerces de todas as minhas conquistas e dedico mais essa vitória a vocês.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1. Síndrome de Li-Fraumeni .....	12
1.2. Proteína p53 .....	13
1.2.1 Regulação de p53: Mdm2, Mdm4 e Hausp .....	16
1.3. Mutações no gene <i>TP53</i> .....	18
1.4. Câncer de Mama .....	20
1.4.1. Mutações no gene <i>TP53</i> em câncer de mama .....	22
1.4.2. Câncer de mama com superexpressão de HER2 .....	22
1.5. Polimorfismos modificadores de p53 .....	25
1.5.1. Polimorfismo no gene <i>TP53</i> : rs1042522 .....	25
1.5.2. Polimorfismo no gene <i>MDM2</i> : rs2279744 .....	26
1.5.3. Polimorfismo no gene <i>MDM4</i> : rs1563828 .....	27
1.5.4. Polimorfismo no gene <i>HAUSP</i> : rs1529916 .....	27
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Objetivos gerais .....	30
3.2. Objetivos específicos .....	30
<b>4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>31</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....</b>	<b>56</b>
ANEXOS DO TRABALHO.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATM** – *Ataxia Telangiectasia Mutated Gene*

**BRCA1** – *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*

**BRCA2** – *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*

**CHECK2** – *Checkpoint Kinase 2 gene*

**CM** – Câncer de Mama

**EUA** – Estados Unidos da América

**HAUSP** – *Herpes Virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease*

**HBOC** – *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome*

**HER2** – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

**HRM** – *High Resolution Melting*

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

**IHQ** – Imunohistoquímica

**INCa** – Instituto Nacional de Câncer

**KRAS** – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

**MDM2** – *Mouse Double Minute 2*

**MDM4** – *Mouse Double Minute 4 Homolog*

**OMIM** – *On-line Mendelian Inheritance in Man*

**PALB2** – *Partner and Localizer of BRCA2*

**PTEN** – *Phosphatase and tensin homolog gene*

**RE** – Receptor de Estrógeno

**RP** – Receptor de Progesterona

**RT-PCR** – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

**SLF** – Síndrome de Li-Fraumeni (*Li-Fraumeni Syndrome*)

**SLFL** – Síndrome de Li-Fraumeni-like (*Li-Fraumeni-like Syndrome*)

**SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**TP53** – *Tumor Protein p53*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema correlacionando os éxons do gene <i>TP53</i> aos domínios funcionais da proteína p53 .....	14
<b>Figura 2.</b> Ativação de p53 por diferentes sinais de estresse celular e suas funções supressoras de tumor .....	16
<b>Figura 3.</b> Regulação de p53 .....	18
<b>Figura 4.</b> Comparação entre mutações germinativas e somáticas do gene <i>TP53</i> .....	19
<b>Figura 5.</b> Representação comparativa da família de receptores para fatores de crescimento HER .....	24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Genes de predisposição ao CM e respectivas síndromes .....	21
---	----

## RESUMO

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e sua variante, Li-Fraumeni-like (SLFL), são caracterizadas pelo desenvolvimento de vários tipos de câncer em idade precoce e estão associadas a mutações germinativas no gene *TP53*. Estudos sugerem uma forte associação entre estas mutações e a superexpressão da proteína HER2 em carcinomas de mama de mulheres com a síndrome. No entanto, estudo corrente no Brasil analisando grupos de mulheres com câncer de mama (CM) HER2-positivo está identificando uma baixa prevalência de mutações germinativas em *TP53*. Polimorfismos em genes da via de sinalização de p53 também têm sido relacionados ao risco de câncer e à modificação do fenótipo de pacientes com SLF/SLFL. Sendo assim, nós avaliamos pela primeira vez a implicação dos SNPs c.215G/C em *TP53* (p53 Arg72Pro), c.14+309T/G em *MDM2* (SNP309), c.753+572C/T em *MDM4* e c.2719-234G/A em *HAUSP* no risco e na idade ao diagnóstico de pacientes com CM superexpressando HER2, em um contexto de mutações germinativas em *TP53*. O genótipo GG do SNP *MDM2* SNP309 foi mais prevalente apenas em pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53* (*TP53+*) ( $P=0,003$ ), enquanto a frequência do alelo T do SNP *MDM4* c.753+572C/T foi maior apenas em pacientes sem mutação germinativa em *TP53* (*TP53-*) ( $P=0,042$ ). A presença do alelo A no SNP *HAUSP* c.2719-234G/A mostrou ter um efeito protetor, associado a uma idade ao diagnóstico três anos mais tardia nos pacientes *TP53-* ( $P=0,033$ ). Nossos resultados sugerem que polimorfismos na via de sinalização de p53 estão envolvidos com CM superexpressando HER2 de um modo dependente do status mutacional do gene *TP53*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Síndrome de Li Fraumeni (SLF)

Em 1969, os pesquisadores Frederick Li e Joseph Fraumeni realizaram um estudo retrospectivo com a análise de 280 prontuários e de 418 atestados de óbito de crianças com diagnóstico de rhabdomyosarcoma nos Estados Unidos entre 1960 e 1964, identificando uma alta incidência de diferentes tipos de câncer em idade precoce entre os seus familiares. Tanto o grande número de parentes afetados, quanto a frequência elevada de múltiplos tumores primários em jovens, atentaram para a presença de uma nova síndrome de câncer familiar, denominada Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (Li e Fraumeni, 1969a, b).

A SLF (OMIM #151623) é uma síndrome autossômica dominante de predisposição hereditária a vários tipos de câncer diagnosticados em idade jovem. Os principais tumores relacionados à síndrome, chamados de tumores centrais (“*core tumors*”), incluem o câncer de mama, os sarcomas, os tumores do sistema nervoso central, as leucemias e o carcinoma adrenocortical (Li *et al.*, 1988). O carcinoma de mama é o tumor mais frequente em famílias com SLF, contabilizando de 24 a 31,2% dos tumores (Kleihues *et al.*, 1997; Olivier *et al.*, 2003). À medida que mais famílias tenham sido confirmadas com a síndrome, outros tipos de câncer foram sendo relatados, como câncer gástrico, linfoma, melanoma, tumor de células germinativas, tumor de Wilms, câncer colorretal, entre outros (Nichols *et al.*, 2001). A definição clássica e melhor aceita da SLF foi definida como a presença de um probando com sarcoma diagnosticado antes dos 45 anos de idade, acompanhado de um parente de primeiro grau com qualquer tipo de câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade e de outro parente de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma diagnosticado em qualquer idade (Li *et al.*, 1988).

Em 1990, através do sequenciamento do gene *TP53* em leucócitos de indivíduos com suspeita clínica de SLF, Malkin *et al.*, detectaram alterações entre os éxons 5 e 8, associando a SLF a mutações germinativas no gene *TP53* (Malkin *et al.*, 1990). Mais tarde, outras inúmeras famílias foram identificadas com estas mutações, porém com características clínicas incompletas quando considerados os

critérios clássicos da síndrome. Dessa forma, critérios menos restritivos foram utilizados para definir formas variantes da doença, chamadas de Síndrome de Li-Fraumeni-like (SLFL), que incluem Birch, Chompret e Eeles (Birch, 1994; Eeles, 1995; Frebourg *et al.*, 2001). Os pacientes que se encaixam nos critérios clínicos, tanto para a forma clássica quanto para as formas variantes da síndrome, têm indicação para a realização de teste genético a fim do diagnóstico.

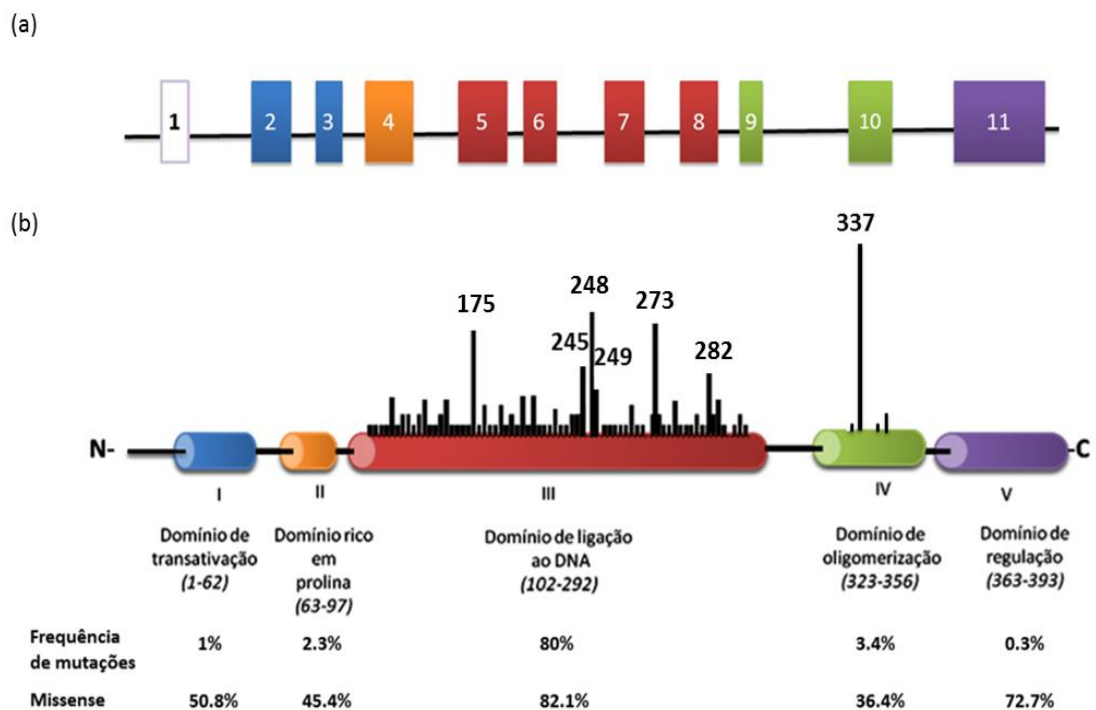
Estudos têm mostrado que cerca de 70% das famílias com SLF e cerca de 40% das famílias com SLFL apresentam mutações germinativas em *TP53* (Kleihues *et al.*, 1978; Olivier *et al.*, 2003; Varley *et al.*, 2003). A falta de concordância de 100% entre mutação germinativa em *TP53* e o fenótipo clássico da doença pode ser explicada por alterações pós-traducionais de p53, por supressão completa de p53, por efeito de genes modificadores de p53 ou por alterações de outros genes que influenciam o fenótipo gerado pela presença de alterações da linha germinativa específica (Malkin *et al.*, 2011).

A SLF apresenta alta penetrância. Indivíduos portadores de mutações germinativas em *TP53* têm um risco de desenvolver algum tipo de câncer estimado em 73% no sexo masculino e de quase 100% no sexo feminino, sendo esta diferença entre os sexos relacionada ao alto risco de câncer de mama nas mulheres. Mais especificamente, o risco de desenvolver câncer antes dos 15 anos, entre 16 e 45 anos e após os 45 anos de idade, pode chegar a 19%, 27% e 54% para o sexo masculino e a 12%, 82% e 100% para o sexo feminino, respectivamente (Wu *et al.*, 2006). A antecipação nas sucessivas gerações de portadores foi descrita (Birch *et al.*, 2001). Estudos na Europa e nos Estados Unidos apontam para uma taxa de portadores de mutação germinativa em *TP53* entre 1:5.000 a 1:20.000 nascidos-vivos (Gonzalez *et al.*, 2009; Laloo *et al.*, 2006). No Brasil, a prevalência de mutações germinativas que ocorrem entre os éxons 5 e 8 do gene *TP53*, chamadas de mutações clássicas, ainda não foi determinada na população geral.

## 1.2 Proteína p53

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

Conhecida como “guardiã do genoma” devido ao seu papel central na manutenção da estabilidade genômica, a proteína p53 é um fator de transcrição que exerce múltiplas funções supressoras de tumor (Levine *et al.*, 1989; Vogelstein *et al.*, 2000). É uma fosfoproteína tetramérica com cerca de 53KDa, cuja estrutura é típica de outros reguladores transcricionais. Cada um de seus monômeros é composto por 393 aminoácidos organizados em pelo menos cinco domínios bem caracterizados estrutural e funcionalmente: a) um domínio de transativação amino-terminal (resíduos 20 a 60); b) um domínio regulatório, rico em prolinas (resíduos 63 a 97); c) um domínio central, altamente conservado evolutivamente, responsável pela ligação de p53 às regiões promotoras de seus genes-alvo (resíduos 100 a 300); d) um domínio de oligomerização, fundamental para a formação dos tetrâmeros de p53 (resíduos 324 a 355); e) um domínio carbóxi-terminal, envolvido na regulação da ligação ao DNA (resíduos 360 a 393) (Beckerman e Prives, 2010) (figura 1).



