

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

**HUGO MARTINS DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *TP53* NA POPULAÇÃO COM CÂNCER  
INFANTO-JUVENIL NO NORDESTE DE SANTA CATARINA**

**Joinville  
2021**

**HUGO MARTINS DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *TP53* NA POPULAÇÃO COM CÂNCER  
INFANTO-JUVENIL NO NORDESTE DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente na Universidade da Região de Joinville.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

**Joinville  
2021**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

- O48a Oliveira, Hugo Martins de  
Avaliação da expressão do gene tp53 na população com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina / Hugo Martins de Oliveira; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: UNIVILLE, 2021.
- 69 f.
- Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)
1. Câncer em crianças – Joinville (SC). 2. Genes p53. 3. Imunohistoquímica. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.
- CDD 618.92994

Elaborada por Ana Paula Blaskovski Kuchnir – CRB-14/1401

Termo de Aprovação

“Avaliação da Expressão do Gene TP53 na População com Câncer Infanto-Juvenil no Nordeste de Santa Catarina”

por

Hugo Martins de Oliveira

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

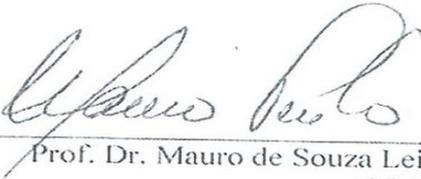
  
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)

  
Profa. Dra. Marta Jussara Cremer  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)

  
Profa. Dra. Ana Paula Kuczynski Pedro Bom  
(PUC/PR)

  
Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho  
(UNIVILLE)

Joinville, 28 de julho de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

À UNIVILLE por ser uma universidade de excelência e por disponibilizar o acesso ao mestrado e a incentivo a pesquisa através da BOLSA PIC PG.

Ao orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pela coordenação, orientação e pelo exemplo pessoal, profissional de docente e pesquisador.

A minha esposa amada, Sarah Cascaes Alves de Oliveira pelo apoio, motivação, entusiasmo e incentivo ao mestrado.

Ao Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP) que contribui com as amostras, estrutura e com parte do financiamento dos reagentes necessários a este estudo.

À equipe do CEDAP, em especial ao Karina Munhoz e Jaqueline Stall, que auxiliaram com a técnica de imuno-histoquímica, tabelas e construção de raciocínio.

## RESUMO

**Introdução:** Câncer constitui um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células, que se multiplicam rapidamente e invadem tecidos e órgãos. No Brasil, são estimados cerca de 8.000 novos casos anuais de câncer infanto-juvenil, cujas causas ainda são pouco conhecidas, embora alguns apresentem fatores determinados geneticamente. Aproximadamente 70% dos cânceres humanos possuem alteração no gene *TP53*, codificante da proteína responsável por inibir o crescimento desordenado de células expostas a injúrias. No entanto, a frequência de alterações na expressão do *TP53* em cânceres infanto-juvenis no Brasil permanece pouco conhecida. **Objetivo:** Avaliar a expressão do *TP53* mutado em pacientes com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, Brasil. **Métodos:** De forma retrospectiva, foram incluídos 282 pacientes com diagnóstico de câncer entre 2005 e 2015, em Joinville. A expressão do *TP53* foi avaliada via imuno-histoquímica utilizando-se um escore baseado na intensidade e percentual de células coradas. **Resultados:** A expressão da proteína p53 foi positiva em 25,2% dos casos, sem diferença entre os sexos. Considerando os cinco principais grupos de tumores na casuística, a expressão foi positiva em 31,8%, 27,3%, 20%, 17,2% e 5,9% dos linfomas, nefroblastomas, neuroblastomas, tumores do Sistema Nervoso Central e leucemias, respectivamente. **Conclusão:** A expressão do *TP53* foi avaliada quanto a prevalência em diferentes cânceres infanto-juvenis no nordeste catarinense. A positividade foi maior entre os linfomas e menor nas leucemias, porém sem diferença significativa entre os cinco tumores mais frequentes. São demandados outros estudos que permitam correlação com a agressividade e evolução da doença.

**Palavras-chave:** Câncer infanto-juvenil, Gene *TP53*, Imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is a set of diseases characterized by the disordered growth of cells that multiply rapidly and invade tissues and organs. In Brazil, there are an estimated 8,000 new cases of childhood cancer each year, the causes of which are still little known, although some have genetically determined factors. Approximately 70% of human cancers have alterations in the *TP53* gene, which encodes the protein responsible for inhibiting the disordered growth of cells exposed to injuries. However, the frequency of changes in *TP53* expression in childhood cancers in Brazil is poorly known. **Objective:** To evaluate the expression of mutated *TP53* in patients with childhood cancer in northeastern Santa Catarina, Brazil. **Methods:** Retrospectively, there were included 282 patients diagnosed with cancer between 2005 and 2015 in Joinville. *TP53* expression was evaluated by immunohistochemistry using a score based on the intensity and percentage of stained cells. **Results:** The expression of protein p53 was positive in 25.2% of cases, with no difference between sexes. Considering the five main groups of tumors in the sample, the expression was positive in 31.8%, 27.3%, 20%, 17.2% and 5.9% of lymphomas, neuroblastomas, tumors of the Central Nervous System and leukemias, respectively. **Conclusion:** The prevalence of *TP53* expression was evaluated in different childhood cancers in the northeastern of Santa Catarina. Positivity was higher among lymphomas and lower in leukemias, but with no significant difference among the five most frequent tumors. Further studies that allow correlation with aggressiveness and disease evolution are required.

**Keywords:** Childhood cancer, Gene *TP53*, Immunohistochemistry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF - *Alternative Reading Frame* / Quadro de Leitura Alternativa.

CDKs - Ciclinas.

CEDAP - Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos.

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa.

CNS - Conselho Nacional de Saúde.

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico.

GADD-45 - *Growth Arrest DNA Damage Inducible* / Dano Induzido ao DNA com Parada de Crescimento.

INCA - Instituto Nacional do Câncer.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

ISSN - *International Standard Serial Number*.

LOH - *Loss Of Heterozygosity* / Perda da Heterozigodise.

MDM2 - *Murine Double Minute-2* / Minuto-2 Duplo Murino.

MS - Ministério da Saúde.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

P14 - Proteína P14.

P21 - Proteína P21.

P53 - Proteína P53.

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* / Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

SBP - Sociedade Brasileira de Pediatria.

SC - Santa Catarina.

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* / Polimorfismo de Nucleotídeos Único.

SV-40 - Vírus símio 40.

SUS - Sistema Único de Saúde.

TP53 - Gene P53.

UNIVILLE - Universidade da Região de Joinville.

UV - Ultravioleta.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
3.1 CÂNCER.....	14
3.2 CARCINOGENESE.....	15
3.3 O GENE <i>TP53</i> .....	17
3.3.1 Função.....	17
3.3.2 Estrutura do gene <i>TP53</i> e da proteína p53 .....	19
3.3.3 Controle da expressão .....	20
3.3.4 Perda da função.....	21
3.3.5 Heterozigosidade do gene <i>TP53</i> .....	23
3.3.6 Polimorfismos do gene <i>TP53</i> .....	23
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA E O GENE <i>TP53</i> .....	24
3.5 <i>TP53</i> E AS MEDIDAS TERAPÊUTICAS .....	25
<b>4. INTERDISCIPLINARIDADE</b> .....	<b>27</b>
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
5.1 TIPO DO ESTUDO .....	28
5.2 LOCAL DO ESTUDO .....	28
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	28
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	29
5.5 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS .....	29
5.5.1 Leitura e interpretação .....	30
5.6 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS .....	30
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
5.8 ASPECTOS ÉTICOS .....	31
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância (INCA, 2019). Podem ter origem em qualquer célula do corpo e são classificados segundo a sua origem celular. Quando se originam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como ossos, músculos ou cartilagens, são chamados sarcomas. Sua agressividade é considerada a partir da velocidade de crescimento das células neoplásicas (INCA, 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 eram estimados, em todo o mundo, 19,3 milhões de casos novos de câncer. Estima-se que, em 2030, os números mundiais serão de 23,6 milhões de novos casos da doença. Enquanto isso, no território brasileiro, observa-se anualmente um número aproximado de um milhão de casos, considerando o público infanto-juvenil e adulto (FERMO *et al.*, 2014; INCA, 2019; WHO, 2020).

Em todo o mundo, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer estima-se que todos os anos, 215.000 casos são diagnosticados em crianças menores de 15 anos, e cerca de 85.000 em adolescentes entre 15 e 19 anos (INCA, 2019). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que para cada ano do triênio 2020/2022 sejam diagnosticados no Brasil 8.460 novo casos de câncer infanto-juvenis. Esses valores correspondem a um risco estimado de 137,87 casos novos por milhão no sexo masculino e de 139,04 por milhão para o sexo feminino (INCA, 2019).

Os principais tipos de câncer infantil são as leucemias, em primeiro lugar, seguindo-se os tumores do sistema nervoso central (SNC), linfomas, neuroblastomas, nefroblastomas e tumores ósseos e musculares (SBP, 2019). Enquanto os tumores nos adultos estão, em geral, relacionados à exposição a vários fatores de risco conhecidos, as causas dos tumores pediátricos ainda são pouco conhecidas, embora em alguns tipos específicos já se tenha embasamento científico

de que sejam determinados geneticamente (DANG; PHILLIPS, 2017; FORREST *et al.*, 2018; NEY, 2020; PEREIRA, 2019; KATTNER *et al.*, 2019, KENTSIS 2020).

Do ponto de vista clínico, os tumores infantis apresentam menores períodos de latência. Em geral crescem rapidamente e são mais invasivos. Por outro lado, respondem melhor ao tratamento e são considerados de bom prognóstico. (MONDAL; SARKAR S, 2015; MARQUES *et al.*, 2016; MS, 2011; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; PEREIRA, 2019).

O progresso no tratamento do câncer na infância cresceu significativamente nas últimas quatro décadas pois, em meados da década de 1970, a taxa de sobrevida em 5 anos era de apenas 58%. Atualmente, estima-se que em torno de 70% das crianças acometidas de câncer podem ser curadas se o diagnóstico for precoce e a doença tratada em centros especializados, aumentando as possibilidades de cura e sobrevida (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; INCA, 2019). Graças aos esforços direcionadas aos avanços no tratamento e nas medidas de suporte ao tratamento do câncer infantil nas últimas décadas, mais de 84% das crianças com câncer sobrevivem 5 ou mais anos, somando-se a uma melhor qualidade de vida durante todo o período compreendido pelo tratamento (FELIPPE, 2019; FERMO *et al.*, 2014; DEVITA *et al.*, 2019; INCA, 2019; MARQUES *et al.*, 2016; MS, 2017; PIZZO; POPLACK, 2015; WHO, 2014).