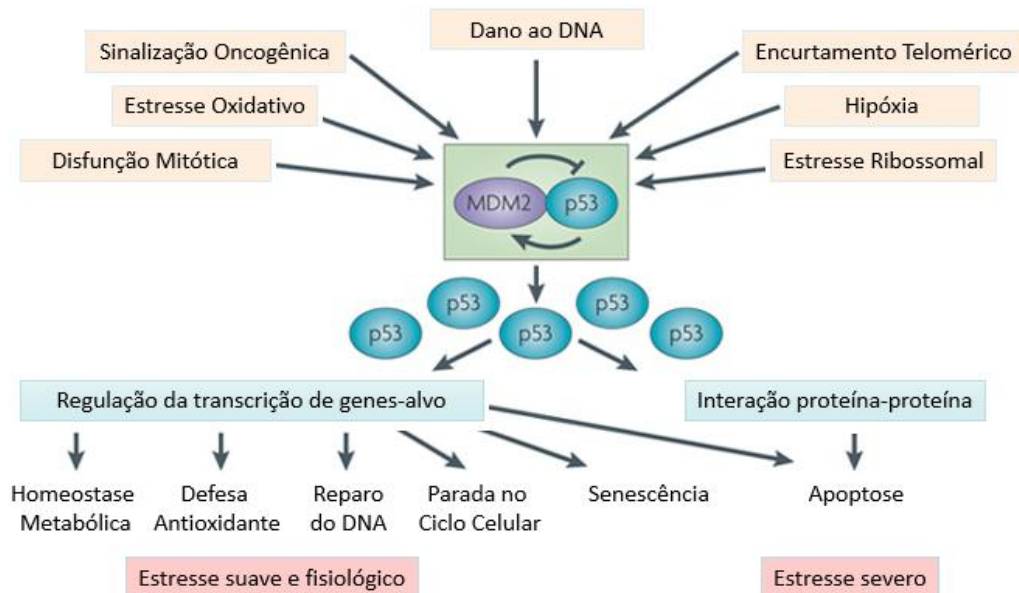
**Figura 1. Esquema correlacionando os éxons do gene TP53 (a) aos domínios funcionais da proteína p53 (b).** Note que cada domínio da proteína p53 é codificada por regiões específicas dispostas entre os éxons 2 e 11 (o éxon 1 não é codificante). Em (b) são indicados os números dos resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio, a frequência de mutações germinativas e os percentuais de mutações de sentido trocado em cada domínio. Também são mostrados os resíduos onde ocorrem as sete mutações mais frequentes do gene, considerados códons “hotspots”, situados no domínio de ligação ao DNA, com exceção do resíduo 337, localizado no domínio de oligomerização. Neste resíduo ocorre a mutação p.R337H, que apresenta uma frequência populacional elevada no sul do

Brasil (aproximadamente 0,3%) devido a um efeito fundador. **Adaptado de Bourdon *et al.*, 2005 (a) e de Brosh e Rotter, 2009 (b).**

As diferentes formas de estresse celular, como dano ao DNA, sinalização oncogênica, hipóxia, estresse oxidativo, encurtamento telomérico, entre outros, promovem a estabilização e ativação de p53 através de modificações pós-traducionais, permitindo que a proteína escape da degradação e inicie um programa transcricional, conduzindo as células à parada no ciclo celular, à apoptose ou à senescência (Vogelstein *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2005). A parada do ciclo celular e a apoptose são as respostas celulares induzidas por p53 melhor caracterizadas até o momento (Olivier *et al.*, 2009). A modulação dos genes relacionados com o ciclo celular por p53 pode levar à parada das células em um dos seus principais pontos de controle: em G1, perto da fronteira com a fase S (impedindo a replicação do DNA), ou em G2, antes da mitose (impedindo a divisão celular). p53 pode modular a expressão dos genes associados com as vias apoptóticas extrínsecas (induzindo a expressão de receptores de morte) ou intrínsecas (induzindo a despolarização e liberação mitocondrial de citocromo C para o citoplasma) (Lacroix *et al.*, 2006). Além da regulação de genes relacionados com a apoptose, p53 parece também ser capaz de atuar diretamente nas mitocôndrias e, por interações proteína-proteína com membros da família BCL2, acionar a permeabilização da membrana externa da mitocôndria e a apoptose (Schuler e Green, 2005; Levine e Oren, 2009). Além disso, estudos têm demonstrado que p53 atua nos processos de indução da senescência, reparo do DNA, diferenciação celular, inibição da angiogênese, inibição da proliferação celular, modulação da migração celular, entre outros (Olivier *et al.*, 2009; Lane e Levine, 2010).

Os sítios de ligação reconhecidos por p53 encontram-se geralmente nas regiões promotoras de seus genes-alvo, que são diferencialmente modulados (induzidos ou reprimidos) dependendo do tipo celular, da natureza do estresse e da extensão do dano (Lacroix *et al.*, 2006; Vousden e Prives, 2009; Beckerma e Prives, 2010). Um nível suave de estresse levaria à parada transitória no ciclo celular, acoplado à tentativa de reparar os danos causados; um nível severo de estresse, no entanto, a respostas mais extremas, geralmente irreversíveis, como apoptose e senescência (Levine e Oren, 2009). Ao exercer múltiplas funções antiproliferativas sobre as células cujo DNA esteja danificado, p53 tem demonstrado ser essencial

para a prevenção do processo de carcinogênese. Na figura 2, é possível acompanhar a atuação da proteína p53 como supressora tumoral.



**Figura 2. Ativação de p53 por diferentes sinais de estresse celular e suas funções supressoras de tumor.** O ciclo de *feedback* p53-Mdm2 é o "coração" da via p53. Diversas formas de estresse (em laranja) ativam p53, que escapa da inibição de Mdm2 e age de duas formas principais (em azul claro) para integrar respostas celulares antiproliferativas, dependentes da natureza do estresse (em rosa). **Adaptado de Levine e Oren, 2009.**

### 1.2.1 Regulação de p53: Mdm2, Mdm4 e Hausp

Embora a capacidade de p53 responder ao estresse celular seja essencial à prevenção do processo carcinogênico, os efeitos de sua resposta podem ser drásticos, incluindo a morte celular. Dessa forma, é preciso manter um delicado equilíbrio da atividade de p53, existindo mecanismos regulatórios bem elaborados para esta função. Em células normais não submetidas a fatores de estresse, o nível e a atividade de p53 são mantidos baixos. Ainda que p53 seja constantemente produzida, sua meia-vida é curta devido à rápida degradação dependente do proteossoma, induzida por seus principais reguladores negativos, as proteínas ubiquitina- ligases Mdm2 e Mdm4.

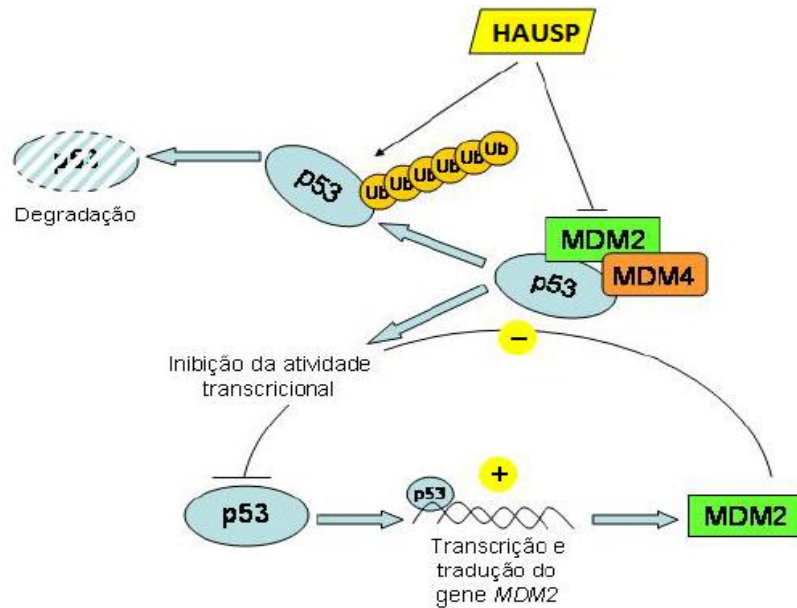
A proteína Mdm2 é codificada pelo gene *MDM2* (OMIM #164785), que está localizado no cromossomo 12q15. Sob condições normais ou não estressadas, Mdm2 tem papel crítico na inibição de p53, atuando de duas formas principais. Primeiramente, pode-se ligar diretamente ao domínio de transativação da região N



terminal de p53, inibindo a sua capacidade de causar a transcrição dos seus genes-alvo (Momand *et al.*, 1992). Além disso, como uma E3 ubiquitina-ligase, Mdm2 adiciona ubiquitinas (resíduos de 76 aminoácidos) na estrutura de p53, encaminhando-a à rápida degradação proteossomal (Haupt *et al.*, 1997). Por outro lado, a transcrição do gene *MDM2* é regulada por p53, que se liga ao promotor P2 de *MDM2* e estimula sua transcrição. Dessa forma, ao ligar-se a p53, Mdm2 cria uma alça de realimentação negativa: os níveis de p53 são controlados por Mdm2 e vice-versa (figura 3).

A proteína Mdm4 é homóloga estrutural de Mdm2. É codificada pelo gene *MDM4* (OMIM #602704), que está localizado no cromossomo 1q32.1. Mdm4 interage com Mdm2 formando um heterodímero com uma alta capacidade de ubiquitinação, levando à degradação de p53 (Wade *et al.*, 2010). Além disso, assim com Mdm2, Mdm4 se liga ao domínio de transativação de p53, inibindo a sua capacidade de causar a transcrição dos seus genes-alvo (Jackson e Berberich, 2000; Stad *et al.*, 2001). Ainda, Mdm4 controla os níveis de Mdm2, inibindo sua auto-ubiquitinação, e é controlada por Mdm2 através da ubiquitinação (Marine *et al.*, 2007).

A regulação de p53 não ocorre apenas pela ação de ubiquitina-ligases. A estabilização dos níveis e da atividade desta proteína conta ainda com uma enzima da família das ubiquitina-proteases específicas, a Hausp, que é codificada pelo gene *HAUSP* (OMIM #602519), localizado no cromossomo 16p13.2. Hausp promove tanto a desubiquitinação de p53, protegendo-a da degradação, quanto a desubiquitinação de Mdm2 e Mdm4, funcionando como importante regulador da rota como um todo (Books *et al.*, 2004; Books *et al.*, 2007). A interação p53, Mdm2, Mdm4 e Hausp pode ser vista na figura 3, a seguir.



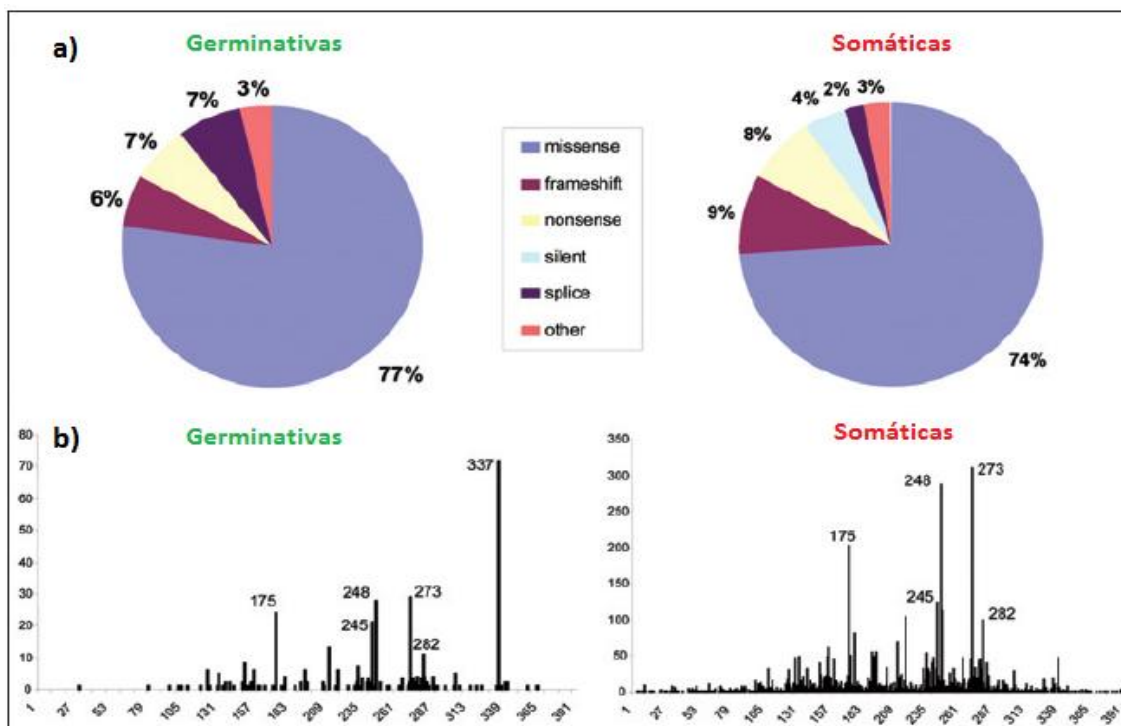
**Figura 3. Regulação de p53.** p53 liga-se à região promotora de *MDM2*, regulando sua expressão. As proteínas Mdm2 e Mdm4 se ligam e inativam p53 pela inibição das atividades transcripcionais de p53 e pela promoção da ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal de p53. A proteína Hausp desubiquitina p53 e inativa o complexo Mdm2-Mdm4. **Adaptado de Books et al., 2007.**

### 1.3 Mutações no gene *TP53*

A perda de função de p53 por mutações deletérias no gene *TP53*, permite que a divisão celular ocorra mesmo que o DNA esteja danificado, predispondo as células a um rápido acúmulo de danos genéticos. Assim como as mutações, os polimorfismos em *TP53* também podem desempenhar um papel no desenvolvimento de tumores. O banco de dados do gene *TP53*, mantido e desenvolvido pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, <http://www-p53.iarc.fr/>), inclui mutações somáticas, mutações germinativas ou variações na sequência de DNA, que foram relatadas na literatura desde 1989.

O tipo e a distribuição das mutações somáticas e germinativas em *TP53* são muito similares (figura 4) e, considerando todas as alterações já identificadas e compiladas no banco de dados da IARC, cerca de 75% são substituições de apenas um nucleotídeo que promovem a troca de um aminoácido (mutações *missense* ou de sentido trocado) (figura 4a) (Olivier et al., 2010). Estas mutações ocorrem predominantemente na região correspondente ao domínio de ligação ao DNA de p53

(entre os éxons 5 e 8) (Hainaut e Hollstein, 2000; Petitjean *et al.*, 2007). Embora já tenham sido identificadas substituições em quase todos os resíduos deste domínio, há seis códons preferenciais ou “*hotspots*” (R175, G245, R248, R249, R273 e R282) (figura 1b e 4b) onde ocorrem aproximadamente 30% das mutações em *TP53* (Brosh e Rotter, 2009; Oliver *et al.*, 2010).



**Figura 4. Comparação entre mutações germinativas e somáticas do gene *TP53*.** a) Os gráficos circulares mostram a proporção dos diferentes tipos de mutações germinativas e somáticas em *TP53*. b) Os histogramas mostram os principais pontos de mutação germinativa e somática na sequência codificante de *TP53*. Adaptado de Oliver *et al.*, 2010.

Além destes seis *hotspots*, uma importante mutação é encontrada no resíduo 337 de *TP53*, correspondente ao domínio de oligomerização de p53 (figura 1b). A mutação *TP53*-p.R337H consiste na substituição nucleotídica G>A (c.1010G>A) no éxon 10 do gene *TP53* e promove a troca de uma arginina para uma histidina. Esta alteração tem sido identificada em alta frequência nas regiões sul e sudeste do Brasil, em pacientes afetados com diferentes tipos de tumores, tanto na população em geral quanto em famílias que preenchem critérios de SLF e SLFL, devido a um efeito fundador (Figueiredo *et al.*, 2006; Achatz *et al.*, 2007; Palmero *et al.*, 2008; Garritano *et al.*, 2010). Sua relação patogênica com o câncer de mama no fenótipo

SLFL poderia explicar, ao menos em parte, a elevada incidência da deste tipo de câncer na região.

A maioria das mutações em *TP53* encontradas em células tumorais humanas impede a ligação de p53 à sequência de DNA alvo. Os *hotspots* apresentam sítios CpG, onde citosinas são geralmente metiladas e sua desaminação espontânea induz à transição de citosina para timina. Substituições nestes resíduos resultam em uma proteína com menor afinidade pelo DNA e, portanto, com menor capacidade de atuar como fator de transcrição e suprimir a proliferação celular (Szymanska e Hainaut, 2003). Além disso, acredita-se que, em heterozigotos, a proteína p53 mutante possa apresentar ação dominante-negativa sobre p53 selvagem através de hetero-oligomerização das proteínas normais e mutantes na formação do tetrâmero funcional, contribuindo para a inativação de p53 selvagem (Brosh e Rotter, 2009; Oliver *et al.*, 2010). Ainda, a proteína p53 mutante pode ter um ganho de função ao adquirir propriedades oncogênicas, inativando p63 e p73, outros membros da família de p53 que em condições normais têm a função de suprimir a tumorigênese (Brosh e Rotter, 2009).

#### 1.4 Câncer de Mama

Em mulheres, o câncer de mama (CM) é o tumor maligno mais comum e a segunda principal causa de morte por câncer. Para 2014, estima-se o surgimento de 57.120 casos novos da doença no Brasil, risco estimado de 56 casos a cada 100 mil mulheres. A região sul do país apresenta uma das maiores taxas de incidência, podendo chegar a cerca de 88 casos de CM a cada 100 mil mulheres (INCa, 2014).

A história familiar de câncer de mama é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da doença e estima-se que 5 a 10% dos casos estejam relacionados à predisposição hereditária (Walsh *et al.*, 2006; Euhus *et al.*, 2013). Os determinantes genéticos desta doença ainda não estão totalmente caracterizados. O gene *TP53* foi um dos primeiros genes a ser relacionado com o CM familiar, em 1990 (Malkin *et al.*, 1990), seguido pelos genes *BRCA1*, em 1994, e *BRCA2*, em 1995 (Euhus *et al.*, 2013), estes dois últimos envolvidos na Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC).

Em geral, as mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ocorrem em cerca de 1: 400 a 1: 800 mulheres numa população não selecionada para história

familiar e confere um elevado risco (40 a 80%) de desenvolver câncer de mama ao longo da vida. Mutações deletérias nos genes *TP53* e *PTEN* também conferem um risco elevado do desenvolvimento da doença ao longo da vida, mas ocorrem mais raramente na população. Uma série de mutações de penetrância moderada também já foram associadas ao câncer de mama familiar, incluindo alterações nos genes *CHEK2*, *PALB2*, entre outros. Ao todo, as mutações de alta e moderada penetrância à susceptibilidade ao câncer de mama, provavelmente, representem pouco mais de 30% dos casos de CM familiar. A proporção de risco restante pode ser explicada por alelos comuns de baixa penetrância dos quais se têm estudado, principalmente, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (Maxwell e Nathanson, 2013). Na tabela 1, a seguir, estão relacionados alguns dos principais genes de predisposição ao CM.

**Tabela 1. Genes de predisposição ao CM e respectivas síndromes.** Essa tabela mostra alguns dos principais genes de predisposição ao CM, dispostos por ordem de penetrância. Adaptado de Euhus *et al.*, 2013.

Gene	Risco de vida para CM (%)	Frequência Alélica (%)	História familiar e indicação fenotípica
<i>BRCA1</i>	65-81	0,06-1,5	Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário: CM de aparecimento precoce, câncer de ovário, aumento modesto no risco de CM masculino.
<i>BRCA2</i>	45-85	0,06-1,5	Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário: CM de aparecimento precoce/tardio, câncer de ovário, melanoma, câncer pancreático, CM masculino.
<i>TP53</i>	50-80	<0,0005	Síndrome de Li-Fraumeni: CM de aparecimento muito precoce, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumores cerebrais, tumores de phyllodes, e outros. RE-positivo, PR-positivo, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2-positivo no CM.
<i>PTEN</i>	50-85	0,0005	Síndrome de Cowden: CM, doenças benignas e malignas na tireóide, câncer de endométrio, câncer colorretal, macrocefalia, triquilemomas, queratoses palmo-plantar, papilomatose da mucosa oral, doença benigna da mama; 11% -48% mutações <i>de novo</i> .
<i>PALB2</i>	20-30	0,2	CM de aparecimento tardio, o CM masculino, o câncer de pâncreas
<i>CHEK2</i>	15-25	0,3-1,7	Espectro de câncer similar à síndrome de Li-Fraumeni, mas menor penetrância; CM masculino

#### **1.4.1 Mutações no gene *TP53* em câncer de mama**

Estudos sugerem uma forte associação entre a presença de mutações germinativas em *TP53* e a superexpressão da proteína HER2 em carcinomas de mama. Segundo estudos da América do Norte, cerca de 63 a 83% dos tumores de mulheres portadoras de mutação germinativa neste gene apresentam superexpressão de HER2, comparados a 19% a 25% naquelas sem mutação germinativa em *TP53* (Wilson *et al.*, 2010; Melhem-Bertrandt *et al.*, 2012; Masciari *et al.*, 2012). Estima-se que em mulheres jovens (idade média de 38,5 anos) diagnosticadas com câncer de mama, o desenvolvimento de tumor HER2-positivo pode aumentar em cerca de 7 vezes a probabilidade de apresentar mutação germinativa em *TP53* (Melhem-Bertrandt *et al.*, 2012).

Embora mutações germinativas em *TP53* tenham sido classicamente associadas à SLF, a frequência destas mutações em mulheres com câncer de mama, independente do subtipo, diagnosticado antes dos 30 anos de idade e não selecionadas para história familiar, varia de 1 a 7% (Lalloo *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2009; Mouchawar *et al.*, 2010). Em contraste, ao restringir este grupo para mulheres com câncer de mama do subtipo HER2-positivo diagnosticado até os 50 anos de idade, Rath *et al.* mostraram que apenas 1,4% das pacientes (3 de 213) eram portadoras de mutação germinativa em *TP53* (Rath *et al.*, 2013). Corroborando com este estudo, dados não publicados do nosso grupo mostram que 6,6% de mulheres (7 de 106) com câncer de mama e superexpressão de HER2 diagnosticado antes dos 60 anos de idade apresentaram mutação germinativa em *TP53* (Fitarelli-Kiehl *et al.*). Uma possível explicação para a baixa prevalência encontrada por ambos os grupos é a presença de outro mecanismo pelo qual a célula possa atenuar a atividade de p53 no processo de carcinogênese, como polimorfismos em genes cujos produtos estejam envolvidos com a sua via de regulação.

#### **1.4.2 Câncer de mama com superexpressão de HER2**

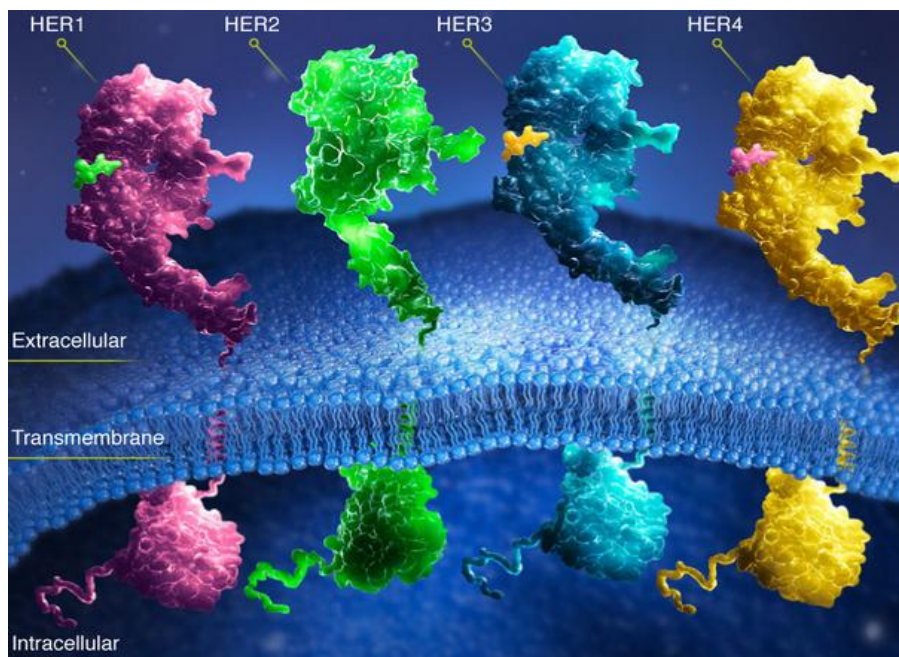
O câncer de mama representa um grupo altamente heterogêneo de tumores, tanto a nível clínico quanto molecular (Voduc *et al.*, 2010; Minafra *et al.*, 2012). É possível a identificação de subgrupos moleculares (luminais A e B, HER2 e basal) empregando imunohistoquímica (Gobbi, 2012).

A proteína HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) é um receptor de membrana com atividade tirosina quinase, codificada pelo oncogene *ERBB2* (também conhecido como *c-erbB-2*), localizado no cromossomo 17q21-22 (Coussens *et al.*, 1985). Está superexpressa em aproximadamente 15 a 30% dos casos de câncer de mama (Slamon *et al.*, 1989; Ross e Fletcher, 1998; Collins *et al.*, 2012). Em cerca de 90% dos casos de câncer de mama HER2-positivos, a superexpressão de HER2 está associada à amplificação (aumento do número de cópias) do oncogene *ERBB2*. Os outros mecanismos de superexpressão ainda não estão totalmente esclarecidos, mas parecem estar relacionados com alterações na transcrição gênica, na meia-vida ou no processo de reciclagem da proteína HER2 (Magnifico *et al.*, 2007).

HER2 faz parte de uma família composta por quatro receptores de fatores de crescimento (HER1 ou EGFR, HER2, HER3 e HER4), os quais apresentam homologia estrutural, com (1) um domínio extracelular de ligação a ligante (com exceção de HER2), (2) um domínio transmembrana e (3) um domínio intracelular com função tirosina quinase (Figura 5) (Moasser, 2007). Para os membros HER1, HER3 e HER4, a ligação de ligantes aos seus domínios extracelulares induzem uma mudança conformacional, que promove a dimerização e a consequente transfosforilação de seus domínios intracelulares. A proteína HER2, no entanto, não apresenta sítio para ligação de ligante externo e o seu domínio extracelular existe em uma conformação constitutivamente ativa. Em células normais, HER2 preferencialmente forma heterodímeros com HER3 quando este sofre mudança conformacional induzida por ligante; em células que superexpressam HER2, porém, homodímeros de HER2 são formados espontaneamente, permitindo que seus domínios intracelulares sejam transfosforilados sem a necessidade de um sinal extracelular que regule a via. Estes resíduos fosforilados ativam uma série de cascatas de mensageiros secundários, estimulando vias de sinalização intracelular. Assim, fatores de transcrição são ativados e regulam genes envolvidos na proliferação celular, na sobrevivência, na diferenciação, na angiogênese, na invasão e na metástase (Moasser, 2007; Gutierrez e Schiff, 2011). Dessa forma, tumores



com superexpressão de HER2 são particularmente agressivos, com aumento do potencial proliferativo e metastático (Ross *et al.*, 2003).



**Figura 5. Representação comparativa da família de receptores para fatores de crescimento HER.** Observa-se a semelhança estrutural entre os quatro receptores, com um domínio extracelular de ligação a ligante (exceto em HER2), um domínio transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosina quinase. **Extraído de <http://www.biooncology.com/research-education/hdis/her2-dimerization>, acesso em 02 de out, 2014.**

A análise da expressão de HER2 é um procedimento de rotina para as pacientes com diagnóstico de câncer de mama. O método predominantemente utilizado é a imunohistoquímica (IHQ), que detecta os níveis da proteína HER2 nas células tumorais através da utilização de anticorpos mono ou policlonais. Por esta análise, os carcinomas de mama podem ser classificados em uma escala de 0 a 3+, sendo HER2 0 ou 1+ (negativos para expressão de HER2), HER2 2+ (expressão intermediária, considerado resultado indeterminado para superexpressão de HER2) e HER2 3+ (positivos para superexpressão de HER2). Segundo recomendações da ASCO/CAP, tumores com expressão HER2 2+ devem ser submetidos à hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que define o número de cópias do gene *ERBB2* nas células. Tumores com resultado 2+ na IHQ e positivo na análise por FISH são considerados positivos para superexpressão de HER2 (Wolff *et al.*, 2007).

Atualmente, duas drogas estão aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento específico de pacientes com câncer de mama



HER2-positivo: o trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Genentech), um anticorpo monoclonal humanizado que reconhece o domínio externo de HER2 e inibe as vias de sinalização desencadeadas por esta proteína; e o lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline), um inibidor que bloqueia a atividade tirosina quinase de HER2. O direcionamento da terapia tem melhorado as perspectivas de pacientes com esse subtipo agressivo de câncer de mama, mas o tratamento só é eficaz em pacientes cujos tumores expressam altos níveis de HER2 ou apresentam amplificação do gene *ERBB2* (Gutierrez e Schiff, 2011).