A terapêutica do câncer infanto-juvenil conta em sua base de uma estrutura complexa, composta por quimioterapia, radioterapia e abordagem cirúrgica, além da assistência de uma equipe multiprofissional especializada junto a um hospital terciário (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; FERMO *et al.*, 2014; INCA, 2019; MARQUES *et al.*, 2016; MONDAL; SARKAR, 2015; MS, 2017; PIZZO; POPLACK, 2015; WHO, 2014). O impacto econômico é expressivo, considerando os custos hospitalares com prestadores de serviços diretos e indiretos, custos com a equipe multiprofissional, investimento educacional, despesas com medicamentos, consultas, administração dos protocolos infusionais, serviços e procedimentos prestados, laboratório, exames de imagens, transfusão sanguínea e internação hospitalar (KNUST, 2017).

Mesmo com a melhora progressiva da taxa de cura, a mortalidade ainda destaca-se com representatividade significativa no país, correspondendo à oitava

posição entre as causas de óbito em crianças de 0 a 4 anos, assim como foi a principal causa de morte na faixa etária de 5 a 19 anos em 2014 (MUTTI *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico precoce do câncer infanto-juvenil, além de reconhecer os sinais e sintomas do câncer, como palidez, manchas roxas, dor na perna, caroços e inchaços indolores, perda de peso inexplicável, aumento da barriga, dor de cabeça e sonolência, são necessárias ações que impliquem a atuação conjunta das organizações de saúde e dos órgãos de formação dos profissionais, a fim de promover um cuidado integral, garantindo-se acessibilidade, integralidade e resolutividade (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; FERMO *et al.*, 2014; INCA, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2016; MONDAL; SARKAR, 2015; MS, 2017; NIEDERHUBER *et al.*, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; STEFAN; GALINDO, 2014; WHO, 2014).

Com o propósito da definição diagnóstica específica do câncer, é necessária a coleta de material do tumor. Se for um câncer hematológico, é necessária a coleta de amostra da medula óssea, enquanto nos casos de tumores sólidos é realizada a biópsia para se definir o tipo de câncer. Para o complemento do diagnóstico utilizam-se as técnicas de imuno-histoquímica e biologia molecular, que classificam o tumor e permitem conhecer melhor o seu comportamento (DEVITA *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2016; MS, 2011; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; STEFAN; GALINDO, 2014).

Com a intenção de melhorar ainda mais as taxas de cura com base na acurácia diagnóstica, diferentes estudos focaram um dos genes primordiais identificados em associação ao desenvolvimento do câncer - *TP53*, que desempenha papel na supressão tumoral. Sua mutação aumenta a propensão à geração de células cancerígenas em relação à população geral (HAINAUT *et al.*, 2010) e observa-se que, aproximadamente, 70% dos cânceres humanos possuem uma alteração na função do *TP53* (BERTHEAU *et al.*, 2013; HAINAUT *et al.*, 2010).

O gene *TP53* é responsável por inibir o crescimento de células expostas a injúrias químicas ou físicas, incluindo as células neoplásicas, sendo denominada guardião do genoma. A perda de sua função pode resultar em alterações no controle do ciclo celular, conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada,

eventualmente propiciando o desenvolvimento de tumores (HEMANN; LOWE, 2007; LEVINE, 1997; PAMPALONA, 2012).

O papel do *TP53* com relação à sobrevida do paciente com câncer ainda não está totalmente claro e sua mutação pode estar associada a subtipos histológicos do tumor, não necessariamente a todos do mesmo grupo histológico. O desconhecimento da biologia molecular do tumor pode estar relacionado ao pior prognóstico, devido à proliferação descontrolada e acelerada ou à quimiorresistência e radiorresistência da célula tumoral, ou até mesmo à origem de um novo tipo de tumor (HEMANN; LOWE, 2007).

Assim sendo, um desafio atual para a oncologia pediátrica é aprimorar o conhecimento sobre a biologia molecular dos tumores, bem como avaliar o significado das variações de expressão do *TP53*. O presente estudo teve o intuito de investigar a população infanto-juvenil local quanto à expressão do *TP53*, avaliando sua distribuição frente às características demográficas (sexo e idade) e tipo histológico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão do gene *TP53* em pacientes com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, diagnosticados no período de 2005 a 2015.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a distribuição da expressão imuno-histoquímica do gene *TP53* quanto às características demográficas sexo e idade na população com câncer infanto-juvenil.

- Investigar a distribuição da expressão imuno-histoquímica do gene *TP53* quanto ao tipo histológico do tumor na população com câncer infanto-juvenil.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Podem se originar de qualquer célula do corpo, sendo classificados segundo a sua origem celular. Quando têm origem em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas, e sua agressividade é considerada a partir da velocidade de crescimento das células neoplásicas (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; DEVITA, *et al.*, 2019; FELIPPE, 2019; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; STEFAN; GALINDO, 2014).

O câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo, com mais de 7 milhões de pessoas que morrem em decorrência da doença. Como a esperança de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará mais de 15 milhões em 2020. Além disso, outra explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. A redefinição dos padrões de vida, a partir da uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo, desencadeado pelo processo global de industrialização, tem reflexos importantes no perfil epidemiológico das populações contemporâneas (INCA, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; MS, 2011; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015).

Buscando saber o comportamento do câncer e sua complexidade, as pesquisas buscam amplamente conhecer e entender seus múltiplos processos identificando componentes que podem colaborar em todos os aspectos, desde a prevenção até ao tratamento. Desta forma, sabendo de sua relevância na humanidade, os investimentos em pesquisa nas áreas médica, biológica, epidemiológica e social crescem no intuito de integrar o conhecimento de forma harmônica e melhorar os índices atuais. (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; INCA,

2019; MONDAL; SARKAR S, 2015; MS, 2011; PEREIRA, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015).

Desta forma, existe a necessidade de estudos contínuos e permanentes em ações voltadas para o câncer que envolva estratégias de prevenção, detecção precoce, tratamento, cuidados paliativos, educação e comunicação em saúde, vigilância do câncer e dos fatores de risco, além de pesquisa (básica e aplicada), perpassam e complementam estas ações, cujo tipo e amplitude variam de acordo com os recursos econômicos, o padrão de ocorrência do câncer na população e o grau de desenvolvimento social e do sistema de saúde de cada país, estado ou região (DEVITA *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2016; PEREIRA, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; INCA, 2019).

### 3.2 CARCINOGENESE

O corpo humano é formado por células que se organizam em tecidos e órgãos. As células normais se dividem amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo, e o câncer desenvolve-se quando células anormais deixam de seguir esse processo natural, sofrendo mutações que podem provocar danos em um ou mais genes. (PEREIRA, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; INCA, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; STEFAN; GALINDO, 2014). Quando danificada, a célula pode se dividir descontroladamente e produzir novas células anormais. Os sistemas de reparo e os mecanismos imunológicos podem falhar na tarefa de destruir e limitar essas células anormais e assim, se perpetua o dano e conseqüentemente o processo da oncogênese, até finalizar o processo e gerando uma única célula anômala, que sofre mitose descontrolada e acelerada, culminando com a formação de um tumor. (FELIPPE, 2019; PEREIRA, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; INCA, 2019; MS, 2011).

A ocorrência e progressão do câncer têm etiologia multifatorial, podendo ter origem e ser influenciado por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de modo de vida, que propiciam uma reprogramação celular, gerando o descontrole da divisão celular e a conseqüente formação da massa tumoral (PEREIRA, 2019;

PIZZO; POPLACK, 2015; INCA, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; MONDAL; SARKAR, 2015; MS, 2011; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; REYA *et al.*, 2001).

A gênese do tumor é um processo de múltiplos passos, sendo sua progressão dependente de um acúmulo sequencial de mutações nas células. Essas mutações resultam na violação da homeostase como, por exemplo, o aumento da taxa de proliferação, a resistência a apoptose e a criação de um ambiente favorável ao crescimento celular, sendo a instabilidade genética uma característica de muitos tumores. Evidências experimentais sugerem que há apenas um pequeno grupo celular capaz de originar um tumor e essas células são chamadas de células-tronco neoplásicas, sendo consideradas células raras e com indefinido potencial de proliferação que conduzem a formação e crescimento dos tumores (REYA *et al.*, 2001). Esta compreensão é essencial na definição de investimentos em pesquisas de avaliação de risco e em ações efetivas de prevenção (DEVITA *et al.*, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; PIZZO; POPLACK, 2015; INCA, 2019; MS, 2011).

Considerando que o câncer é de causa multifatorial e complexa, mesmo com os avanços até a atualidade derivados da biologia molecular e da genética, especialmente com o sequenciamento genômico amplo, ainda não são suficientes para esclarecer seu comportamento. No entanto, a identificação de componentes interferentes pode ser significativa para grandes avanços, permitindo, no futuro, a determinação de variantes genéticas que se relacionam aos diversos tipos de câncer (CARMARGO; MELARAGNO, 2013; PIZZO; POPLACK, 2015; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; MS, 2011; NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; STEFAN; GALINDO, 2014).

Umas das mais importantes questões na biologia celular é compreender os mecanismos que regulam a auto-renovação. Esta é crucial para a função das células, porque requer muitos tipos de células-tronco para persistir pelo tempo de vida ideal. Além disso, células-tronco de diferentes organismos podem variar em seu potencial de desenvolvimento, e todas regulam a balança entre auto-renovação e diferenciação. Portanto, é de extremamente importância compreender seu processo de regulação, pois, este conhecimento é fundamental para o entendimento da proliferação das células-tronco as quais mostram uma proliferação desordenada (REYA *et al.*, 2001).

### 3.3 O GENE *TP53*

Nas últimas décadas ocorreu uma verdadeira revolução no conhecimento do câncer humano, uma vez que a biologia molecular propiciou o entendimento de determinados aspectos da carcinogênese antes não elucidados, assim como se reconheceu a natureza gênica dessa doença. (NIEDERHUBER, *et al.*, 2019; PIZZO; POPLACK, 2015; RIBEIRO; SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

Muitos genes supressores dos tumores têm sido estudados, dentre as principais é possível citar o *TP53*. Considerado como o “guardião do genoma”, esta proteína dentre todos envolvidos nos processos de carcinogênese, é considerada a de maior importância (BRENNAN; SYRJÄNEN, 2003; BYKOV *et al.*, 2018; HAINAUT *et al.*, 2002; HAINAUT *et al.*, 2010; HARRIS, 1986; HIENTZ *et al.*, 2017; JOERGER *et al.*, 2016; LEVINE, 1990; PLUQUET; HAINAUT, 2001; WANG e HARRIS, 1997; WHYTE *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

#### 3.3.1 Função

O termo “guardião do genoma”, atribuído ao *TP53*, é decorrente da sua função como “policial molecular”, por monitorar a integridade do genoma ou seja atuando como um sensor de danos no DNA, compõe uma extensa rede que controla a integridade do genoma frente a danos celulares e auxilia o sistema de reparo, utilizando os momentos de checkpoints para paralisar o ciclo celular ou induzir à apoptose, prevenindo, assim, que ocorra a proliferação de células com o DNA mutado. Conhecer seus mecanismos de ação representa uma etapa fundamental para compreender os aspectos da biologia molecular relacionados ao câncer (CAVALCANTI JÚNIOR, *et al.*, 2002; LEVINE; MOMAND; FINALY, 1991; PIZZO PA, POPLACK DG, 2015; VOGELSTEIN B *et al.*, 1988; YAMAGUCHI K, *et al.*, 1998).