## 1.5 Polimorfismos modificadores de p53

Além das mutações no gene *TP53*, inúmeros SNPs germinativos já foram identificados, tanto em *TP53* quanto nos genes que codificam os seus reguladores, *MDM2*, *MDM4* e *HAUSP*. Ao contrário do efeito causal das mutações germinativas em *TP53*, os polimorfismos exercem efeitos mais sutis no desenvolvimento do câncer. Além disso, estudos têm demonstrado a ação desses SNPs como modificadores do fenótipo de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni (Bougeard *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2010).

### 1.5.1 Polimorfismo no gene *TP53*: rs1042522 (c.215G/C, p53 Arg72Pro)

O polimorfismo c.215G/C (p53 Arg72Pro, rs1042522) é um dos mais estudados em *TP53* e já foi caracterizado como uma variante funcional (Sun *et al.* 2010). Localizado no códon 72, no éxon 4, este SNP resulta na substituição de aminoácido de uma prolina (Pro) para uma arginina (Arg) e, dependendo do alelo presente, codifica a proteína p53 com diferentes propriedades. O resíduo 72 fica no domínio de p53 rico em prolina (figura 1), essencial para a resposta apoptótica completa. Embora o alelo 72Arg resulte em uma proteína capaz de induzir apoptose com cinética mais rápida, o alelo 72Pro resulta em uma proteína que induz senescência de forma mais eficiente e interrompe o ciclo celular com maior eficácia (Dumont *et al.* 2003; Pim and Banks 2004; Oliver *et al.*, 2010).

A associação de p53 Arg72Pro com o risco de câncer de mama, tanto esporádico quanto familiar, tem sido amplamente investigada, mostrando resultados contraditórios em diferentes populações. Alguns estudos associam o genótipo

ArgArg à predisposição ao câncer de mama (Buyru, *et al.*, 2003; Ohayon *et al.*, 2005); outros, o alelo 72Pro ao risco aumentado de desenvolver a doença (Huang *et al.*, 2003; Proestling *et al.*, 2012; Krivokuca *et al.*, 2014). Alguns estudos de meta-análises, no entanto, não detectam nenhuma associação (Schmidt *et al.*, 2007; He *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013).

Com relação à idade ao aparecimento de câncer, os dados são mais consistentes, relacionando a presença do alelo 72Arg à antecipação da idade ao diagnóstico, tanto em pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*, com início de câncer cerca de 12 anos mais cedo (Bougeard *et al.*, 2006), quanto em pacientes não selecionados para história familiar (Proestling *et al.*, 2012). A média de idade ao surgimento de tumor nos pacientes com SLF é ainda menor quando também são portadores do alelo de risco para o *MDM2* SNP309, indicando um efeito cumulativo de ambos os polimorfismos (Bougeard *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Polimorfismo no gene *MDM2*: rs2279744 (c.14+309T/G, *MDM2* SNP309)**

No gene *MDM2*, há um importante polimorfismo no íntron 1, região intrônica-promotora, c.14+309T/G (*MDM2* SNP309, rs2279744). A mudança do alelo T para o alelo G aumenta a afinidade do fator de transcrição SP1 de *MDM2*, aumentando a sua transcrição e, conseqüentemente, os níveis elevados da proteína Mdm2, que é um regulador negativo crítico de p53, atenuam a resposta de p53 ao estresse e levam a um aumento do risco de câncer e/ou à formação de tumores com progressão acelerada. (Bond *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2000).

O *MDM2* SNP309 tem sido associado ao risco de câncer de mama, mas os resultados são inconclusivos. Embora vários estudos, alguns deles com milhares de amostras de pacientes, não mostrem nenhuma associação entre o alelo SNP309G e o risco do desenvolvimento da doença (Schmidt *et al.*, 2007; Wilkening *et al.*, 2007), já foram publicados trabalhos indicando esta associação (Post *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Em 2010, foram gerados camundongos a partir da introdução das sequências promotoras humanas no locus de murino homólogo para examinar os efeitos diretos do SNP309 sobre a tumorigênese. Foi visto que o genótipo GG resultava em um aumento do risco de tumores esporádicos, e o alelo SNP309G potencializava o fenótipo tumoral e alterava o espectro de tumores em camundongos que herdavam uma mutação no hotspot p53R172H. Estes dados

fornece evidências para o efeito causal do alelo SNP309G no aumento do risco de câncer em humanos, tanto esporádico quanto familiar (Post *et al.*, 2010). Além disso, um estudo que analisou o *MDM2* SNP309 em pacientes com SLF sem mutação germinativa em *TP53* mostrou que estas tiveram o dobro da porcentagem do genótipo GG do que a população geral, sugerindo que o polimorfismo pode ter efeito causador adicional desta síndrome (Ruijs *et al.*, 2007).

Quanto à idade, o alelo SNP309G tem sido encontrado em uma maior frequência em pacientes com câncer de mama precoce (Lang *et al.*, 2009) e tem sido associado à antecipação da idade ao diagnóstico de câncer tanto nas pacientes com SLF, diagnosticadas, em média, 11 anos mais cedo (Bond *et al.*, 2004; Bougeard *et al.*, 2006; Ruijs *et al.*, 2007; Marcel *et al.*, 2009), quanto nas pacientes sem nenhuma mutação conhecida em *TP53* (Bond *et al.*, 2006; Wasielewski *et al.*, 2006). Esse alelo também está associado a um risco aumentado de câncer de mama e de ovário em pacientes com mutações herdadas em *BRCA1* e *BRCA2* (Yarden *et al.*, 2008).

### **1.5.3 Polimorfismo em *MDM4*: rs1563828 (c.753+572C/T)**

No gene *MDM4*, há um polimorfismo no íntron 9, que consiste na alteração c.753+572C/T (rs1563828). O efeito desta variante na rota de p53 ainda não é bem compreendido. No entanto, de forma semelhante à proteína Mdm2, a haploinsuficiência de Mdm4 conduz a um aumento da atividade de p53, sugerindo que a mudança de um par de base em *MDM4* poderia alterar os níveis da proteína o suficiente para afetar a via de p53 (Terzian *et al.*, 2007).

Embora esse polimorfismo não pareça estar associado ao risco para o câncer de mama, pacientes homozigotas para o genótipo TT estão associadas a menor idade ao início da doença (Song *et al.*, 2012). Em um estudo publicado em 2009, a análise de haplótipos contendo o polimorfismo rs1563828 foi associada com idade precoce ao diagnóstico de câncer de mama com receptor de estrogênio negativo, mas não com receptor de estrogênio positivo (Kulkarni *et al.*, 2009). Em portadores da mutação germinativa em *TP53*, não parece haver impacto do polimorfismo sobre o aparecimento de tumor (Fang *et al.*, 2010).

### **1.5.4 Polimorfismo em *HAUSP*: rs1529916 (c.2719-234G/A)**

No gene *HAUSP*, há um polimorfismo no íntron 25, que consiste na alteração c.2719-234G/A (rs1529916). O efeito desta variante na via de p53 ainda não é bem esclarecido. A presença do alelo A já foi associada com infertilidade e com maior agressividade em tumores de próstata (Kang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010), mas o seu efeito no contexto de pacientes com câncer de mama e/ou com SLF ainda não é conhecido.

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama com superexpressão de HER2 é particularmente agressivo e tem sido associado a um pior prognóstico. Dessa forma, uma melhor caracterização molecular das pacientes diagnosticadas com este subtipo de tumores de mama poderia contribuir para o melhor entendimento da doença.

Mutações germinativas em *TP53* ocorrem em 1 a 7% de mulheres com câncer de mama em idade muito jovem (antes dos 30 anos) e não selecionadas para história familiar. A superexpressão de HER2 supostamente aumenta a chance de se identificar mutação em *TP53* em aproximadamente 7 vezes (Melhem-Bertrandt et al., 2012). Porém, ao contrário desta suposição, estudos recentes encontraram uma baixa prevalência de mutações germinativas em *TP53* em pacientes com câncer de mama com superexpressão de HER2 (Rath et al., 2013; Fitarelli-Kiehl et al., 2014). Baseando-se na existência de variantes genéticas funcionais, tanto em *TP53* quanto em genes da sua via de sinalização (*MDM2*, *MDM4* e *HAUSP*) capazes de atenuar a via de p53, nossa proposta no presente estudo é avaliar se os polimorfismos *TP53* c.215G/C (p53 Arg72Pro, rs1042522), *MDM2* c.14+309T/G (*MDM2* SNP309, rs2279744), *MDM4* c.753+572C/T (rs1563828) e *HAUSP* c.2719-234G/A (rs1529916) poderiam contribuir como fatores de risco adicionais para o desenvolvimento desse tipo específico de câncer de mama.

Alguns destes polimorfismos já foram propostos como modificadores do fenótipo relacionado a mutações germinativas em *TP53* em pacientes com câncer de mama. Portanto, também se justifica a investigação da sua potencial influência na idade ao diagnóstico dessas pacientes, num contexto de superexpressão de HER2.

O estudo é relacionado à linha de pesquisa desenvolvida durante o Doutorado de Mariana Fitarelli-Kiehl, um projeto mais abrangente que investiga a prevalência de alterações germinativas em *TP53* em câncer de mama HER2-positivo, bem como os diferentes fatores que potencialmente levam ao aumento da expressão de HER2.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Investigar o papel de polimorfismos em *TP53* e em genes da via de sinalização de p53 em pacientes com câncer de mama e superexpressão de HER2, nos contextos de presença e ausência de mutações germinativas em *TP53*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

**3.2.1** Determinar as prevalências alélicas e genóticas dos polimorfismos p.Arg72Pro (rs1042522) em *TP53*, c.14+309T/G (rs2279744) em *MDM2*, c.753+572C/T (rs1563828) em *MDM4* e c.2719-234G/A (rs1529916) em *HAUSP* em mulheres que desenvolveram CM com superexpressão de HER2 e comparar com grupo controle de mulheres sem CM.

**3.2.2** Comparar as prevalências alélicas e genóticas desses mesmos polimorfismos nas mulheres com CM e superexpressão de HER2 positivas para mutação germinativa em *TP53* e negativas para mutação germinativa em *TP53* com o grupo controle de mulheres sem CM.

**3.2.3** Avaliar o impacto desses polimorfismos na idade ao diagnóstico do CM com superexpressão de HER2 tanto nas pacientes positivas para mutação germinativa em *TP53* quanto nas pacientes negativas para mutação germinativa em *TP53*.

#### 4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Formatado para submissão no periódico *Cancer genetics*

**Polymorphisms in the p53 signaling pathway are associated with HER2-overexpressing breast cancer in a *TP53* mutation dependent manner.**

Vanessa Beck Sempé<sup>a</sup>, Mariana Fitarelli-Kiehl<sup>a,b</sup>, Gabriel de Souza Macedo<sup>a,b</sup>, Igor Araujo Vieira<sup>a</sup>, Patrícia Santos-Silva<sup>a,c</sup>, Patricia Ashton-Prolla<sup>a,b,c,d,e\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil;

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>d</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>e</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Patricia Ashton-Prolla, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, BRAZIL, Tel: +55 51 3359 7473. Email address: [pprolla@hcpa.ufrgs.br](mailto:pprolla@hcpa.ufrgs.br)

## Abstract

Li–Fraumeni and Li–Fraumeni-like syndromes (LFS/LFL), characterized by the development of multiple early onset cancers, are associated with germline *TP53* mutations. Studies suggest a strong association between these mutations and overexpression of HER2 protein in breast cancer (BC). In groups of women with HER2-positive BC, however, has been identified a low prevalence of germline *TP53* mutations. Polymorphisms in the p53 signaling pathway also have been linked to cancer risk and modifier effects on LFS/LFL. We assessed the involvement of SNPs p53 Arg72Pro, *MDM2* SNP309, *MDM4* c.753+572C/T and *HAUSP* c.2719-234G/A on risk and age at diagnosis of patients with HER2-overexpressing BC in the context of germline *TP53* mutations. *MDM2* SNP309 GG genotype was more prevalent only in *TP53* germline mutation carriers (*TP53+*) ( $P=0.003$ ) while the frequency of the *MDM4* c.753+572 T allele was higher only in patients without germline *TP53* mutations (*TP53-*) ( $P=0.042$ ). Presence of the *HAUSP* c.2719-234 A allele had a protective effect, resulting in a 3 years delay in the age of cancer diagnosis in the *TP53* mutation negative patients ( $P=0.033$ ). These results suggest that polymorphisms in the p53 signaling pathway may be involved with HER2-overexpressing BC in *TP53* mutation status dependent manner.



**Keywords:** germline *TP53* mutation, HER2-overexpressing breast cancer, *MDM2* SNP309, *MDM4* c.753+572C/T, *HAUSP* c.2719-234G/A, p53 Arg72Pro

## Introduction

Li–Fraumeni syndrome (LFS) (OMIM #151623) is a rare autosomal dominant disorder of predisposition to multiple early onset cancers, caused by a germline mutation in the *TP53* tumour suppressor gene (OMIM #191170) [1, 2]. The most frequent cancers associated with LFS are breast cancer (BC), bone and soft tissue sarcomas, brain tumors and adrenocortical carcinomas. Other less frequent cancers include leukemia, stomach cancer and colorectal cancer [3]. Families with incomplete features of LFS are referred to as having Li-Fraumeni-like syndrome (LFL), for which several clinical definitions have been proposed, as Birch, Chompret and Eeles [4 – 6].

The p53 protein is involved in many cellular functions, including cell cycle arrest, apoptosis, DNA repair and maintenance of genetic integrity [7]. *TP53* germline mutations, detected in about 77% of LFS and 40% of LFL families [8], can lead to decrease or loss of these functions and, consequently, other genetic alterations may accumulate in the cell [9]. Previous studies suggest a strong association between the presence of germline *TP53* mutations and overexpression of HER2 protein in breast carcinomas. Approximately 63-83% of the breast tumors occurring in women with germline *TP53* mutations showed overexpression of HER2 compared to 19-25% in those diagnosed in women without germline *TP53* mutations [10 – 12].

The HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) protein is a membrane receptor with tyrosine kinase activity, overexpressed in about 15 to 30% of BC [13 – 15]. When overexpressed, HER2 is able to activate and regulate intracellular expression of different genes involved in the growth and proliferation of tumor cells signaling [16]. Therefore, tumors overexpressing HER2 are particularly aggressive with increased proliferative and metastatic potential [17].

Although germline *TP53* mutations have been classically associated with LFS, the frequency of these mutations in women diagnosed with BC before 30 years old, unselected for family history, ranges from 1 to 7% [18 – 21]. However, when this group is restricted to women with HER2-overexpressing BC, a low prevalence of

germline *TP53* mutation is shown in these patients. Rath et al. showed that in women with HER2-positive (HER2+) BC diagnosed before 50 years old, only 1.4% of patients (3 of 213) were carriers of germline *TP53* mutation [22]. Corroborating this study, unpublished data from our group show that 6.6% of women (7 of 106) with HER2-overexpressing BC diagnosed before 60 years old showed germline *TP53* mutation [23].

In addition to mutations, numerous germline single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have already been identified in *TP53* and in other genes of the p53 pathway, such as *MDM2*, *MDM4* and *HAUSP*. In normal cells, that are not exposed to stress, levels of p53 must be kept low. Acting as an ubiquitin protein ligase (E3), the Mdm2 oncoprotein is a key negative regulator of p53, which targets p53 towards ubiquitination and proteasomal degradation [24]. Mdm4, which is a structural homologue of Mdm2, interacts with Mdm2 forming a heterodimer with a high capacity for ubiquitination, both leading to degradation of p53 [25]. Hausp stabilizes Mdm2, Mdm4 and p53 via its specific deubiquitinase activity [26]. The Mdm2, Mdm4 and Hausp proteins thus maintain p53 level and activity. The pivotal role of these proteins in the control of p53 argues that polymorphisms at these loci may be important for the modulation of p53 function and may exert some effects on risk of cancer or tumor onset [27].

Based on the surprising low prevalence of germline *TP53* mutations found in patients with HER2+ BC in a local cohort and on the existence of functional genetic variants able to attenuate the p53 pathway, in this study we analyzed the polymorphisms *TP53* c.215G/C (p53 Arg72Pro, rs1042522), *MDM2* c.14+309T/G (*MDM2* SNP309, rs2279744), *MDM4* c.753+572C/T (rs1563828) and *HAUSP* c.2719-234G/A (rs1529916) in women with HER2-overexpressing BC. We hypothesized that these SNPs could act as modulating factors on HER2-overexpressing breast cancer risk, contributing to the development of this specific subtype of the disease. We evaluated for the first time the involvement of these SNPs on risk and age at diagnosis of patients with HER2-overexpressing BC in the context of presence or absence of germline *TP53* mutations.

## **Materials and methods**

### **Patients**

Overall, 110 patients (table 1) were recruited using the following inclusion criteria: women with breast cancer (BC) diagnosed before age 60 years and presenting an immunohistochemical analysis of the tumor showing HER2 overexpression (2+ and 3+). In addition, were screened 184 asymptomatic women who participated in a BC screening program in Southern Brazil [28]. All individuals recruited for this study provided written informed consent and authorized the publication of their pedigrees. This study was approved by the institutional research and ethics committees of the coordinating center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), under protocol # 11-0427.

## **Study groups**

### **Prevalence of polymorphisms**

For the genotypic and allelic prevalence analysis, we included a consecutive sample of 106 patients with HER2-overexpressing BC, diagnosed at HCPA between the years 2007 and 2012 and unselected for family history of cancer. These women were previously genotyped for the *TP53* gene, and 7 of them carried the following germline mutations: c.108G>A/c.993+12T>C; p.G244D/WT; p.K351E/WT; c.1100+30A>T/WT and c.639A>G/WT (the last one found in 3 patients).

### **Genotype-phenotype Correlations**

To analyze the potential action of these variants in the *TP53*, *MDM2*, *MDM4* and *HAUSP* genes as phenotype modifiers, we genotyped 108 women with HER2-overexpressing BC, 97 of them without and 11 with germline *TP53* mutations. All these 97 women without germline *TP53* mutations were the same oh the previous study group. The 11 women with germline *TP53* mutations was compound by the 7 patients of the previous study group plus 4 additional women with the same inclusion criteria and a known mutation in *TP53* gene (p.G245S/WT; p.R273H/WT; p.G244D/WT; IVS6+1G>T/WT). Clinical data of recruited patients were obtained by interviews, specific questionnaires and/or review of medical records. The family history of cancer was assessed and classified according to criteria for LFS/LFL

(classic, Birch, Chompret and Eeles) and Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) syndrome (ASCO criteria). The two patients whose family histories fulfilled HBOC criteria were excluded from this analysis (see table 1).

### **Genotyping analysis**

Peripheral blood samples were collected in EDTA vials and DNA isolated using the GE extraction kit (GE Healthcare Lifesciences, BR), as described by the manufactures. Germline *TP53* mutation screening in HER2-overexpressing BC cases was previously performed by High Resolution Melting (HRM) analysis followed by Sanger sequencing of the entire coding sequence and flanking intronic regions [23]. For all polymorphisms, *TP53* rs1042522 (c.215G/C), *MDM2* rs2279744 (c.14+309T/G), *MDM4* rs1563828 (c.753+572C/T) and *HAUSP* rs1529916 (c.2719-234G/A), genotyping was performed by real-time PCR using TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination system, and was included positive and negative internal controls in all experiments. For genotyping of the *TP53*, *MDM4* and *HAUSP* polymorphisms, each reaction contained 11.5 $\mu$ L of total volume, including: 20ng of genomic DNA, 6.25 $\mu$ L of TaqMan Genotyping Master Mix 2X (Applied Biosystems Inc.) and 0.3125 $\mu$ L of probe 40X (Applied Biosystems USA), as previously described [29]. For the *MDM2* polymorphism genotyping, reaction included: 20ng of genomic DNA, 6.25 $\mu$ L of TaqMan Genotyping Master Mix 2X (Applied Biosystems Inc.), 0.075  $\mu$ M of each specific primer and 0.0075 $\mu$ M of probes SNP Genotyping assay 40X specific for each allele (Applied Biosystems USA), as previously described [29]. Experiments were performed using a StepOne PCR Real-Time System (Applied Biosystems Inc.), with an initial cycle of 10 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 15 seconds at 92°C and 1 minute at 60°C.

### **Statistical Analysis**

Comparisons of genotype and allelic distribution of each polymorphism between cases and controls were performed by  $\chi^2$  test. Comparison of mean age was assessed by the non-parametric Mann–Whitney test. Statistical analyses (non-

adjusted) were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 18.0 software.

## Results

### Clinical characteristics of patients

Age at diagnosis of cancer, immunohistochemical (IHC) HER2, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status of tumors and family cancer history are summarized in Table 1. In the *TP53+* group, 8 of the 11 (72.7%) breast tumors were classified as HER2 3+, whereas 54 of the 99 (54.6%) breast tumors in *TP53-* women were HER2 3+. About half (55%) of the *TP53+* patients were positive for both ER and PR while about 65% and 55% of *TP53-* patients were positive for ER and PR, respectively. Most *TP53+* patients (81.8%) showed clinical criteria for LFS/LFL. In *TP53-* women, 36.4% also showed a family history consistent with LFS/LFL and 2% showed HBOC criteria.

### Prevalence of polymorphisms

We first compared the distribution of the four polymorphisms between the group of 106 cases of HER2-overexpressing BC (7 with germline *TP53* mutation) and the control group (N = 184), regardless of their *TP53* mutation status. These populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. No significant difference was observed in the distribution of genotypic and allelic frequencies between the two groups for any of the four polymorphisms, *TP53* c.215G/C, *MDM2* c.14+309T/G, *MDM4* c.753+572C/T and *HAUSP* c.2719-234G/A (table 2). When we stratified women with HER2-overexpressing BC in *TP53-* (N = 99) and *TP53+* (N = 7) patients, the GG genotype of SNP *MDM2* c.14+309T/G was more prevalent in HER2-overexpressing BC *TP53+* group than in the control group ( $P = 0.003$ ) but did not differ between cases of HER2-overexpressing BC *TP53-* and controls (table 3). On the other hand, the T allele of SNP *MDM4* c.753+572C/T was more prevalent in patients with HER2-overexpressing BC *TP53-* than in the control group ( $P = 0.042$ ) but did not differ between cases of HER2-overexpressing BC *TP53+* and controls

(table 3). The genotypic and allelic frequencies of *TP53* p.Arg72Pro and *HAUSP* c.2719-234G/A did not differ from the control group (see table 3).

### **Effect of polymorphisms on age at BC diagnosis**

We next analyzed the age diagnosis of HER2-overexpressing BC in relation to the four polymorphisms, independently of *TP53* status (table 4) or in combination with this information (table 5). The presence of the *HAUSP* c.2719-234 A allele showed a “protective” effect: its presence was associated with a delayed mean age at cancer diagnosis. The diagnosis was four years later when we analyzed patients irrespective of their *TP53* mutation status ( $P = 0,037$ ) and three years later in *TP53*-patients when they were stratified ( $P = 0.033$ ). The age at diagnosis did not differ with the others polymorphisms in any analysis.

### **Discussion**

Currently, germline mutations in the *TP53* gene are the only known genetic defect underlying LFS/LFL [30]. BC is the most common tumor in families with these syndromes, and the molecular phenotype is predominantly HER2+ (63-83%) with features of an aggressive subtype [10 - 12]. Although the presence of germline *TP53* mutations seems to be associated with the development of HER2+ BC, the inverse relationship has not been proven. In other words, unselected women with HER2-overexpressing BC does not seem to have a higher prevalence of germline *TP53* mutations compared to unselected women with any type of BC [22, 23]. In this study we assumed that there are others mechanisms by which the cell can attenuate the p53 pathway in the carcinogenesis process of this specific subtype of BC. The p53 protein and its regulators Mdm2, Mdm4 and Hausp are central to tumorigenesis by directing cells to undergo cell cycle arrest and/or apoptosis in response to DNA damage and other stress signals or not in unstressed cells. The genes encoding these proteins contain nucleotide variations (p53 Arg72Pro, *MDM2* SNP309, *MDM4* c.753+572C/T and *HAUSP* c.2719-234G/A) that influences cellular response. In this study, we evaluated whether these polymorphisms have any impact on risk of HER2-overexpressing BC and age of disease onset.

In relation to *MDM2* SNP309 (c.14+309T/G, rs2279744), the T to G change in the promoter region increases the affinity to the transcription factor SP1. Consequently, high levels of Mdm2 protein attenuate the p53 response to stress and can lead to an increased risk of cancer and/or tumor formation with accelerated progression [31, 32]. This polymorphism has been associated with cancer risk in some studies, but the results are still controversial. In our study, the distribution of genotypic and allelic frequencies for *MDM2* SNP309 did not differ between groups when we analyzed patients irrespective of their *TP53* mutation status. When we stratified women with HER2-overexpressing BC in *TP53+* or *TP53-* and compared both with the control group, however, the frequency of the *MDM2* SNP309 GG genotype was higher only in patients with HER2-overexpressing BC *TP53+*. This result suggests that *MDM2* SNP309 and germline *TP53* mutations may act together in the development of HER2-overexpressing BC. Several studies showed no association between *MDM2* SNP309 G allele and the risk of BC, but they did not consider germline *TP53* mutations status [33, 34]. On the other hand, Lum *et al.* reported that the G allele of *MDM2* SNP309 increased familial BC risk [35]. Among germline *TP53* mutation carriers, Fang *et al.* demonstrated that *MDM2* SNP309 GG and GT genotypes were linked to a 1.58 times greater likelihood of developing cancer than TT homozygosity [36]. Regarding age at diagnosis, Rujis *et al.* showed that tumors occurred 16 years earlier in *TP53* mutation carriers with an *MDM2* SNP309 G allele as compared to the TT group [37], confirming the conclusions of Bond *et al.* [31] and Bougeard *et al.* [38] who showed an age difference of 7 and 10 years, respectively. Neither Bond *et al.* [31] nor Bougeard *et al.* [38] screened LFS and LFL-related patients without germline *TP53* mutation. For Rujis study, in the *TP53-* LFS and LFL-related group, the age of tumour onset for *MDM2* SNP309 G allele patients was not significantly different [37]. In our study, the age at diagnosis of HER2-overexpressing BC did not differ with *MDM2* SNP309 for the *TP53-* neither for *TP53+* patients. In the first case, the data were similar to those found by Rujis *et al.* [37] and in the second case, we may not have sufficient statistical power due to the small number of patients. As the *MDM2* SNP309 GG genotype of this SNP has been associated with breast and ovarian cancer risk among *BRCA1/2* carriers [39], then we excluded patients with a family history of HBOC (related to germline *BRCA1/2* mutations) of our analysis of age at diagnosis.