Com o avanço dos estudos, outros papéis para o *TP53* têm sido ampliados, incluindo a senescência, angiogênese, autofagia, regulação da fertilidade humana e metabolismo de carbono e lipídeos (VOUSDEN, K. H *et al.*, 2009; PASKULIN *et al.*, 2012; NAG, S *et al.*, 2013).

Durante o ciclo de divisão celular, o *TP53* faz uma verificação se há eventual ocorrência de mutações na sequência do genoma, em consequência de uma replicação defeituosa do DNA. A ativação do *TP53* selvagem tem efeito inibitório na proliferação e na transformação celular, mantendo as células em repouso na fase G1 do ciclo celular, induzindo a parada do ciclo celular frente a fatores que danificam o material genético. Assim dois caminhos podem ser seguidos: a correção da mutação através da ativação da proteína de reparo ou a indução à apoptose. Ou seja, células geneticamente instáveis e com predisposição a transformação maligna são eliminadas. (ISSELBACHER KJ, *et al.* 1995; FERREIRA, C.; ROCHA, J. 2010.; JONES PA, LAIRD PW., 1999; JORDE LB, *et al.*, 2000; KAWAMURA M. 1999; LEVINE AJ.,1988; MENENDEZ, D *et al.*, 2007; MENENDEZ *et al.*, 2009; PASKULIN, D. *et al* 2012; SHAHBAZI, J., LOCK, R.; LIU, T. 2013; RIVOIRE *et al.*, 2001; VOGELSTEIN *et al.*, 2000).

O reparo ao DNA é mediado pela ativação do *TP53*, ocorrendo com a super expressão através de rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da sua fosforilação. (MENENDEZ *et al.*, 2009).

No início do ciclo mitótico, o *TP53* ativado, produz a proteína p53 que ativa transcricionalmente o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 ativa o gene GADD-45 (“Growth Arrest DNA Damage Inducible”), que atua corrigindo a lesão no DNA. Caso a lesão seja extensa, a p53 ativa genes envolvidos no mecanismo de apoptose, suprimindo a ação de genes com ação antiapoptótica. (ARRUDA *et al.*, 2008; CAVALCANTI JÚNIOR, *et al.*, 2002).

O *TP53* é ativado em resposta a diversos sinais de estresse celular, especialmente induzido por danos ao DNA (radiação UV, gama ou X, carcinógenos, agentes alquilantes, micotoxinas, depleção de ribonucleotídeos, inibidores de topoisomerasas), hipóxia e rompimento de adesão celular (BRENNAN e SYRJÄNEN, 2003; HAINAUT *et al.*, 2002; HAINAUT *et al.*, 2010; HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000; HARRIS, 1987; HOCK *et al.*, 2011; LEVINE, 1990; OLIVIER e HAINAUT, 2001; PLUQUET e HAINAUT, 2001; WANG e HARRIS 1997; WHYTE *et al.*, 2002).

Desta forma o *TP53* está relacionado ao bloqueio do ciclo celular em caso de dano ao DNA, por meio dos eventos envolvidos na proliferação celular como monitorização da integridade dos cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo celular, desempenhando um papel fundamental na manutenção da integridade genômica, como reparo, duplicação e separação cromossômica. (ALBERTS *et al.*, 2002; BRENNAN e SYRJÄNEN, 2003; HAINAUT *et al.*, 2002; HAINAUT *et al.*, 2010; KLUMB CE, CAVALCANTI JÚNIOR GB. 2002; HALL PA, MCCLUGGAGE WG,. 2006; HARRIS, 1987; OLIVIER e HAINAUT, 2001; LANE DP 1992; PLUQUET e HAINAUT, 2001; PIMENTA *et al.*, 2013; PIZZO PA, POPLACK DG, 2015; WANG e HARRIS 1997; WHYTE *et al.*, 2002).

### 3.3.2 Estrutura do gene *TP53* e da proteína p53

O gene *TP53* e a proteína p53 foram descritas pela primeira vez em 1979, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo então referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (ARRUDA *et al.*, 2008; LANE; CRAWFORD, 1979).

O *TP53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17 na região 3.3 e compreende 11 éxons. Codifica uma fosfoproteína nuclear nomeada por seu peso molecular de 53kDa (proteína p53) com 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína, existindo na sua forma ativa como um tetrâmero. (ARRUDA *et al.*, 2008; BRENNAN; SYRJÄNEN, 2003; HAINAUT *et al.*, 2002; HAINAUT *et al.*, 2010; LEVINE, 1990; PLUQUET; HAINAUT, 2001; WANG; HARRIS 1997; WHYTE *et al.*, 2002; YAMAGUCHI K, *et al.*, 1998).

O primeiro domínio, chamado de domínio de transativação, está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal). Está compreendido entre os aminoácidos 28 e 42 e é responsável por regular a expressão de genes que atuam na parada do ciclo celular e na rota de apoptose. (ARRUDA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2003).

Na região central os domínios de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 102 e 292, possibilitam a ligação da p53 em sítios específicos do DNA. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal), existem dois domínios: o domínio de tetramerização,

que se situa entre os aminoácidos 319 a 360, responsável pela formação de tetrâmeros de p53, que é a forma mais ativa (selvagem) em transativação, e o domínio regulatório, que se situa entre os aminoácidos 364 a 393, cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (ARRUDA *et al.*, 2008; GARAY *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Uma vez ativada por fosforilação na extremidade N-terminal, a p53 perde a capacidade de ligar-se ao DNA de maneira específica. A ligação não-específica é causada pela ligação da extremidade C-terminal com o domínio central, bloqueando este domínio que pode ser revertido. Assim, a proteína p53 pode se ligar de maneira específica de domínios ao DNA, agindo como fator de transcrição. Essa ativação da proteína por fosforilação ou acetilação ainda é controversa, mas a modificação da *TP53* faz com que essa proteína possa atuar como fator de transcrição através da ligação em sequências específicas, promovendo a transativação de genes alvos. Com a mutação, p53 perde a capacidade de transativação por sobreposição dos sítios de ligação dos fatores de transcrição (ARRUDA *et al.*, 2008; GARRITANO *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Controle da expressão

Pelo papel que o *TP53* desempenha e por se tratar de um gene com potencial para causar importantes alterações na célula, sua concentração e atividades são reguladas e mantidas sob um rígido controle. Um dos processos para manter os níveis de p53 baixos é a degradação dessa proteína. Nesse contexto o oncogene MDM2 (*Murine Double Minute 2*) é importante, pois codifica uma proteína de mesmo nome e é um gene ativado pela p53. A proteína MDM2 se associa ao domínio de transativação de p53, inibindo sua transcrição regulatória funcional, o que diminui a indução da apoptose e a parada do ciclo celular. Também é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, onde é degradada por uma via de ubiquitinação. (ARRUDA *et al.*, 2008; NYLANDER *et al.*, 2000).

O transporte do complexo MDM2/p53 do núcleo para o citoplasma é mediado por proteínas exportinas que se ligam à MDM2 expondo a p53 à ubiquitinação e a

complexos proteolíticos que, no final de suas ações, favorecem o controle negativo de p53. Assim, MDM2 atua como uma E3-ubiquitina-ligase, a qual se liga nos domínios de transativação da proteína e transporta p53 para o citoplasma onde é degradada (ARRUDA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2002). Essa regulação negativa da proteína p53, exercida pela proteína MDM2, pode ser neutralizada pela ação do produto de um gene supressor de tumor denominado P14 ARF (ARF Alternative Reading Frame) que é capaz de se ligar à proteína MDM2 e impedir qualquer ligação à p53. A proteína P14ARF também pode degradar a MDM2 causando a liberação de p53 do complexo no núcleo (ARRUDA *et al.*, 2008; NYLANDER *et al.*, 2000).

### 3.3.4 Perda da função

Quando ocorre uma mutação no *TP53*, há alteração funcional da proteína que se torna não funcional, levando a uma instabilidade genética e iniciando a transformação maligna. (ARRUDA *et al.*, 2008; PINHO, 2005; SIMON, 2004).

A perda de função das proteínas regulatórias pode resultar na deficiência ou perda do controle do ciclo celular, conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada, eventualmente propiciando o desenvolvimento de uma neoplasia de caráter maligno. (BRENNAN; SYRJÄNEN, 2003; HAINAUT *et al.*, 2002; HAINAUT *et al.*, 2010; HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000; HARRIS, 1987; HOCK *et al.*, 2011; LUMB; CAVALCANTI JUNIOR, 2002; LEVINE, 1990; OLIVIER; HAINAUT, 2001; PLUQUET; HAINAUT, 2001; WANG; HARRIS 1997; WHYTE *et al.*, 2002).

A síndrome de Li-Fraumeni, por exemplo, é uma rara síndrome autossômica dominante, caracterizada por mutações herdadas que ocorrem na linhagem germinativa do *TP53* e por um fenótipo clínico de múltiplas neoplasias primárias (ARRUDA J. T *et al.*, 2008; LI; FRAUMENI, 1969). É uma síndrome de predisposição ao câncer e os portadores possuem uma probabilidade aumentada de vinte e cinco vezes de desenvolver vários tipos de tumores malignos (ARRUDA *et al.*, 2008; FELIX, NAU, TAKAHA SHI, 1992; PINTO *et al.*, 2002).

Nas células que apresentam o *TP53* com mutação e inativação da proteína não ocorre a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA, e essas

células geneticamente instáveis tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica. (ARRUDA *et al.*, 2008; CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 2002).

As alterações genéticas podem ser: mutação pontual (“Missense”), deleção gênica (“Non Sense”) de um ou dois alelos do *TP53* e inserção de nucleotídeos na sequência de DNA. Mutação pontual é a troca de um único nucleotídeo, e é o tipo de mutação do *TP53* mais frequentemente encontrado nas neoplasias. (ARRUDA *et al.*, 2008; CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 2002).

Uma mutação no *TP53*, seja pontual ou não, pode alterar de forma significativa a expressão da proteína resultando na incapacidade de efetuar a parada do ciclo celular ou disparar o mecanismo de apoptose. As formas mutadas da proteína apresentam ainda a capacidade de interagir com a proteína selvagem, impedindo a supressão tumoral. Este fenômeno é conhecido como “efeito dominante negativo”, visto que a mutação de um dos alelos do *TP53* produz o que parece ser um efeito dominante sobre o alelo normal restante (LEMOS, 1995).

Além da perda de sua função, as mutações incidentes na *TP53* também tornam o tumor menos sensível à lesão exógena induzida, aumentando a resistência terapêutica oncológica como a radioterapia e quimioterapia, sendo associada com a progressão neoplásica e aumento da capacidade metastática do tumor, e de acordo com a hipótese a proteína serve como marcador da resposta ao tratamento, o que já foi confirmado, inclusive, em cânceres de pulmão, cabeça e pescoço (BANDOH *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2011; PIZZO; POPLACK, 2015; VOGT *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

As mutações do *TP53* estão associadas com tumores biologicamente agressivos e a perda da diferenciação celular, como tumor anaplásico de Wilms, tumor de tireóide, glioma maligno ou anaplásico, melanoma metastático e invasivo, e câncer de próstata (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; VOGELSTEIN *et al.*, 1988, ZAMBETTI, 2019).