The effect SNP *MDM4* c.753+572C/T (rs1563828), located in intron 9, is not yet well understood in relation to p53 function. However, similarly to what happens with the Mdm2 protein, haploinsufficiency of Mdm4 leads to an increased activity of p53, suggesting that the change of one base pair in *MDM4* could alter protein levels enough to affect the p53 pathway [40]. In our analysis, the distribution of genotypic and allelic frequencies of the *MDM4* c.753+572C/T did not differ to the control group when we grouped all HER2-overexpressing BC patients. When we stratified the case group by *TP53* mutation status and compared with the control group, however, the *MDM4* c.753+572 T allele of this SNP was more prevalent only in *TP53*- patients with HER2-overexpressing BC. This result suggests that *MDM4* c.753+572C/T contributes to the development of HER2-overexpressing BC in patients who have no germline *TP53* mutation. Analyzing 124 early-onset BC patients (age  $\leq$  35 years at time of diagnosis), Song *et al.* concluded that CT or TT genotypes of the *MDM4* c.753+572C/T do not confer a significantly increased risk for BC compared with CC genotype [41]. However, as this is a population that developed the disease early, it is possible that a proportion of patients had germline *TP53* mutation (not verified in the study), which could explain the lack of association if our findings were confirmed and extrapolated to any BC. In carriers of germline *TP53* mutations, Fang *et al.* showed that there seems impact of this SNP on the emergence of tumor [36]. However, in this study, we do not know what proportion of patients who have BC. When analyzing the age at diagnosis, *MDM4* c.753+572 T homozygous were observed to develop BC earlier than CC and CT patients [41]. In the study by Kulkarni *et al.*, however, analysis of haplotypes containing the *MDM4* c.753+572C/T polymorphism was associated with early age at diagnosis of BC in patients with ER-negative tumors, but not with ER-positive [42]. In our study, the age at diagnosis of HER2-overexpressing BC did not differ with *MDM4* c.753+572C/T for the *TP53*- patients neither for *TP53*+ patients. For the group of *TP53*- patients (who was associated with this polymorphism) there was a higher percentage of patients with ER-positive tumors, but the difference is not significant.

The *HAUSP* c.2719-234G/A polymorphism (rs1529916), at the intron 25, is not well studied yet. The presence of the *HAUSP* c.2719-234 A allele already been associated with infertility and increased aggressiveness in prostate tumors [27, 52], but still do not know its effect in the context of patients with BC and/or with LFS/LFL. In our study, this SNP does not seem to be involved with risk of HER2-



overexpressing BC. However, for the first time, it was reported as phenotype modifier of these patients. It is important to note that although most studies associating the modifying phenotype effect of the polymorphisms in the p53 pathway with LFS/LFL families, the *HAUSP* c.2719-234G/A seems to be related to patients without germline *TP53* mutation.

The *TP53* c.215G/C polymorphism (p53 Arg72Pro, rs1042522) results in an amino acid substitution of a proline (Pro) to an arginine (Arg) and depending on the allele present, encodes p53 with different properties. Although p53 72Arg allele results in a protein capable of inducing apoptosis with faster kinetics, the p53 72Pro allele results in a protein which induces senescence and disrupts the cell cycle more effectively [43, 44]. Therefore, studies that examine the BC risk of this polymorphism are contradictory. Some associate the genotype ArgArg with predisposition to BC [45, 46]; others, the p53 72Pro allele with increased risk of the disease [47, 48]. Our findings, as well some meta-analysis studies [49 – 51], not detect any association. With respect to age at onset of cancer, the data relating the presence of the p53 72Arg allele with anticipation of age at diagnosis in both patients with germline *TP53* mutation [38], as in patients unselected for family history [47], but we found no association.

In conclusion, our results suggest that the p53 Arg72Pro is not involved in risk or early age of HER2-overexpressing BC. However, *MDM2* SNP309, *MDM4* c.753+572C/T and *HAUSP* c.2719-234G/A seem to be associated with the development of this specific subtype of BC dependently of status for *TP53*. While the *MDM2* SNP309 can have an additive effect with germline *TP53* mutations, the presence of *MDM4* c.753+572 T variant appears contribute as an additional mechanism by which the cell attenuates the p53 pathway in patients without germline *TP53* mutation, which could explain the low prevalence of these mutations found in HER2+ BC. In addition, *HAUSP* c.2719-234G/A seems to have a protective effect in HER2-overexpressing BC without germline *TP53* mutation patients. This is the first study to examine the role of *MDM2*, *MDM4*, *HAUSP* and *TP53* polymorphisms in HER2-overexpressing BC. Further studies in larger cohorts of patients are necessary in order to confirm these findings and better understand the interplay of the p53 signaling pathway and HER2+ BC.

## **Acknowledgments**

We are grateful to staff of Unidade de Patologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental - HCPA, for their help to collect medical records of patients. We also wish to thank Dr<sup>a</sup> Cristina Netto for her help with history family analyses of patients. This study was supported by fellowships from CNPQ (Brazil), and funded in part by FAPERGS-PPSUS (grant #1188-2551/13-8) and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA #11-0427), Brazil.

## References

- [1] Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48:5358-62.
- [2] Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-8.
- [3] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622-9.
- [4] Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ et al. Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 1998;17:1061–8.
- [5] Eeles, R.A. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 1995;25:101-124.
- [6] Frebourg, T., Abel, A., Bonaiti-Pellie, C., Brugières, L., Berthet, P., Bressac-de Paillerets, B., Chevrier, A., Chompret, A., Cohen-Haguenaer, O., Delattre, O., et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. *Bull Cancer* 2001;88:581-7.
- [7] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–

- [8] Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003;21:313-20.
- [9] Langerød A, Bukholm I, Bregård A, Lønning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA and Børresen-Dale AL. The TP53 Codon 72 Polymorphism May Affect the Function of TP53 Mutations in Breast Carcinomas but not in Colorectal Carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1684-8.
- [10] Wilson JR, Bateman AC, Hanson H, An Q, Evans G, Rahman N, Jones JL e Eccles DM. A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations. *J Med Genet* 2010;47:771-4.
- [11] Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM, Litton JK, Olopade OI, Hortobagyi GN, Strong LC, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer* 2012;118:908-13.
- [12] Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, Gruber SB, Ford JM, Euhus D, Lebensohn A, Telli M, Pochebit SM, Lypas G, Garber JE. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:1125-30.
- [13] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J e Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12
- [14] Ross JS e Fletcher JÁ. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998;3:237-52.
- [15] Collins LC, Marotti JD, Gelber S, Cole K, Ruddy K, Kereakoglow S, Brachtel EF, Schapira L, Come SE, Winer EP, et al. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:1061-6
- [16] Gutierrez C e Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:55-62.
- [17] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L e Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8:307-25.
- [18] Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, Antoniou A, Hartley R, Shenton A, Seal S, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-

onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer* 2006;42:1143-50.

- [19] Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295:1379-88.
- [20] Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009;27:1250-6.
- [21] Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MR, Giles GG, Hopper JL e Southey MC. Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Res* 2010;70:4795-800.
- [22] Rath MG, Masciari S, Gelman R, Miron A, Miron P, Foley K, Richardson AL, Krop IE, Verselis SJ, Dillon DA, Garber JE. Prevalence of germline TP53 mutations in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:193-8.
- [23] Fitarelli-Kiehl M. et al., unpublished data.
- [24] Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;15:387:296-9
- [25] Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* 2010;20:299-309
- [26] Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W. The p53-2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 2007;26:7262–6.
- [27] Sun T, Lee GS, Oh WK, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms in p53 Pathway and Aggressiveness of Prostate Cancer in a Caucasian Population. *Clin Cancer Res* 2010;16:5244-51.
- [28] Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 2008;261:21–25.

- [29] Paskulin DD, Cunha-Filho JB, Paskulin LD, Souza CA, Ashton-Prolla P. ESR1 rs9340799 Is Associated with Endometriosis-Related Infertility and In Vitro Fertilization Failure. *Disease Markers* 2013;35:907–13.
- [30] Malkin D. Li-Fraumeni Syndrome. *Genes & Cancer* 2011;2:475– 484,
- [31] Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004;119:591–602.
- [32] Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:96-107
- [33] Cox DG, Deer D, Guo Q, Tworoger SS, Hankinson SE, Hunter DJ et al. The p53 Arg72Pro and MDM2-309 polymorphisms and risk of breast cancer in the nurses' health studies. *Câncer Causes Control* 2007;18:621–5.
- [34] Schmidt MK, Reincke S, Broeks A, Braaf LM, Hogervorst FB, Tollenaar RA et al. Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the breast cancer association consortium. *Cancer Res* 2007;67:9584–90.
- [35] Lum SS, Chua HW, Li H, Li WF, Rao N, Wei J et al. MDM2 SNP309 G allele increases risk but the T allele is associated with earlier onset age of sporadic breast cancers in the Chinese population. *Carcinogenesis* 2008;29:754–61.
- [36] Fang S, Krahe R, Lozano G, Han Y, Chen W, Post SM, Zhang B, Wilson CD, Bachinski LL, Strong LC, Amos CI. Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. *PLoS One* 2010;26:10813.
- [37] Ruijs MW, Schmidt MK, Nevanlinna H, Tammiska J, Aittomäki K, Prunel R, Verhoef S, Van't Veer LJ. The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:110-4.
- [38] Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, Frebourg T. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2006;43:531–3.

- [39] Yarden RI, Friedman E, Metsuyanin S, Olender T, Ben-Asher E, Papa MZ. MDM2 SNP309 accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:497-504.
- [40] Terzian T, Wang Y, Van Pelt CS, Box NF, Travis EL, Lozano G. Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol Cell Biol* 2007;27:5479-85.
- [41] Song CG, Fu FM, Wu XY, Wang C, Shao ZM. Correlation of polymorphism rs1563828 in MDM4 gene with breast cancer risk and onset age. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2012 1;50:53-6.
- [42] Kulkarni DA, Vazquez A, Haffty BG, Bandera EV, Hu W, Sun YY, Toppmeyer DL, Levine AJ, Hirshfield KM. A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30:1910-5.
- [43] Dumont P, Leu JI, Della III PA, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33:357-65.
- [44] Pim D, Banks L. p53 Polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004;108:196–9.
- [45] Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 2003;10:711-4.
- [46] Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Distelman Menachem T, Eisenberg Barzilai S, Friedman E. The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer* 2005;92:1144-8.
- [47] Proestling K, Hebar A, Pruckner N, Marton E, Vinatzer U, Schreiber M. The Pro allele of the p53 codon 72 polymorphism is associated with decreased intratumoral expression of BAX and p21, and increased breast cancer risk. *PLoS One* 2012;7:47325.
- [48] Krivokuca AM, Malisic EJ, Dobricic JD, Brotto KV, Cavic MR, Jankovic RN, Tomasevic ZI, Brankovic-Magic MV. RAD51 135G>C and TP53 Arg72Pro polymorphisms and susceptibility to breast cancer in Serbian women. *Fam Cancer* 2014;13:173-80.
- [49] He XF, Su J, Zhang Y, Huang X, Liu Y, Ding DP, Wang W, Arparkorn K. Association between the p53 polymorphisms and breast cancer risk: meta-

analysis based on case-control study. Breast Cancer Res Treat 2011;130:517-29.

- [50] Ma Y, Yang J, Liu Z, Zhang P, Yang Z, Wang Y, Qin H. No significant association between the TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 21 studies involving 24,063 subjects. Breast Cancer Res Treat 2011;125:201-5.
- [51] Hou J, Jiang Y, Tang W, Jia S. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. Exp Ther Med 2013;5:1397-402.
- [52] Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 16;106:9761-6.

**Table 1. Characteristics of patients with HER2+ Breast Cancer (with and without germline TP53 mutation) and control group.**

	Women with HER+ BC (N=110)		P	Control group (N=184)
	TP53+	TP53-		
<b>N</b>	11	99		184
<b>Median age at diagnosis (range)</b>	42 (27-55)	46 (24-60)		52 (40-69)
<b>HER2 status (%) of IHC</b>				
HER2 2+ (ambiguous)	3 (27,3)	45 (45,4)		NA
HER2 3+ (positive)	8 (72,7)	54 (54,6)	0,251*	NA
<b>ER status (%)</b>				
ER +	6 (54,5)	65 (65,6)		NA
ER -	5 (45,5)	34 (34,4)	0,467*	NA
<b>PR status (%)</b>				
PR +	6 (54,5)	55 (55,5)		NA
PR -	5 (45,5)	44 (44,5)	0,949*	NA
<b>Family History of Cancer (%)</b>				
LFS/LFL	9 (81,8)	36 (36,4)		NA
HBOC	0 (0)	2 (2,0)		NA
Without family history	2 (19,2)	61 (61,6)	<b>0,014*</b>	NA

\*  $\chi^2$  test.

IHC, immunohistochemical; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor  
NA, not available.





**Table 2. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms in *TP53* (c.215G/C), *MDM2* (C.14+309T/G), *MDM4* (c.753+572C/T) and *HAUSP* (c.2719-234G/A) in the control group and in women with HER2+ BC.**

		<i>TP53</i> (c.215G/C)		<i>MDM2</i> (C.14+309T/G)		<i>MDM4</i> (c.753+572C/T)		<i>HAUSP</i> (c.2719-234G/A)				
		N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *			
<b>Genotypic frequencies</b>	Control (N = 184)	GG	83 (45)		TT	78 (42)		CC	73 (40)		GG	97 (53)
		GC	79 (43)		TG	82 (45)		CT	87 (47)		GA	74 (40)
		CC	22 (12)		GG	24 (13)		TT	24 (13)		AA	13 (7)
	HER2+ BC <sup>a</sup> (N = 106)	GG	51 (48)		TT	47 (44)		CC	36 (34)		GG	56 (53)
		GC	48 (45)		TG	42 (40)		CT	45 (42)		GA	41 (39)
		CC	7 (7)	0,365	GG	17 (16)	0,646	TT	25 (24)	0,075	AA	9 (8)
<b>Allelic frequencies</b>	Control (N = 368)	G	245 (67)		T	238 (65)		C	233 (63)		G	268 (73)
		C	123 (33)		G	130 (35)		T	135 (37)		A	100 (27)
	HER2+ BC <sup>a</sup> (N = 212)	G	150 (71)		T	136 (64)		C	117 (55)		G	153 (72)
		C	62 (29)	0,299	G	76 (36)	0,899	T	95 (45)	0,054	A	59 (28)

\* $\chi^2$  test

<sup>a</sup>Were considered HER2+ BC tumors with immunohistochemistry 2+ and 3+.

**Table 3. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms in *TP53* (c.215G/C), *MDM2* (C.14+309T/G), *MDM4* (c.753+572C/T) and *HAUSP* (c.2719-234G/A) in the control group and in women with HER2+ BC, stratified in status of germline *TP53* mutation.**

		<i>TP53</i> (c.215G/C)		<i>MDM2</i> (C.14+309T/G)		<i>MDM4</i> (c.753+572C/T)		<i>HAUSP</i> (c.2719-234G/A)				
		N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *	N° (%)	<i>P</i> *			
<b>Genotypic frequencies</b>	Control (N = 184)	GG	83 (45)		TT	78 (42)		CC	73 (40)		GG	97 (53)
		GC	79 (43)		TG	82 (45)		CT	87 (47)		GA	74 (40)
		CC	22 (12)		GG	24 (13)		TT	24 (13)		AA	13 (7)
	HER2+ BC <sup>a</sup> <i>TP53</i> - (N = 99)	GG	49 (48)		TT	44 (45)		CC	32 (32)		GG	53 (54)
		GC	45 (45)		TG	42 (42)		CT	44 (45)		GA	38 (38)
		CC	6 (6)	0,284	GG	13 (13)	0,954	TT	23 (23)	0,088	AA	8 (8)
	HER2+ BC <sup>a</sup> <i>TP53</i> + <sup>b</sup> (N = 7)	GG	3 (43)		TT	3 (43)		CC	4 (57)		GG	3 (43)
		GC	3 (43)		TG	0 (0)		CT	1 (14)		GA	3 (43)
		CC	1 (14)	0,981	GG	4 (57)	<b>0,003</b>	TT	2 (29)	0,171	AA	1 (14)
<b>Allelic frequencies</b>	Control (N = 368)	G	245 (67)		T	238 (65)		C	233 (63)		G	268 (73)
		C	123 (33)		G	130 (35)		T	135 (37)		A	100 (27)
	HER2+ BC <sup>a</sup> <i>TP53</i> - (N = 198)	G	141 (71)		T	130 (66)		C	108 (55)		G	144 (73)
		C	57 (29)	0,259	G	68 (34)	0,815	T	90 (45)	<b>0,042</b>	A	54 (27)
	HER2+ BC <sup>a</sup> <i>TP53</i> + <sup>b</sup> (N = 14)	G	9 (64)		T	6 (43)		C	9 (64)		G	9 (64)
		C	5 (36)	0,859	G	8 (57)	0,096	T	5 (36)	0,941	A	5 (36)

*TP53*-, women without germline *TP53* mutation; *TP53*+, women with germline *TP53* mutation

\*  $\chi^2$  test.

<sup>a</sup> Were considered HER2+ BC tumors with immunohistochemistry 2+ and 3+.

<sup>b</sup> Were considered any germline *TP53* mutation, including variants of unknown significance.

**Table 4. Distribution of mean age at cancer diagnosis according to polymorphisms in *TP53* (c.215G/C), *MDM2* (C.14+309T/G), *MDM4* (c.753+572C/T) and *HAUSP* (c.2719-234G/A) status.**

	N (%)	Mean age (SD)	P*
<b><i>TP53</i> (c.215G/C)</b>			
ArgArg	52 (48)	46 (8,6)	
ArgPro + ProPro <sup>a</sup>	56 (52)	46 (9,0)	0,658
<b><i>MDM2</i> (C.14+309T/G)</b>			
TT	48 (44)	46 (9,6)	
TG + GG <sup>b</sup>	60 (56)	46 (8,1)	0,973
<b><i>MDM4</i> (c.753+572C/T)</b>			
CC	36 (33)	47 (7,6)	
CT + TT <sup>c</sup>	72 (67)	46 (9,3)	0,799
<b><i>HAUSP</i> (c.2719-234G/A)</b>			
GG	57 (53)	44 (9,1)	
GA + AA <sup>d</sup>	51 (47)	48 (8,1)	<b>0,037</b>

\*Mann-Whitney test.

<sup>a</sup> ArgPro = 49 and ProPro = 7

<sup>b</sup> TG = 44 and GG = 16

<sup>c</sup> CT = 47 and TT= 25

<sup>d</sup> GA = 43 and AA= 8

**Table 5. Distribution of mean age at cancer diagnosis according to both *TP53* mutation and polymorphisms in *TP53* (c.215G/C), *MDM2* (C.14+309T/G), *MDM4* (c.753+572C/T) and *HAUSP* (c.2719- 234G/A) status.**

	<i>TP53- BC</i>		<i>P*</i>	<i>TP53+ BC</i>		<i>P*</i>
	N (%)	Mean age at diagnosis (SD)		N (%)	Mean age at diagnosis (SD)	
<b><i>TP53 (c.215G/C)</i></b>						
ArgArg	47 (48)	47 (8,3)		5 (45)	43 (11,8)	
ArgPro + ProPro <sup>a</sup>	50 (52)	47 (9,0)	0,960	6 (55)	40 (5,6)	0,465
<b><i>MDM2 (C.14+309T/G)</i></b>						
TT	44 (45)	46 (9,8)		4 (36)	43 (7,2)	
TG + GG <sup>b</sup>	53 (55)	47 (7,6)	0,911	7 (64)	40 (9,8)	0,705
<b><i>MDM4 (c.753+572C/T)</i></b>						
CC	31 (32)	47 (7,8)		5 (45)	47 (6,7)	
CT + TT <sup>c</sup>	66 (68)	46 (9,0)	0,847	6 (55)	37 (7,6)	0,068
<b><i>HAUSP (c.2719-234G/A)</i></b>						
GG	52 (54)	45 (8,8)		5 (45)	39 (11,6)	
GA + AA <sup>d</sup>	45(46)	48 (8,3)	0,033	6 (55)	44 (5,5)	0,361

\*Mann-Whitney test.

<sup>a</sup> In *TP53-*, ArgPro = 44 and ProPro = 6, while in *TP53+*, ArgPro = 5 and ProPro = 1

<sup>b</sup> In *TP53-*, TG = 41 and GG = 12, while in *TP53+*, TG = 3 and GG = 4

<sup>c</sup> In *TP53-*, CT = 44 and TT = 22, while in *TP53+*, CT = 3 and TT = 3

<sup>d</sup> In *TP53-*, GA = 38 and AA = 7, while in *TP53+*, GA = 5 and AA = 1

**Supplementary Table 1. Germline *TP53* changes description and *TP53*, *MDM2*, *MDM4* and *HAUSP* polymorphisms in women diagnosed with breast cancer HER2 2+ or 3+, before 60 years of age.**

Sample	Gene Region	Mutation	Protein	Domain	Effect	<i>TP53</i> (c.215G/C)	<i>MDM2</i> (c.14+309T/G)	<i>MDM4</i> (c.753+572C/T)	<i>HAUSP</i> (c.2719-234G/A)
1432	Exon 4	c.108G>A	p.P36P	Transactivation	Silent	ProPro	TT	TT	GG
1432	Intron 9	c.993+12T>C	p.?	Intron	Undefined	ProPro	TT	TT	GG
1930	Exon 6	c.639A>G	p.R213R	DNA ligation	Silent	ArgArg	GG	CC	GG
1956	Exon 6	c.639A>G	p.R213R	DNA ligation	Silent	ArgPro	GG	TT	GG
2049	Exon 6	c.639A>G	p.R213R	DNA ligation	Silent	ArgPro	GG	CC	AA
1898	Exon 10	c.1051A>G	p.K351E	Oligomerization	Loss of function	ArgArg	TT	CT	GA
1926	Intron 10	c.1100+30A>T	p.?	Intron	Undefined	ArgArg	TT	CC	GA
1598	Exon 7	c.731G>A	p.G244D	DNA ligation	Loss of function	ArgPro	GG	CC	GA
1063	Exon 7	c.731G>A	p.G244D	DNA ligation	Loss of function	ArgPro	TG	CC	GA
1165	Exon 7	c.733G>A	p.G245S	DNA ligation	Loss of function	ArgArg	TT	TT	GA
1944	Exon 8	c.818G>A	p.R273H	DNA ligation	Loss of function	ArgPro	TG	CT	GG
1105	Intron 6	c.672+1G>T	p.?	Intron	Undefined	ArgArg	TG	CT	GG

## 5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados encontrados no presente estudo, podemos concluir que:

- a) Os SNPs funcionais *MDM2* c.14+309T/G (*MDM2* SNP309, rs2279744), *MDM4* c.753+572C/T (rs1563828) e *HAUSP* c.2719-234G/A (rs1529916) parecem influenciar o desenvolvimento do CM superexpressando HER2 de forma dependente do status de mutação germinativa em *TP53* das pacientes.
- b) A frequência do genótipo GG do *MDM2* SNP309 nas pacientes com CM superexpressando HER2 foi maior no grupo *TP53+* do que no grupo controle, porém não diferiu entre os casos *TP53-* e os controles, sugerindo que este SNP atua em conjunto com as mutações germinativas em *TP53* para o desenvolvimento da doença.
- c) A frequência do alelo T do SNP *MDM4* c.753+572C/T nas pacientes com CM superexpressando HER2 foi maior no grupo *TP53-* do que no grupo controle, porém não diferiu entre os casos *TP53+* e os controles, sugerindo que este SNP atua de forma independente das mutações germinativas em *TP53*.
- d) A prevalência do SNP funcional *TP53* c.215G/C (Arg72Pro, rs1042522) não diferiu entre pacientes com CM superexpressando HER2 e os controles nem quando comparadas as pacientes estratificadas em *TP53-* e *TP53+* com os controles, de modo que não parece estar envolvido com o desenvolvimento do CM superexpressando HER2.
- e) A presença do alelo A do SNP *HAUSP* c.2719-234G/A foi associada a um atraso de 4 anos na idade diagnóstico de CM superexpressando HER2. Ao estratificar as pacientes pelo seu status de mutação germinativa em *TP53*, o diagnóstico ao CM superexpressando HER2 *TP53-* ocorreu 3 anos mais tarde. Esse resultado sugere que o SNP estudado em *HAUSP* tem um efeito protetor nessas pacientes.

- f) A idade ao diagnóstico de CM superexpressando HER2 não diferiu com nenhum dos polimorfismos *MDM2* SNP309, *MDM4* c.753+572C/T e p53 Arg72Pro para as pacientes *TP53-* nem para as *TP53+*, sugerindo estes SNPs não estão relacionados à modificação deste fenótipo nessas pacientes.



## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas da continuidade desse trabalho e sugestões de análises adicionais destacamos as seguintes:

- Recrutar pacientes adicionais com CM superexpressando HER2 para aumentar o poder estatístico das análises.
- Desenvolver estudos funcionais para entender o papel do SNP *MDM4* c.753+572C/T (rs1563828) na via de p53.
- Desenvolver estudos funcionais para entender o papel do SNP *HAUSP* c.2719-234G/A (rs1529916) na via de p53.

## 7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

- Achatz, M.I., Olivier, M., Le Calvez, F., Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B.M., Ashton-Prolla, P., Giugliani, R., Palmero, E.I., Vargas, F.R., *et al.* (2007). The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245, 96-102.
- Beckerman, R. e Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000935.
- Brooks, C.L. e Gu, W. (2004). Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell Cycle* 7, 895-899.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* 19, 2122-2137.
- Brosh, R., Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9, 701-713.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., *et al.* (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Euhus, D.M. and Robinson, L. (2013). Genetic predisposition syndromes and their management. *Surg Clin North Am* 93, 341-62.
- Figueiredo, B.C., Sandrini, R., Zambetti, G.P., Pereira, R.M., Cheng, C., Liu, W., Lacerda, L., Pianovski, M.A., Michalkiewicz, E., Jenkins, J., *et al.* (2006). Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 43, 91-96
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E.I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Le Calvez-Kelm, F., Brugières, L., Vargas, F.R., Brentani, R.R., Ashton-Prolla, P., *et al.* (2010). Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 31, 143-150
- Gobbi, H. (2012). Classification of tumours of the breast: an update based on the new 2012 World Health Organization Classification. *J Bras Patol Med Lab* 48, 463-474.

- Harris, S.L., Gil, G., Hu W., Robins, H., Bond, E., Hirshfield, K., Feng, Z., Yu, X., Teresky, A.K., Bond, G., Levine, A.J. (2005). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 111-119
- Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol* 220, 164-173.
- IARC TP53 Database. (2012). Database developments release R16. Disponível em: <<http://www-p53.iarc.fr>>. (Acessado em 16 de abril de 2014).
- INCa. (2014). Estimativa de incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. (Acessado em 16 de abril de 2014).
- Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M., Croce, C.M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84-85.
- Jackson, M.W. e Berberich, S.J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20, 1001-1007.
- Jin, S. e Levine, A.J. (2001). The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114, 4139-40
- Kleihues, P., Schäuble, B., zur Hausen, A., Estève, J., Ohgaki, H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 150, 1-13.
- Lacroix, M., Toillon, R.A., Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 13, 293-325.
- Lane, D., e Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000893.
- Langerød, A., Zhao, H., Borgan, Ø., Nesland, J.M., Bukholm, I.R., Ikdahl, T., Kåresen, R., Børresen-Dale, A.L., Jeffrey, S.S. (2007). TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* 9, R30.
- Levine, A.J. (1989). The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu symposia* 20, 221-230.
- Levine, R.A., Fleischli, M.A. (2000). Inactivation of p53 and retinoblastoma family pathways in canine osteosarcoma cell lines. *Vet Pathol* 37, 54-61.
- Levine, A.J. e Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 9, 749-758.
- Li, F.P., e Fraumeni, J.F. (1969a). Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 43, 1365-1373.

- Li, F.P., e Fraumeni, J.F. (1969b). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71, 747-752.
- Magnifico, A., Albano, L., Campaner, S., Campiglio, M., Pilotti, S., Ménard, S. e Tagliabue, E. (2007). Protein kinase Calpha determines HER2 fate in breast carcinoma cells with HER2 protein overexpression without gene amplification. *Cancer Res* 67, 5308-5317.
- Marcel, V., Palmero, E.I., Falagan-Lotsch, P., Martel-Planche, G., Ashton-Prolla, P., Olivier, M., Brentani, R.R., Hainaut, P., Achatz, M.I. (2009). TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* 46, 766-772.
- Marine, J.C., Dyer, M.A., Jochemsen, A.G. (2007). MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci* 120, 371-378.
- Maxwell, K.N. and Nathanson, K.L. (2013). Common breast cancer risk variants in the post-COGS era: a comprehensive review. *Breast Cancer Research* 15, 212.
- Minafra, L., Norata, R., Bravatà, V., Viola, M., Lupo, C., Gelfi, C., Messa, C. (2012). Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report. *BMC Res Notes* 5, 343.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 26, 1237-1245.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469-6487.
- Nichols K.E., Malkin D., Garber J.E., Fraumeni J.F. Jr, Li F.P. (2001). Germline p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 83-87.
- Olivier, M., Goldgar, D.E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., Eeles, R.A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63, 6643-6650.
- Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V., Pétré, A., Mounawar, M., Plymoth, A., de Fromental, C.C., Hainaut, P. (2009). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 16, 1-12.
- Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001008.