Esta relação entre mutações no *TP53* e a resposta clínica adversa já está bem estabelecida, associando-se com o estágio, histologia e recidiva, o que reflete a importância dessa proteína na regulação e crescimento das células tumorais, sendo

um fator de prognóstico relevante para esse grupo de pacientes, principalmente no público infantil. (FETT-CONTE *et al.*, 2002; JURACH *et al.*, 2006; PIZZO; POPLACK, 2015; RIBEIRO; SAFATLE-RIBEIRO, 2006; TAMBER; RUTKA, 2003).

Portanto, a importância médica deste gene é inegável, primeiro porque a detecção de mutações pode ser indicadora do diagnóstico e do prognóstico, segundo porque é um alvo perfeito para a prevenção, o que estimula as abordagens da terapia gênica (FETT-CONTE *et al.*, 2002).

### 3.3.5 Heterozigosidade do gene *TP53*

A perda somática de um alelo de um gene supressor de tumor envolve frequentemente a perda do material cromossômico, variando em extensão desde algumas centenas de pares de bases a uma sub-banda ou até ao cromossomo completo. Estes eventos são chamados de perda de heterozigosidade (LOH “Loss of Heterozygosity”), que consiste na comparação de *loci* polimórficos do DNA extraído de um tecido normal e de um tumoral do mesmo indivíduo (ARRUDA *et al.*, 2008; OSBORNE; HAM SHERE, 2000).

A perda de heterozigosidade do cromossomo 17, detectada pela técnica de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), mostra o *locus* do *TP53* alterado provando sua inativação. É um fenômeno que ocorre em aproximadamente 80% das lesões com mutações do *TP53*, estabelecendo uma frequência de LOH em 50% dos tumores (LEVINE; MOMAND, 1990).

### 3.3.6 Polimorfismos do gene *TP53*

A inativação da via *TP53* no câncer frequentemente ocorre por meio da expressão da proteína p53 mutante. A proteção celular é alterada por mutações combinadas com diferentes polimorfismos, originando uma proteína não funcional (ANDREOTTI *et al.*, 2011; DENT 2013; PIETSCH *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2006).

À medida que as sequências nucleotídicas do genoma humano foram sendo desvendadas, uma constatação evidente foi a do grande número de variações de mutações pontual encontradas, ao se comparar segmentos correspondentes do

genoma. Comumente estas mutações que ocorrem a cada 600 bases, aproximadamente, são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs (“Single Nucleotids Polimorphisms”) e correspondem a posições em que existe uma alternância dos nucleotídeos em uma frequência alélica mínima de 1% (ARRUDA *et al.*, 2008 GUIMARÃES; COSTA, 2002).

Do ponto de vista genético, a forma mais frequente de mutação do *TP53* seria a de mutação de ponto, em que ocorreria, geralmente entre os éxons de 5 a 8 do gene, que é parte codificante do mesmo, uma única substituição de base (como a citosina por timina). Em consequência haveria a substituição de um aminoácido (arginina por triptofano), determinando assim o substrato para mudança de codificação e alteração estrutural da proteína a ser formada, bem como de sua função reguladora específica. (MCDONALD, 1996).

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA E O GENE *TP53*

Um dos métodos que podem ser utilizados para identificar a mutação do *TP53* é a imuno-histoquímica, exame utilizado na prática clínica, que a detecta através do acúmulo da proteína no núcleo celular, pois a alteração genética determina uma meia vida mais longa. As mutações do *TP53* tornam a proteína mais estável e, portanto, detectável. Contudo, uma coloração positiva para p53 não implica, necessariamente, em mutação, uma vez que a degradação reduzida e o ambiente celular alterado podem, similarmente, tornar a proteína p53 selvagem detectável (ARRUDA *et al.*, 2008; HALL; LANE, 1992; HALL; MCCLUGGAGE, 2006; PINHO, 2005; SIMON, 2004).

A interpretação da demonstração imuno-histoquímica da proteína p53 na amostra é baseada na premissa de que a p53 selvagem tem meia-vida curta não sendo, portanto, detectável (FINLAY *et al.*, 1989). De forma alternativa, a ausência de coloração pode ocorrer em casos de deleção do gene, falha de transcrição ou de mutação não estável. Todas as referidas situações podem estar associadas com perda de função (HALL; LANE, 1992; HALL; MCCLUGGAGE, 2006).

A inclusão de marcadores imuno-histoquímicos no conjunto de procedimentos analíticos em amostras de biopsia, em conjunto com o cuidadoso estadiamento

anatomopatológico nos espécimes cirúrgicos, pode permitir a confecção de algoritmos, que poderão auxiliar no planejamento terapêutico e nas medidas de vigilância evolutiva de pacientes (ARRUDA *et al.*, 2008; RIBEIRO; SAFATLE- RIBEIRO, 2006; PIZZO; POPLACK, 2015).

### 3.5 TP53 E AS MEDIDAS TERAPÊUTICAS

O TP53 mutante ocorre em 50% a 70% das neoplasias, está associado à pior sobrevida global livre de doença e tem sido implicado na resistência às terapias anticâncer; ou seja, sua expressão indica um prognóstico desfavorável (ARRUDA *et al.*, 2008; GARRITANO *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2005; SOUSSI; LOZANO, 2005).

A procura por terapias seletivas contra o câncer em linhagens celulares e em modelos experimentais utilizando animais via reestabelecimento da atividade da p53 pode levar à morte de células tumorais e a regressão de tumores já estabelecidos. Desta forma proporciona um direcionamento específico para as células neoplásicas, poupando o tecido normal não afetado pelo câncer, estimulando a ideia de desenvolver meios para reconstituir a função ativa da p53 (ANDREOTTI *etal.*, 2011; OREN, 2003; PIMENTA *et al.*, 2013).

A quimioterapia continua sendo o principal tratamento para doenças malignas sistêmicas. No entanto, alguns tumores são insensíveis a agentes quimioterápicos e outros adquirem resistência sobre a recidiva. Tanto a senescência, quanto a apoptose contribuem para a ação do quimioterápico e a perda de qualquer desses processos promove a falha do tratamento. Diversos agentes anticancerígenos podem induzir a apoptose através de vias comuns e as mutações que desativam estas vias podem promover resistência aos quimioterápicos. Os agentes anticâncer podem ativar o TP53 a promover a apoptose. No entanto, os defeitos apoptóticos contribuem para a má evolução de pacientes portadores de tumores com TP53 mutante. Além disso, a perda da função do TP53 ativo pode determinar resistência ao tratamento (JOHNSTONE *et al.*, 2002; SCHMITT *et al.*, 2002).

A ativação excessiva do TP53 é considerada como uma oportunidade de opção para terapias seletivas contra o câncer, proporcionando um direcionamento

para as células neoplásicas e poupando o tecido normal não afetado pelo câncer (OREN, 2003).

#### **4. INTERDISCIPLINARIDADE**

As doenças oncológicas, nas suas diversas manifestações, têm grande relevância em saúde pública, tanto em aspectos econômicos quanto políticos e sociais. O câncer é uma condição de alta prevalência e gravidade, que gera elevados custos para os sistemas de saúde, público e privado, tendo em vista o suporte multiprofissional para o atendimento destes pacientes. Para que o diagnóstico e tratamento sejam otimizados se faz necessário avançar no conhecimento da doença de base e seu comportamento, para propor o melhor tratamento acessível, impactando em melhor qualidade de vida e redução da morbimortalidade.

Quando se busca, por meio de pesquisas, maneiras mais eficazes de estratificação dos tumores e conseqüentemente um tratamento mais personalizado às doenças, também se contribui, indiretamente, com a promoção do cuidado ao meio ambiente, através do uso racional de recursos e diminuição da geração de resíduos de serviços de saúde.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 TIPO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo epidemiológico e laboratorial, transversal e retrospectivo, visando, portanto, investigar a prevalência da mutação p53 em pacientes infanto juvenis no nordeste de Santa Catarina/Brasil.

### 5.2 LOCAL DO ESTUDO

O estado de Santa Catarina está atualmente acima da média nacional da taxa de incidência para todos os tipos de câncer em crianças em adolescentes (0-19 anos) com aproximadamente 330 casos/milhão. Joinville, é um dos principais centro de tratamento do câncer infanto-juvenil do estado, abrigando, portanto, uma série de dados a respeito dessa incidência (CAMARGO *et al.*, 2010; INCA, 2019; SBP, 2020).

Desta forma, o estudo foi realizado a partir do banco de dados e materiais biológicos arquivados no Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP), laboratório de anatomia patológica, localizado na cidade de Joinville em Santa Catarina, acreditado pelo Colégio Americano de Patologistas e pela Organização Nacional de Acreditação. Possui uma equipe com 10 patologistas e cerca de 70 colaboradores e atua na área diagnóstica da anatomia patológica, incluindo citopatologia, histopatologia, imuno-histoquímica, imunofluorescência e patologia molecular. Atende pacientes principalmente da região norte do estado, sendo aproximadamente metade provenientes da rede pública de saúde. Devido a sua abrangência de atendimento e expertise reconhecida, o CEDAP constitui um local apropriado para estudos da expressão do *TP53*.

### 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes menores de 18 anos;
- Pacientes com diagnóstico de câncer no período entre 2005 e 2015.

#### 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Indisponibilidade de material arquivado em condição adequada para a análise imuno-histoquímica;

#### 5.5 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A partir da identificação dos casos infantojuvenis com diagnóstico de câncer, os profissionais do CEDAP preparavam lâminas de microscopia dos respectivos tecidos biológicos, e estes eram armazenados em bloco de parafina. De maneira resumida, eram realizados cortes com espessura de aproximadamente 3 µm e estes eram submetidos à rotina de imuno-histoquímica conforme descrito brevemente abaixo.

Novos cortes foram feitos nas amostras selecionadas. A recuperação antigênica foi realizada utilizando o equipamento PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca) em pH alto por 20 minutos a 95°C. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada de forma automatizada com o equipamento "Autostainer Link 48" (Dako), usando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p53 clone DO-7 (Dako) pronto para uso. Para bloqueio da peroxidase foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio 3% (Dako). Em seguida as lâminas foram incubadas na solução "EnVision FLEX/HRP polymer" (Dako) por 20 minutos e "EnVision FLEXDAB Chromogen" (Dako) foi usado por 5 minutos para revelação. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Gill.

O carcinoma de cólon foi utilizado como controle positivo para expressão da mutação p53, enquanto o controle negativo foi realizado sem a utilização do anticorpo primário, conforme procedimento imuno-histoquímico usual do referido laboratório.

Foram considerados como positivos nas análises imuno-histoquímicas os casos cujas lâminas apresentaram mais de 10% de núcleos celulares intensamente corados.

### 5.5.1 Leitura e interpretação

O método de leitura e interpretação dos resultados da imuno-histoquímica foi baseado em Queiroz (2006) e Rocha (2003). As lâminas foram examinadas de modo cego em relação aos dados clínicos e histológicos dos pacientes e de forma independente por dois patologistas do CEDAP com experiência na análise de resultados da técnica para p53. Foram consideradas a porcentagem de células positivas e a intensidade da coloração em cada amostra.

Para a estratificação da porcentagem de células positivas estabeleceu-se uma escala de 0 a 3, sendo: 0 a 10% de células coradas classificadas como “0”, >10 a 25% como “1”; >25 a 50% como “2” e >50% como “3”. Por sua vez, a intensidade da coloração foi graduada em outra escala de 0 a 3: resultado negativo (ausência) foi classificado como “0”; fraco como “1”; moderado como “2” e forte como “3”. O escore final pra cada caso foi obtido multiplicando-se o resultado da classificação derivada da porcentagem de células coradas pelo resultado da classificação decorrente da análise da intensidade da coloração. Na análise final, um escore menor do que 3 foi considerado negativo, enquanto escores iguais ou superiores a 3 foram considerados positivos.

## 5.6 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Para estudo da amostra foram considerados exclusivamente idade (faixa etária) e sexo.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos índices de área foram descritos por meio dos parâmetros média e número de casos.

A variabilidade inter-observador para os índices de intensidade e quantidade, referentes aos equipamentos e porcentagens de coloração, tanto pelo clone DO-7, foi avaliada pelo teste de Cohen Kappa.

O teste Qui-quadrado - teste de independência foi aplicado para avaliar as amostras positivas p53 e as variáveis intensidade, quantidade e índice, bem como para as comparações entre as amostras positivas p53, os tipos de tumor, sexo e faixa etárias. O nível de significância das decisões estatísticas foi de 0,05 (5%) e a análise estatística foi apoiada pelo programa Statistical Package of Social Science (SPSS) versão 26.0.

Com base no conjunto de laudos oriundos do laboratório CEDAP, optou-se por detalhar as análises concentrando-se nos 5 tipos de tumores infanto-juvenis mais frequentes, em consonância com o observado na literatura. (FELIPPE, 2019; LANZKOWSKY *et al.*, 2016; PIZZO; POPLACK, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2019).

## 5.8 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) (Parecer Nº: 3.619.240; Anexo 1), tendo sido seguidos os princípios éticos contidos na Resolução 466, de 2012, e demais diretrizes do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Foi solicitada uma carta de anuência (Anexo 2) do CEDAP, cujo responsável autorizou o acesso dos dados para a execução da pesquisa somente após a aprovação do projeto pelo CEP. O estudo não trouxe implicações quanto a mudanças na rotina assistencial dos participantes.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo é apresentado na forma de artigo científico que foi encaminhado para publicação no periódico “Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial”, conforme comprovante de submissão apresentado no Anexo 3.

**Avaliação da expressão do gene *TP53* na população com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, Brasil**

***Evaluation of TP53 gene expression in a population with childhood cancer in northeastern Santa Catarina, Brazil***

Hugo M. Oliveira<sup>1, 2</sup> (ORCID: 0000-0002-2095-0658); Jaqueline Stall<sup>1, 3</sup> (ORCID: 0000-0003-1181-8003); Karina M. P. A. Coelho<sup>1, 3</sup> (ORCID: 0000-0002-4743-8742); Viviane C. Silva<sup>1</sup> (ORCID: 0000-0002-9696-0529); Paulo H. C. França<sup>1</sup> (ORCID: 0000-0002-1750-9132)

1. Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, Santa Catarina, Brasil.
2. Hospital Infantil de Joinville Dr. Jeser Amarante Faria, Joinville, Santa Catarina, Brasil.
3. Centro de Diagnósticos Anatomopatológicos (CEDAP), Joinville, Santa Catarina, Brasil.

## RESUMO

**Introdução:** Câncer constitui um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células, que multiplicam-se rapidamente e invadem tecidos e órgãos. No Brasil, são estimados cerca de 8.000 novos casos anuais de câncer infanto-juvenil, cujas causas ainda são pouco conhecidas, embora alguns apresentem fatores determinados geneticamente. Aproximadamente 70% dos cânceres humanos possuem alteração no gene *TP53*, codificante da proteína responsável por inibir o crescimento desordenado de células expostas a injúrias. No entanto, a frequência de alterações na expressão do *TP53* em cânceres infanto-juvenis no Brasil permanece pouco conhecida. **Objetivo:** Avaliar a expressão do gene *TP53* em pacientes com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, Brasil. **Métodos:** De forma retrospectiva, foram incluídos 282 pacientes com diagnóstico de câncer entre 2005 e 2015, em Joinville. A expressão do *TP53* foi avaliada via imunohistoquímica utilizando-se um escore baseado na intensidade e percentual de células coradas. **Resultados:** A proteína p53 foi positiva em 25,2% dos casos, sem diferença entre os sexos. Considerando os cinco principais grupos de tumores na casuística, a expressão foi positiva em 31,8%, 27,3%, 20%, 17,2% e 5,9% dos linfomas, nefroblastomas, neuroblastomas, tumores do Sistema Nervoso Central e leucemias, respectivamente. **Conclusão:** A expressão do *TP53* foi avaliada quanto a prevalência em diferentes cânceres infanto-juvenis no nordeste catarinense. A positividade foi maior entre os linfomas e menor nas leucemias, porém sem diferença significativa entre os cinco tumores mais frequentes. São demandados outros estudos que permitam correlação com a agressividade e evolução da doença.

**Unitermos:** câncer infanto-juvenil, gene *TP53*, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is a set of diseases characterized by the disordered growth of cells that multiply rapidly and invade tissues and organs. In Brazil, there are an estimated 8,000 new cases of childhood cancer each year, the causes of which are still little known, although some have genetically determined factors. Approximately 70% of human cancers have alterations in the TP53 gene, which encodes the protein responsible for inhibiting the disordered growth of cells exposed to injuries. However, the frequency of changes in TP53 expression in childhood cancers in Brazil is poorly known. **Objective:** To evaluate the expression of TP53 gene in patients with childhood cancer in northeastern Santa Catarina, Brazil. **Methods:** Retrospectively, 282 patients diagnosed with cancer between 2005 and 2015 in Joinville were included. TP53 expression was evaluated by immunohistochemistry using a score based on the intensity and percentage of stained cells. **Results:** The p53 protein was positive in 25.2% of cases, with no difference between sexes. Considering the five main groups of tumors in the sample, the expression was positive in 31.8%, 27.3%, 20%, 17.2% and 5.9% of lymphomas, neuroblastomas, neuroblastomas, tumors of the Central Nervous System and leukemias, respectively. **Conclusion:** The prevalence of TP53 expression was evaluated in different childhood cancers in the northeastern of Santa Catarina. Positivity was higher among lymphomas and lower in leukemias, but with no significant difference among the five most frequent tumors. Further studies that allow correlation with aggressiveness and disease evolution are required.

**Keywords:** childhood cancer, gene TP53, immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância<sup>(1)</sup>. No território brasileiro, observa-se anualmente um número aproximado de um milhão de casos, considerando o público adulto e infanto-juvenil<sup>(2)</sup>.

Os principais tipos de câncer infanto-juvenil são as leucemias, em primeiro lugar em incidência, seguidas dos tumores do sistema nervoso central (SNC), linfomas, neuroblastomas, nefroblastomas e tumores ósseos e musculares<sup>(3)</sup>. Enquanto os tumores nos adultos estão, em geral, relacionados à exposição a vários fatores de risco definidos, as causas dos tumores pediátricos ainda são pouco conhecidas, embora em alguns tipos específicos já se tenha embasamento científico de que sejam determinados geneticamente<sup>(4, 5)</sup>.

O progresso no tratamento do câncer na infância cresceu significativamente nas últimas quatro décadas pois, em meados da década de 1970, a taxa de sobrevivência em 5 anos era de apenas 58%<sup>(1)</sup>. Atualmente, estima-se que em torno de 70% das crianças acometidas de câncer podem ser curadas e mais de 84% das crianças com câncer sobrevivem 5 ou mais anos, somando-se a uma melhor qualidade de vida durante todo o período compreendido pelo tratamento<sup>(6-8)</sup>.

A terapêutica do câncer infanto-juvenil conta em sua base de um racional complexo, composta por quimioterapia, radioterapia e abordagem cirúrgica, além da assistência de uma equipe multiprofissional especializada junto a um hospital terciário, com impacto econômico expressivo, considerando os custos hospitalares com prestadores de serviços diretos e indiretos<sup>(6-10)</sup>.

Mesmo com a melhora progressiva da taxa de cura, a mortalidade ainda destaca-se como significativa no país, correspondendo à oitava posição entre as causas de óbito em crianças de 0 a 4 anos, assim como foi a principal causa de morte na faixa etária de 5 a 19 anos em 2014<sup>(11)</sup>. Com a intenção de melhorar ainda mais as taxas de cura, diferentes estudos focaram um dos genes primordiais identificados em associação ao desenvolvimento do câncer - *TP53*, que desempenha papel na supressão tumoral. Alterações nucleotídicas aumentam a

propensão à geração de células cancerígenas em relação à população geral<sup>(12)</sup>, observando-se que, aproximadamente, 70% dos cânceres humanos possuem alguma alteração na função do *TP53*<sup>(12, 13)</sup>. Assim sendo, um desafio ainda atual para a oncologia pediátrica é conhecer a biologia molecular dos tumores nessa população, bem como avaliar o significado da expressão da mutação do *TP53*.

O presente estudo teve o intuito de investigar a população infanto-juvenil local quanto a prevalência da expressão do *TP53* via imuno-histoquímica, avaliando sua distribuição frente às características demográficas e tipo histológico.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Tratou-se de um estudo epidemiológico e laboratorial, transversal e retrospectivo, visando, portanto, investigar a prevalência da mutação p53 em pacientes infanto juvenis no nordeste de Santa Catarina/Brasil.

O estudo foi realizado a partir do banco de dados e materiais biológicos arquivados no Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP), laboratório de anatomia patológica, localizado na mesma cidade, acreditado pelo Colégio Americano de Patologistas e pela Organização Nacional de Acreditação. Para o estudo foram incluídos todos os pacientes menores de 18 anos com diagnóstico de câncer no período entre 2005 e 2015 e a avaliação da expressão do *TP53* foi correlacionada às características demográficas sexo e idade e ao tipo histológico do tumor.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) (Parecer nº 3.619.240).

### **Procedimento imuno-histoquímico**

A partir da identificação dos casos infanto-juvenis com diagnóstico de câncer, novos cortes com espessura de 3 µm para preparação de lâminas foram feitos nas amostras armazenadas em blocos de parafina. A recuperação antigênica foi realizada utilizando o equipamento PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca), em pH alto, por 20 minutos a 95°C. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada de forma

automatizada com o equipamento "Autostainer Link 48" (Dako), usando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p53 clone DO-7 (Dako) pronto para uso. Para bloqueio da peroxidase foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). Em seguida as lâminas foram incubadas na solução "EnVision FLEX/HRP Polymer" (Dako) por 20 minutos, enquanto "EnVision FLEX DAB Chromogen" (Dako) foi usado por 5 minutos para revelação. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Gill.

O carcinoma de cólon foi utilizado como controle positivo para a proteína p53, enquanto o controle negativo foi realizado sem a utilização do anticorpo primário, conforme procedimento imuno-histoquímico usual do referido laboratório.