- Post, S.M., Quintás-Cardama, A., Pant, V., Iwakuma, T., Hamir, A., Jackson, J.G., Maccio, D.R., Bond, G.L., Johnson, D.G., Levine, A.J., Lozano, G. (2010). A high-frequency regulatory polymorphism in the p53 pathway accelerates tumor development. *Cancer Cell* 18, 220-230.
- Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb A.J., Lane, D.P., Saville, M.K., Jochemsen, A.G.(2001). Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep* 2,1029-1034.
- Schuler, M. e Green, D.R. (2005) Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet* 21, 182-187.
- Szymanska, K. e Hainaut, P. (2003). TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol* 50, 231-238.
- Voduc, K.D., Cheang, M.C., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 28, 1684-1691.
- Vousden, K.H., e Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
- Wasielewski, M., Nagel, J.H., Brekelmans, C., Klijn, J.G., van den Ouweland, A., Meijers-Heijboer, H., Schutte, M. (2007). MDM2 SNP309 accelerates familial breast carcinogenesis independently of estrogen signaling. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 104, 153-157
- Wilkening, S., Bermejo, J.L., Hemminki, K. (2007). MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* 28, 2262-2267.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., *et al.* (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.
- Wu, C.C., Shete, S., Amos, C.I., Strong, L.C. (2006). Joint effects of germ-line p53 mutation and sex on cancer risk in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 15, 8287-8292.
- Zhao, E., Cui, D., Yuan, L., Lu, W. (2012). MDM2 SNP309 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 39, 3471-3477.

# ANEXOS DO TRABALHO

## Anexo 1. TCLE do presente estudo.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **Título da pesquisa:**

Estudo de mutações germinativas no gene *TP53* e expressão de HER2 em mulheres com câncer de mama diagnosticado antes dos 46 anos de idade.

#### **Pesquisadores:**

Mariana Fitarelli Kiehl, Juliana Giacomazzi, Patricia Ashton Prolla

#### **Telefone para contato com os pesquisadores:**

Profª Patricia Ashton Prolla e Mariana Kiehl: Lab. Medicina Genômica (HCPA) - (51) 3359-7661

**Telefone para contato com o Comitê de Ética do HCPA:** (51) 3359-8304

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa que tem como principal objetivo estudar o processo de desenvolvimento do câncer de mama. O nosso grupo de pesquisa está estudando porque algumas mulheres tem um tipo particular de câncer de mama que apresenta uma proteína chamada HER2 em maiores quantidades do que outros tipos de câncer de mama. HER2 é uma proteína presente em grande quantidade da superfície das células de alguns tumores da mama, e isso acontece em cerca de 20% de todos casos de câncer de mama. Em um estudo científico publicado recentemente, foi encontrado que a algumas mulheres com presença de HER2 em níveis aumentados no câncer de mama, tem também uma alteração genética herdada que pode aumentar o risco para câncer. Essa alteração genética é chamada mutação em *TP53*. Em geral, essas mutações no gene *TP53* ocorrem em pessoas com a chamada Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), uma situação em que a pessoa tem uma chance aumentada de desenvolver vários tipos de câncer em idade jovem, inclusive câncer de mama.

Sendo assim, a determinação da frequência de mutações do gene *TP53* em mulheres com câncer de mama HER2 positivo em nossa população, bem como o entendimento dos mecanismos que causam o aumento da quantidade de HER2 no tumor da mama, podem ser informações importantes para o conhecimento dos fatores de risco e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para pacientes com este tipo tumoral.

Você está sendo convidada a participar porque este estudo será feito com a participação de mulheres que tiveram câncer de mama, foram tratadas no HCPA e nas quais o tumor da mama apresentava HER2. Nesse estudo, os pesquisadores vão avaliar se há mutações genéticas (alterações no gene *TP53* e outros genes relacionados) em mulheres com tumores com grande quantidade de HER2, e se esses fatores são raros ou não. Além disso, serão estudadas características dos tumores, a fim de buscar o entendimento do processo de aumento de HER2 na superfície celular. Inicialmente serão estudadas alterações em algumas regiões do material genético, entretanto, ao longo do estudo, novas informações poderão surgir e a análise de novas alterações associadas ao risco para câncer de mama poderá ser realizada.

#### **Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:**

Para estudar as características genéticas será coletada uma pequena amostra de seu sangue (10 ml) em dois frascos. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinado para este fim, o que diminui as chances de complicações.

#### **Benefícios esperados:**

Nós ainda não sabemos se estas alterações no material genético realmente tem alguma importância sobre o risco de câncer de mama HER2 positivo em mulheres do Rio Grande do Sul, e este estudo está sendo feito justamente para tentar verificar isso. Este trabalho poderá ou não auxiliar o entendimento das causas da doença e influenciar a decisão sobre o sucesso do tratamento para estas condições. Esse benefício provavelmente não será direto para sua pessoa, pois é um estudo inicial cujos resultados deverão ser confirmados posteriormente em uma análise em muitas mulheres adicionais. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para você e sua família, todo esforço será realizado para informá-los. Você tem o direito de recusar-se a participar deste projeto e sua recusa não afetará de nenhuma maneira o seu cuidado (ou de seus familiares) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

13/10/2011

110427 JAV

**DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO**

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informada, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

**SIM** **NÃO**

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

**SIM** **NÃO**

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira, bem como não necessitarei pagar qualquer encargo relativo aos procedimentos realizados para o projeto.

**SIM** **NÃO**

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

**SIM** **NÃO**

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização futura.

**SIM** **NÃO**

6. Autorizo a utilização de minha amostra de DNA caso surjam novos estudos sobre alterações genéticas relacionados ao câncer de mama no futuro.

**SIM** **NÃO**

7. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

**SIM** **NÃO**

8. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

**SIM** **NÃO**

9. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. \_\_\_\_\_ a recebê-lo.

10. Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do entrevistador**

\_\_\_\_\_  
**Nome por extenso**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

\_\_\_\_\_  
**Nome e assinatura do participante**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

\_\_\_\_\_  
**Data de nascimento**

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

**13 / 10 / 2011**  
**110427 TAV**

## Anexo 2. Normas de avaliação do periódico *Cancer genetics*

16/4/2014 Guide for authors | Cancer Genetics | 2210-7762 | Elsevier

**ELSEVIER** Type here to search on Elsevier.com Advanced search Follow us:  Help & Contact

[Journals & books](#) [Online tools](#) [Authors, editors & reviewers](#) [About Elsevier](#) [Community](#) [Store](#)



[View free sample](#)

---

[Guide for authors](#)

[Submit your paper](#)

---

[Order journal](#)

[View articles](#)

---

[Abstracting and indexing](#)

[Editorial board](#)

[Browse Journals > Cancer Genetics > Guide for authors](#)

### Guide for Authors

**Author information pack**

<p><b>BEFORE YOU BEGIN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethics in publishing</li> <li>• Plagiarism</li> <li>• Competing interests</li> <li>• Conflict of interest</li> <li>• Submission declaration</li> <li>• Changes to authorship</li> <li>• Copyright</li> <li>• Role of the funding source</li> <li>• Funding body agreements and policies</li> <li>• Open access</li> <li>• Language (usage and editing services)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Submission</li> <li>• Referees</li> </ul> <p><b>PREPARATION</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use of word processing software</li> <li>• Article structure</li> <li>• Essential title page information</li> <li>• Abstract</li> <li>• Keywords</li> <li>• Acknowledgements</li> <li>• Math formulae</li> <li>• Footnotes</li> <li>• Artwork</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Illustration services</li> <li>• Tables</li> <li>• References</li> <li>• Video data</li> <li>• Supplementary data</li> <li>• Submission checklist</li> </ul> <p><b>AFTER ACCEPTANCE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use of the Digital Object Identifier</li> <li>• Online proof correction</li> </ul> <p><b>AUTHOR INQUIRIES</b></p>
--	--	---

**The aim of *Cancer Genetics* is to publish high quality scientific papers on the cellular, genetic and molecular aspects of cancer, including cancer predisposition and clinical diagnostic applications. Specific areas of interest include descriptions of new chromosomal, molecular or epigenetic alterations in benign and malignant diseases; novel laboratory approaches for identification and characterization of chromosomal rearrangements or genomic alterations in cancer cells; correlation of genetic changes with pathology and clinical presentation; and the molecular genetics of cancer predisposition. To reach a basic science and clinical multidisciplinary audience, we welcome original full-length articles, reviews, meeting summaries, brief reports, and letters to the editor.**

**Review Articles**  
Review articles fitting within the Aims and Scope of the Journal will be considered for publication. Authors wishing to submit an unsolicited review should send a brief, 250-word synopsis of the planned review to [cancergenetics@elsevier.com](mailto:cancergenetics@elsevier.com) for pre-submission approval by the editor.

**Original Research**  
Original research manuscripts must include the following sections: Abstract (~200 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and References. Acknowledgments (optional) and figure legends should also be included in the manuscript file but should be on a separate text page. Figure legends, figures, and tables should each be uploaded in separate files. Authors must include a cover letter clearly stating the novel findings described in the paper. All genotype association studies must utilize current molecular methods and include at least 500 cases and 500 controls.

**Meeting summaries**  
Meeting Summaries require pre-submission approval by the Editor. Please email proposals to [cancergenetics@elsevier.com](mailto:cancergenetics@elsevier.com).

**Commentaries**  
Commentaries on emerging technologies require pre-submission approval. Please email proposals to [cancergenetics@elsevier.com](mailto:cancergenetics@elsevier.com).

**Brief Communications**  
Brief Communications must be less than 2,000 words, with a maximum of 2 tables and/or figures. Brief communications must include the following sections: Abstract (~200 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and References. Authors must include a cover letter clearly stating the novel findings described in the communication.

**Letters to the Editor**  
Letters to the Editor must be <750 words, with no figures or tables.

- Jaclyn A. Siegel, PhD, Editor-in-Chief
- Editorial Office: [cancergenetics@elsevier.com](mailto:cancergenetics@elsevier.com)

**Before You Begin**

**Advertisement**

Understanding the Publishing Process in Scientific Journals



How to write a scientific article

Innovation

Open access solutions

Impact Factor and other quality measures

Authors' rights and responsibilities

<http://www.elsevier.com/journals/cancer-genetics/2210-7762/guide-for-authors#18000> 1/7



**Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

**Plagiarism**

Plagiarism and duplicate submission are serious acts of misconduct. Plagiarism is defined as unreferenced use of published or unauthorized use of unpublished ideas, and may occur at any stage of planning, researching, writing, or publication. Plagiarism takes many forms, from 'passing off' another's paper as the author's own paper, to copying or paraphrasing substantial parts of another's paper (without attribution), to claiming results from research conducted by others. Plagiarism in all its forms constitutes unethical publishing behavior and is unacceptable. Duplicate submission/publication occurs when two or more papers, without full cross-reference, share the same hypothesis, data, discussion points, or conclusions.

**Competing interests**

Effective February 1, 2012, each author must complete and sign the Research Funding Support, Conflict of Interest Disclosure, and Authorship Agreement form at the time of manuscript submission ([http://www.elsevier.com/\\_data/promis\\_misc/cq\\_col.pdf](http://www.elsevier.com/_data/promis_misc/cq_col.pdf)). All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

**Conflict of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

**Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

**Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

**Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

**For Subscription articles**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

**For Open Access articles**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

**Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

**Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

**Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is \$3,000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

**Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

**Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/cg>.

**Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

**Preparation****Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Article structure****Subdivision - unnumbered sections**

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

**Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

**Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant modifications should be described.

**Results**

Results should be clear and concise.

**Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

**Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

**Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'or'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

The Journal will adhere to the cytogenetics nomenclature of the latest version of the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2005). One exception to the ISCN is to use a hyphen (-) instead of a tilde (~) when a break occurs between separate bands. This exception, which is only applicable to the title and abstract, is necessary because some abstracting and indexing databases, including PubMed, do not support the tilde (~). Human genes should be referenced according to HUGO and written in uppercase letters and italicized (e.g., TP53). RNA and proteins should be written in uppercase letters but not italicized. Commercial fluorescence *in situ* hybridization probe names should also be written in uppercase letters, not italicized. When referring to the probe itself, please use the name provided by manufacturer (e.g., TEL/AML1, AML1/ETO); however, the FISH nomenclature should be written using the gene symbols according to HUGO. All abbreviations should be defined when first used. Mutation descriptions must follow the Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature, available at <http://www.hgvs.org/mutnomen/>.

**Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., XY. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of *e* are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

**Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

**Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

**Artwork**

**Electronic artwork**  
**General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### References

##### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

##### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:



[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

#### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research.

Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
  - Full postal address
  - Phone numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



#### After Acceptance

##### Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in Press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format) here an article in the journal *Physics Letters B*:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

##### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed.

Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.



### Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

#### Readers

[View Articles](#)

#### Authors

[Guide for Authors](#)  
[Submit your paper](#)  
[Author information pack](#)

#### Librarians

[Ordering Information](#)  
[Abstracting/ Indexing](#)

#### Editors

#### Reviewers

#### Advertisers/ Sponsors

#### Booksellers



[Choose language](#)

[Industries](#)

[Advertising](#)

[Careers](#)

[Feedback](#)

[Site Map](#)

[Elsevier Websites](#)

[A Reed Elsevier Company](#)

Copyright © 2014 Elsevier B.V.

[Privacy Policy](#)

[Terms & Conditions](#)

Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies page](#).