O método de leitura e interpretação dos resultados da imuno-histoquímica foi baseado em Queiroz (2006)<sup>(14)</sup> e Rocha et al. (2004)<sup>(15)</sup>. As lâminas foram examinadas de modo cego em relação aos dados demográficos e clínicos dos pacientes e de forma independente por dois patologistas do CEDAP com experiência na análise de resultados da técnica para p53.

Foram consideradas a porcentagem de células positivas e a intensidade da coloração em cada amostra. Para a estratificação da porcentagem de células positivas foi estabelecida uma escala de 0 a 3, sendo 0 a 10% de células coradas classificadas como "0", >10 a 25% como "1", >25 a 50% como "2" e >50% como "3". Por sua vez, a intensidade da coloração foi graduada em outra escala de 0 a 3: resultado negativo (ausência) foi classificado como "0", fraco como "1", moderado como "2" e forte como "3". O escore final para cada caso foi obtido multiplicando-se o resultado da classificação derivada da porcentagem de células coradas pelo resultado da classificação decorrente da análise da intensidade da coloração<sup>(16)</sup>. Na análise final, um escore menor do que 3 foi considerado negativo, enquanto escores iguais ou superiores a 3 foram considerados positivos.

### **Análises estatísticas**

As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão, enquanto as variáveis categóricas como número de casos e porcentagem.

A variabilidade interobservador, tanto para o índice de intensidade de coloração como para a quantidade percentual de células coradas, foi avaliada pelo teste kappa de Cohen.

O teste de Qui-quadrado de independência foi aplicado para avaliar as amostras quanto as variáveis intensidade, quantidade (porcentagem) e escore imuno-histoquímico final relativamente às distribuições entre os tipos de tumor, sexos e faixas etárias (abaixo de 2 anos = lactentes, de 3 a 5 anos = pré-escolares, de 6 a 11 anos = escolares e acima de 11 anos = adolescentes). O nível de significância das decisões foi de 0,05 (5%) e a análise estatística foi apoiada pelo programa Statistical Package of Social Science (SPSS) versão 26.0.

## RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 282 pacientes. Do total quanto ao sexo, 148 (52,5%) eram homens. Quanto à idade dos pacientes, esses distribuíram-se em 45 casos (16,0%) de lactentes, 45 (16,0%) de pré-escolares, 67 (23,7%) de escolares e 125 de adolescentes, apresentando em média  $9,5 \pm 5,3$  anos (Tabela 1).

A maioria dos pacientes ( $n = 160$ ; 56,7%) corresponderam a um dos cinco principais tipo de tumores infanto-juvenis, enquanto 122 pacientes (43,3%) apresentaram outras especificações histológicas não abordadas no presente estudo. Dessa forma, na casuística detalhada no estudo, os cinco principais tumores quanto a frequência foram os linfomas ( $n = 66$ ; sendo 21 Hodgkin, 42 Não Hodgkin e 3 não classificados), as leucemias ( $n = 34$ ; sendo 16 leucemias linfoblásticas agudas, 14 leucemias mieloblásticas agudas, 4 não classificadas), os tumores do SNC ( $n = 29$ ; sendo 21 astrocitomas, 3 meduloblastomas, 3 ependimomas e 2 retinoblastomas), os neuroblastomas ( $n = 20$ ) e nefroblastomas ( $n = 11$ ) (Tabela 1).

Para cada caso, as avaliações imuno-histoquímicas foram realizadas de forma independente por dois patologistas quanto ao percentual de células positivas e intensidade da coloração, sendo concordantes: a variabilidade interobservador foi mínima, pois o teste kappa evidenciou uma concordância quase perfeita entre os patologistas para ambas as variáveis ( $k=0,873$ ; IC 95% 0,81-0,94;  $p<0,001$  e  $k=0,877$  IC 95% 0,817-0,937;  $p<0,001$ , respectivamente).

Dos 282 casos avaliados, 71 indivíduos (25,2%) apresentaram expressão positiva para p53, enquanto os outros 211 apresentaram teste negativo. A distribuição da expressão positiva da proteína p53 quanto ao sexo evidenciou 52,1% (n = 37) de casos femininos e 47,9% (n = 34) masculinos, sem diferença significativa.

Considerando os cinco principais tumores quanto a frequência na casuística, 2 (5,9%) dentre os 34 pacientes diagnosticados com leucemia apresentaram resultado p53 positivo. Quanto aos tumores do SNC (n = 29), 5 (26,9%) apresentaram positividade para p53, sem distinção do subgrupo histológico. Por sua vez, dentre os 66 casos de linfomas da casuística, a positividade da expressão do gene *TP53* foi de 31,8% (n = 21). Dentre os neuroblastomas (n = 20) e nefroblastomas (n = 11), a expressão foi positiva em 4 (20%) e 3 (27,3%) casos, respectivamente. Não houve diferença significativa quanto a distribuição da positividade do marcador p53 entre os cinco grupos de tumores considerados (Tabela 1).

O teste de Qui-quadrado de independência foi realizado para verificar a associação entre as faixas etárias na amostra estudada com a expressão da p53, identificando-se uma possível diferença significativa entre os grupos (p = 0,04). Adicionalmente, não houve diferença de expressão entre os sexos (Tabela 1).

## **DISCUSSÃO**

A história natural do câncer indica que o curso clínico da doença e a sobrevida são variáveis de paciente para paciente. Esta variação é determinada por vários fatores que ainda não estão totalmente entendidos na maioria dos tumores, como nos cânceres infanto-juvenis<sup>(1, 7, 17-19)</sup>. Uma das formas de avançar no cenário da prática da oncologia pediátrica é a elucidação do processo de carcinogênese molecular e a identificação de biomarcadores para o desenvolvimento de drogas, diagnóstico precoce, determinação do prognóstico e predição da resposta ao tratamento<sup>(1, 7-10)</sup>.

Apesar dos avanços ocorridos no conhecimento dos mecanismos genéticos, o papel do gene *TP53* como fator participante da gênese do câncer, assim como sua

relevância clínica e importância no prognóstico, permanece controverso. Alguns autores creditam às alterações no *TP53* um pior prognóstico<sup>(10, 20-21)</sup>.

Neste trabalho, tendo como foco avaliar a expressão imuno-histoquímica do gene *TP53* em pacientes com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, três índices foram realizados - intensidade da marcação, percentual de células coradas e escore (produto) final - com base em amostras arquivadas desde 2005, que foram reprocessadas para fins do estudo. Assim, procurou-se analisar a prevalência da expressão do *TP53*, conforme descrito por estudos anteriores semelhantes realizados em outras populações<sup>(15, 16, 22-24)</sup>.

A análise da expressão imuno-histoquímica com base em escore derivado da intensidade e percentual de células marcadas é um método válido e utilizado por diversos autores, com variações em relação ao percentual de células coradas para se considerar *TP53* mutado ou não, variando desde apenas uma célula até 25% das células no campo analisado. Por sua vez, a avaliação da intensidade variou entre descritores indicados como “muito fraco ou pouco intenso” a “muito forte ou muito intenso”. No entanto, a maioria dos estudos utiliza o corte de 10% de células coradas como mínimo para evidenciar positividade de expressão da p53, enquanto a classificação quanto a intensidade varia de “ausente” a “forte ou intenso”, que foram os limites adotado pelo presente estudo<sup>(15, 16, 23, 25-27)</sup>.

Em nosso estudo, a positividade da expressão do *TP53* foi de apenas 25,2%. O resultado obtido ficou abaixo dos correspondentes encontrados na literatura, que aponta valores entre 50% e 70% derivados de neoplasias e técnicas diversas de avaliação da expressão<sup>(6, 28-31)</sup>. O achado discrepante pode ter relação com a crescente sofisticação tecnológica dos métodos diagnósticos com maior sensibilidade, como os baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)<sup>(20, 21)</sup>. Por exemplo, Marques (2009)<sup>(10)</sup>, em seu estudo de 41 pacientes adultos com câncer de esôfago, identificou 69,3% de expressão do gene *TP53* ao avaliá-lo via PCR.

A positividade da imuno-histoquímica na avaliação da p53, na ausência de mutação detectável do gene codificante, pode ser explicada de várias formas. A proteína p53 selvagem pode acumular-se em níveis suficientes para ser detectada pela imuno-histoquímica, tanto em células normais como neoplásicas, devido seu

acúmulo refletir mais amplamente o ambiente celular, do que simplesmente a estrutura intrínseca da proteína. Por outro lado, a negatividade da imuno-histoquímica em tumores contendo uma mutação pode refletir a falta de sensibilidade ou a própria ausência de acúmulo da proteína p53. Esta última pode ocorrer quando a produção da proteína está bloqueada ou truncada como resultado de uma mutação, particularmente, em decorrência de deleções, mutações “splicing” e mutações “nonsense”<sup>(32, 33)</sup>.

As dificuldades de se associar o status do gene *TP53* às propriedades biológicas das células cancerosas e a sensibilidade destas células às diversas drogas poderiam ser explicadas, em parte, pela expressão das diferentes isoformas do gene. O *TP53* contém um promotor interno alternativo no íntron 4 e pode transcrever 9 isoformas que apresentam localizações subcelulares diferentes. Assim, o uso de painel de anticorpos anti-p53 em imuno-histoquímica pode resultar em diferentes padrões em uma mesma amostra tumoral<sup>(33)</sup>.

Os anticorpos monoclonais DO-1 e DO-7 reconhecem p53, p53 $\beta$  e p53Y, mas não reconhecem as outras isoformas da proteína p53. A fim de se obter um melhor entendimento sobre a imuno-deteção de p53, uma transcrição reversa associada à PCR poderia ser utilizada, visando a deteção de diferentes isoformas de p53. Entretanto, tais ensaios necessitam de RNA de alta qualidade, o que torna o processo mais difícil<sup>(21, 32-34)</sup>.

Alternativamente, a presença de mutação no *TP53* pode não ser detectada pela análise molecular. Regiões altamente conservadas do gene (éxons 5-8) são geralmente escolhidas para serem analisadas, tendo em vista que contêm a vasta maioria das mutações conhecidas. Mutações que ocorrem fora destes éxons podem não ser detectadas, mas são menos frequentes<sup>(35)</sup>. Mais recentemente, estudos moleculares têm se estendido para os éxons 4, 9 e 10 e observou-se que estes contêm um considerável número de mutações (cerca de 15%). O sequenciamento direto do gene *TP53* após amplificação por PCR permanece o “padrão ouro” de análise molecular, mas pouco acessível à maioria dos laboratórios de patologia<sup>(33-34)</sup>.

Complicações adicionais na avaliação da imuno-deteção da proteína p53 incluem variações nas técnicas e nos padrões de interpretação de positividade. De todo modo, é provável que padrões diversos de expressão do *TP53* tenham uma

diferente base biológica e que estas diferenças possam ter relevância clínica. Sua detecção está normalmente localizada no núcleo das células malignas, não tendo expressão detectável nas células normais. A mutação é normalmente acompanhada de positividade em uma ampla proporção da população de células malignas, mas os padrões de imuno-deteção são raramente homogêneos. Assim, a padronização de ambos, metodologia laboratorial e interpretação da leitura, são essenciais para o uso rotineiro da imuno-histoquímica<sup>(33, 34)</sup>.

Falsos negativos podem ocorrer e geralmente são devidos ao uso de somente um anticorpo e/ou uso inadequado do material, seja fixado em formalina ou material congelado por um longo período. Há um número de variáveis não controláveis no processamento tecidual que poderia explicar os diferentes padrões de imuno-deteção entre os blocos individualmente, como, por exemplo, o tempo entre a retirada do tecido e a fixação, o tamanho da amostra a ser fixada, o tempo decorrido desde a fixação do tecido e a temperatura do estado de submersão em parafina. Todos estes fatores têm um impacto direto na qualidade da preservação antigênica<sup>(35)</sup>.

Do ponto de vista genético, a mutação mais frequentemente detectada em *TP53* ocorre entre os éxons 5 a 8 do gene. O tipo de mutação mais comumente encontrada é a chamada "mutação em ponto", em que apenas uma base nitrogenada do complexo molecular é substituída, alterando dessa forma a sequência de transcrição e tradução da proteína, que é modificada na sua estrutura e função<sup>(32-35)</sup>. Novamente, o método genético mais fidedigno é a PCR seguida de sequenciamento, que demonstra as alterações moleculares, tanto em quantidade como posição no gene<sup>(32, 34)</sup>.

As diferenças entre percentuais de imuno-positividade decorrentes de mutações, avaliados por diferentes métodos, poderiam eventualmente prejudicar a análise comparativa de resultados. No entanto, de acordo com comparações feitas entre os dois métodos mencionados, embora possa haver alguma discrepância, esta não é significativa a ponto de alterar a análise dos resultados e sua aplicação. Considerando tais fatos, deduz-se que a imuno-positividade pode não representar apenas um marcador de mutação, mas refletir também, de uma forma mais abrangente, outras anormalidades nas vias de sinalização do complexo ciclo que

envolve p53, as quais contribuiriam da mesma forma para seu prejuízo funcional<sup>(10, 20, 21)</sup>.

Em nosso estudo, a distribuição da expressão positiva da proteína p53 quanto ao sexo evidenciou 52,1% (n = 37) de casos femininos e 47,9% (n = 34) masculinos, o que é semelhante ao descrito na literatura, que aponta uma pequena prevalência global não significativa do sexo masculino<sup>(35-41)</sup>.

As leucemias são o tipo de câncer mais comum no público infanto-juvenil<sup>(7)</sup>; porém, em nosso estudo, avaliamos a expressão da p53 em biopsias de medula, que não é o método mais indicado para tal diagnóstico, sendo a imuno-fenotipagem por citometria de fluxo o método padrão ouro e de uso convencional<sup>(35,36)</sup>. Em nossa casuística quanto a este tipo de câncer (n = 34), a expressão positiva ocorreu em apenas 2 casos (5,9%). Enquanto isso, Bainer et al. (2017)<sup>(42)</sup>, utilizando imuno-histoquímica com anticorpo anti-TP53 idêntico ao do presente estudo, demonstraram positividade de 23% entre indivíduos de 0 a 18 anos em um total de 465 casos no St. Jude Children's Research Hospital, nos EUA. Por sua vez, Demir et al. (2020)<sup>(27)</sup>, utilizando a mesma técnica em 62 pacientes pediátricos no Aprea Therapeutics, na Suécia, encontraram 6,5% de casos positivos. Por outro lado, empregando a técnica PCR, Ding et al. (2017)<sup>(43)</sup> encontraram positividade para p53 de 11,6% em 154 pacientes (0 a 18 anos) no Cancer Science Institute, em Singapura.

Quanto aos tumores do SNC, diferentes autores indicam que mutações no *TP53* costumam estar presentes em 20 a 75% dos casos, utilizando como técnica a imuno-histoquímica e anticorpo monoclonal anti-TP53. Pope et al. (2007)<sup>(44)</sup>, em sua casuística de pacientes até 12 anos com glioblastoma, em Curitiba, encontraram 75% de positividade. Kwon et al. (2020)<sup>(45)</sup>, avaliando 89 pacientes entre 0 e 80 anos diagnosticados com glioblastoma, encontraram 44,4% de positividade na imuno-histoquímica para p53 no Samsung Medical Center, Coreia do Sul. Por sua vez, Nweke et al. (2021)<sup>(46)</sup> observaram positividade correspondente a 21% dos casos em 81 pacientes, incluindo crianças e adultos, com uma média de idade de 30,6 anos, no Tertiary Nigerian hospital, na Nigéria. Finalmente, Uppar et al. (2019)<sup>(47)</sup>, também empregando imuno-histoquímica, identificaram positividade de 69%, em 29 amostras de pacientes com idades entre 3 e 18 anos, no National Institute of Mental Health, na

Índia. Em nossa casuística, verificamos 26,9% de imuno-positividade nos tumores do SNC (n = 29), assemelhando-se à literatura.

Dentre os espécimes de linfoma da casuística estudada (n = 66), a positividade da expressão do *TP53* foi observada em 31,8% dos casos. Cenet al. (2019)<sup>(48)</sup>, empregando hibridização in situ fluorescente, identificaram positividade em 32% de 29 pacientes com Linfoma Não Hodgkin (LNH), na China. Por meio da PCR, Ichikawa et al. (1997)<sup>(49)</sup> observaram expressão da mutação do *TP53* em 22% das 102 amostras analisadas no Grants-in-Aid for Cancer Research, Japão, incluindo crianças e adultos. Por sua vez, utilizando a imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-TP53, Klumb et al. (2003)<sup>(50)</sup> encontraram 36% de casos positivos em 49 pacientes (0 a 15 anos) com LNH, no Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Também empregando imuno-histoquímica, Magluta, Klumb (2008)<sup>(51)</sup>, no Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, relataram 30% de positividade em pacientes diagnosticados com Linfoma de Burkitt. Nossos resultados referentes a linfomas são muito próximos aos observados em outras populações.

Para os nossos casos de neuroblastoma (n = 20), a expressão foi positiva em 4 casos (20%). Aparentemente, existe de fato uma baixa correlação entre a mutação no *TP53* e este tipo de câncer. Oh et al. (2019)<sup>(28)</sup>, em um artigo de revisão e sem delimitar a técnica e a faixa etária dos pacientes, relataram 1,8% de casos de neuroblastomas positivos para p53. Seidinger et al. (2015)<sup>(52)</sup>, avaliando a expressão por meio da PCR, identificaram 8,4% de positividade entre 178 pacientes, com idades entre 0 e 18 anos, em um centro de tratamento em Campinas, no Brasil. A imuno-deteção elevada em nosso estudo pode ter sido influenciada pelo número de casos relativamente pequeno para este tipo de câncer na casuística e, desta maneira, inferências a respeito de mutações no *TP53* ficam prejudicadas.

Dentre os nossos casos de nefroblastomas (n = 11), a expressão da p53 foi positiva em 3 casos, representando 27,3%. He et al. (2020)<sup>(53)</sup>, utilizando avaliação de miRNAs, identificaram 2,3% de casos positivos entre crianças abaixo de 10 anos (n = 178) no Youjiang Medical University For Nationalities Affiliated Hospital, Baise, na China. Wang et al. (2020)<sup>(54)</sup>, dentre 183 pacientes com nefroblastoma, independente da idade, relataram 57% de casos positivos, no Yuying Children's

Hospital of Wenzhou Medical University and Guangzhou Women and Children's Medical Center, fazendo uso de genotipagem para identificação de polimorfismos de interesse na expressão do gene *TP53*.

O câncer infantil é um grupo heterogêneo de doenças malignas. Parece que fatores genéticos e ambientais desempenham um papel determinante. A idade precoce no diagnóstico indica que o câncer na infância pode se originar na vida intrauterina e que fatores antes do nascimento, incluindo pré-concepção, bem como atuantes na primeira infância, podem ser determinantes importantes. Diferenças geográficas observadas nas taxas de incidência têm sido usadas para apoiar várias hipóteses para a associação entre exposições relacionadas ao estilo de vida moderno e o risco de câncer infantil<sup>(35-41)</sup>.

Para o diagnóstico precoce do câncer infanto-juvenil, além de reconhecer os seus sinais e sintomas, são necessárias ações que impliquem a atuação conjunta das organizações de saúde e dos órgãos de formação dos profissionais, a fim de promover um cuidado integral, garantindo-se acessibilidade, integralidade e resolutividade<sup>(1, 7, 55-57)</sup>. Além disso, a definição de um subgrupo de tumores predominantemente p53 imuno-positivos poderia trazer à tona uma melhor compreensão do tumor e, conseqüentemente, novas possibilidades de abordagens. Porém, para tais correlações clínicas, torna-se necessária a incorporação de métodos de diagnóstico na prática diária que identifiquem as anormalidades genéticas, além da histopatologia convencional<sup>(55)</sup>.

Algumas limitações do presente estudo devem ser destacadas. Inicialmente, o limitado tamanho da casuística, decorrente do estudo ter sido conduzido em um centro único, o que impossibilitou correlacionar os resultados obtidos com a subclassificação histológica dentro de cada tipo de tumor, ainda que considerando os mais frequentes. Ou seja, os resultados encontrados não devem ser extrapolados diretamente para outras localidades e serviços de patologia ou oncologia pediátrica. Adicionalmente, devido o desenho retrospectivo aplicado ao estudo, é possível que o longo tempo de armazenamento das amostras e conseqüente degradação gradual tenham impactado negativamente em uma parcela de resultados potencialmente falsos negativos.

## CONCLUSÃO

A expressão do gene *TP53*, investigada via imuno-histoquímica, foi avaliada quanto a prevalência em população com câncer infanto-juvenil em um centro diagnóstico de referência no norte catarinense. Positividade foi confirmada em 25,2% dos casos, sem diferença entre os sexos. A imuno-deteção da proteína p53 foi maior entre os casos de linfomas (31,8%) e menor nas leucemias (5,9%). O significado da expressão do *TP53* em diferentes tumores, com vistas ao aprimoramento diagnóstico e terapêutico dos cânceres infanto-juvenis, demanda estudos que aliem métodos analíticos mais precisos e que permitam correlação com a agressividade e evolução da doença.

**TABELA 1:** Resultados da expressão imuno-histoquímica do gene *TP53* em tumores infanto-juvenis

Características demográficas e diagnóstico oncológico	Amostra estudada, N (%)	Expressão imuno-histoquímica		P
		Positiva, n (%)	Negativa, n (%)	
Total	282	71 (25,2)	211 (74,8)	
Idade, anos (média ±DP)	9,5 ±5,3	9,5 ±5,3	9,4 ±5,3	0,04
<i>Lactentes</i>	45 (16,0)	16 (35,6)	29 (64,4)	
<i>Pré-escolares</i>	45 (16,0)	5 (11,1)	40 (88,9)	
<i>Escolares</i>	67 (23,7)	15 (22,4)	52 (77,6)	
<i>Adolescentes</i>	125 (44,3)	35 (28,0)	90 (72,0)	
Sexo				0,37
<i>Feminino</i>	134 (47,5)	37 (27,6)	97 (72,4)	
<i>Masculino</i>	148 (52,5)	34 (23,0)	114 (77,0)	
Principais tumores infanto-juvenis na casuística	160 (56,7)	35 (21,9)	125 (78,1)	0,056
<i>Linfomas</i>	66 (23,4)	21 (31,8)	45 (68,2)	
<i>Leucemias</i>	34 (12,1)	2 (5,9)	32 (94,1)	
<i>Tumores do SNC</i>	29 (10,3)	5 (17,2)	24 (82,8)	
<i>Neuroblastomas</i>	20 (7,1)	4 (20,0)	16 (80,0)	
<i>Nefroblastomas</i>	11 (3,9)	3 (27,3)	8 (72,7)	
<i>Outros</i>	122 (43,3)	36 (29,5)	86 (70,5)	

*SNC: Sistema Nervoso Central*

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer - INCA. [internet] Rio de Janeiro, RJ; Ministério da saúde. 2019. [citado em 9 de Maio de 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>.
2. World Health Organization – WHO. International Agency for Research on Cancer; Cancer research Uk. [internet] World Cancer Factsheet. Cancer Research UK, London; 2014. [citado em 9 de Maio de 2021]. Disponível em: [https://www.cancerresearchuk.org/sites/default/files/cs\\_report\\_world.pdf](https://www.cancerresearchuk.org/sites/default/files/cs_report_world.pdf).
3. Sociedade Brasileira de Pediatria - SBP. [internet] Rio de Janeiro, 2019. [citado em 9 de Maio de 2021]. Disponível em: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/pdfs/doc\\_onco\\_parteIII.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/doc_onco_parteIII.pdf).
4. Dang M, Phillips PC. Pediatric Brain Tumors. Continuum (Minneapolis, Minn). 2017; 23(6, Neuro-oncology): 1727-57. Pubmed PMID: 29200119.
5. Forrest SJ, Georger B, Janeway KA. Precision medicine in pediatric oncology. Curr Opin Pediatr. 2018; 30(1): 17-24. Pubmed PMID: 29189430.
6. Ministério da Saúde – MS. [internet]. Brasília, DF; Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. Protocolo de diagnóstico precoce para oncologia pediátrica. 2017. [citado em 9 de Maio de 2021]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/17/Protocolo-deDiagnostico-Precoce-do-Cancer-Pediatrico.pdf>.
7. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. 7 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2015. 1320 p.
8. Lam CG, Howard SC, Bouffet E, Pritchard-Jones K. Science and health for all children with cancer. Science. 2019; 363(6432): 1182-6. Pubmed PMID: 30872518.
9. Knust RE, Portela MC, Pereira CCA, Fortes GB. Estimated costs of advanced lung cancer care in a public reference hospital. Rev Saúde Publ. 2017; 51: 53. Pubmed PMID: 28832754.
10. Rossini A, Simão TA, Marques CB, et al. TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil. Mutat Res. 2010; 696(1): 10-5. Pubmed PMID: 19944185.
11. Mutti CF, Cruz VG, Santos LF, Araújo D, Cogo SB, Neves ET. Clinical and epidemiological profile of children and adolescents with cancer in an oncology service. Rev Bras Cancerol. 2018; 64(3): 293-9.

12. Lambert JMR, Moshfegh A, Hainaut P, Wiman KG, Bykov VJ. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1<sup>MET</sup> induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene*. 2010; 29(9): 1329-38. Pubmed PMID: 19946333.
13. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, et al. P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*. 2013; 22(Suppl 2): S27-9. Pubmed PMID: 24074787.
14. Queiroz LB. Avaliação da expressão das proteínas p53 e prb em cacarcinoma escamocelular e papilomas orais pelo método imuno-histoquímico. Salvador: Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2006. 81p.
15. Rocha AO, Coutinho LMB, Lebouté LDP, Scholl JG. Immunohistochemical expression and prognostic value of the p53 protein in gallbladder carcinoma: a 60- case study. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40(6): 403-10.
16. Freier CP, Stiasny A, Kuhn C, et al. Immunohistochemical evaluation of the role of p53 mutation in cervical cancer: ser-20 p53-mutant correlates with better prognosis. *Anticancer Res*. 2016; 36(6): 3131-7. Pubmed PMID: 27272838.
17. Johnston WT, Erdmann F, Newton R, Steliarova-Foucher E, Schüz J, Roman E. Childhood cancer: estimating regional and global incidence. *Cancer Epidemiol*. 2021; 71(Pt B): 101662. Pubmed PMID: 31924557.
18. Shabani M, Saeedi Moghaddam S, Ataeinia B, et al. Trends of national and subnational incidence of childhood cancer groups in Iran: 1990-2016. *Front Oncol*. 2019; 9: 1428. Pubmed PMID: 31993366.
19. Williams LA, Richardson M, Marcotte EL, Poynter JN, Spector LG. Sex ratio among childhood cancers by single year of age. *Pediatr Blood Cancer*. 2019; 66(6): e27620. Pubmed PMID: 30815990.
20. Guiretti DM, Chabay PA, Valva P, et al. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. *J Med Virol*. 2007; 79(11): 1730-22. Pubmed PMID: 17854036.
21. Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, et al. p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Mol Biol Rep*. 2014; 41(3): 1871-7. Pubmed PMID: 24435975.
22. Hashmi AA, Hussain ZF, Hashmi SK et al. Immunohistochemical over expression of p53 in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and prognostic significance. *BMC Res Notes*. 2018; 11(1): 433. Pubmed PMID: 29970180.
23. Rakheja D, Khokhar S, Mitui M, Cost NG. Immunohistochemical expression of GLUT1 and its correlation with unfavorable histology and TP53 codon 72 polymorphism in Wilms tumors. *Pediatr Dev Pathol*. 2012; 15(4): 286-92. Pubmed PMID: 22483234.

24. Sâmpălean DȘ, Turcu M, Fetykó A, Bartha JR, BăȚagă SM, Turdean SG. Immunohistochemical expression of Ki-67 and p53 along with their digitalized evaluation in the discriminatory analysis of reactive atypia and dysplastic lesions in gastrointestinal biopsies of the stomach. *Rom J Morphol Embryol.* 2017; 58(1): 139-44. Pubmed PMID: 28523309.
25. Stavropoulos A, Varras M, Vasilakaki T, et al. Expression of p53 and PTEN in human primary endometrial carcinomas: clinicopathological and immunohistochemical analysis and study of their concomitant expression. *Oncol Lett.* 2019; 17(5): 4575-89. Pubmed PMID: 30944646.
26. Cai J, Du S, Wang H, et al. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(43): 74406-422. Pubmed PMID: 29088796.
27. Demir S, Boldrin E, Sun Q, et al. Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020; 105(1): 170-81. Pubmed PMID: 31073076.
28. Oh L, Hafsi H, Hainaut P, Ariffin H. p53, stem cell biology and childhood blastomas. *Curr Opin Oncol.* 2019; 31(2): 84-91. Pubmed PMID: 30585860.
29. Miller LD, Smeds J, George J, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(38): 13550-5. Pubmed PMID: 16141321.
30. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331(3): 834-42. Pubmed PMID: 15865939.
31. Garritano S, Inga A, Gemignani F, Landi S. More targets, more pathways and more clues for mutant p53. *Oncogenesis.* 2013; 2: e54. Pubmed PMID: 23817466.
32. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-243. Pubmed PMID: 25741868.
33. Vasconcelos DS, da Silva FPE, Quintana LG, et al. Numerical aberrations of chromosome 17 and TP53 in brain metastases derived from breast cancer. *Genet Mol Res.* 2013; 12(3): 2594-600. Pubmed PMID: 23315874.
34. Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016. Update. *Hum Mutat.* 2016; 37(6): 564-9. Pubmed PMID: 26931183.

35. Erdmann F, Kielkowski D, Schonfeld SJ, et al. Childhood cancer incidence patterns by race, sex and age for 2000-2006: a report from the South African National Cancer Registry. *Int J Cancer*. 2015; 136(11): 2628-39. Pubmed PMID: 25363616.
36. Gatta G, Botta L, Rossi S, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EURO CARE-5--a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014; 15(1): 35-47. Pubmed PMID: 15923571.
37. Liu Z, Yang Q, Cai N, Jin L, Zhang T, Chen X. Enigmatic differences by sex in cancer incidence: evidence from childhood cancers. *Am J Epidemiol*. 2019; 188(6): 1130-35. Pubmed PMID: 30834440.
38. Schüz J, Erdmann F. Environmental exposure and risk of childhood leukemia: an overview. *Arch Med Res*. 2016; 47(8): 607-14. Pubmed PMID: 28476188.
39. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. IICC-3 contributors. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017; 18(6): 719-31. Pubmed PMID: 28410997.
40. Stiller CA, Bayne AM, Chakrabarty A, Kenny T, Chumas P. Incidence of childhood CNS tumours in Britain and variation in rates by definition of malignant behaviour: population-based study. *BMC Cancer*. 2019; 19(1): 139. Pubmed PMID: 30744596.
41. Katanoda K, Shibata A, Matsuda T, et al. Childhood, adolescent and young adult cancer incidence in Japan in 2009-2011. *Jpn J Clin Oncol*. 2017; 47(8): 762-71. Pubmed PMID: 28541571.
42. Bainer RO, Trendowski MR, Cheng C, et al. A p53-regulated apoptotic gene signature predicts treatment response and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Manag Res*. 2017; 9: 397-410. Pubmed PMID: 28979163.
43. Ding LW, Sun QY, Tan KT et al. Mutational landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2017; 77(2): 390-400. Pubmed PMID:27872090.
44. Pope LZB, Serapião MJ, Serapião CJ et al. Pediatric glioblastoma: a clinicopathological study of 12 cases with p53 protein immunohistochemistry. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007; 65(4A): 1056-61. Pubmed PMID: 18094877.
45. Kwon MJ, Kang SY, Cho H, Lee JI, Kim ST, Suh Y-L. Clinical relevance of molecular subgrouping of gliomatosis cerebri per 2016 WHO classification: a clinicopathological study of 89 cases. *Brain Pathol*. 2020; 30(2): 235-45. Pubmed PMID: 31435963.

46. Nweke M, Ogun G, Adeleye A, Okolo CA, Adesina A. Immunohistochemical characterisation and histopathology of astrocytic neoplasms at a tertiary Nigerian hospital. *Int J Clin Pract.* 2021; 75(6): e14094. Pubmed PMID: 33619805.
47. Uppar AM, Sugur H, PrabhuraJ AR, et al. H3K27M, IDH1, and ATRX expression in pediatric GBM and their clinical and prognostic significance. *Childs Nerv Syst.* 2019;35(9):1537-45. Pubmed PMID: 31152217.
48. Cen L, Jiang Y, Chen T, Chao H, Lu X. Clinical feature and cytogenetic analysis of 28 patients with bone marrow invasion non-Hodgkin's lymphoma. *Chinese J Med Genet.* 2019; 36(5): 429-32. Pubmed PMID: 31030426.
49. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1997; 337(8): 529-34. Pubmed PMID: 9262496.
50. Klumb CE, Furtado DR, de Resende LM et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol.* 2003; 71(2): 81-90. Pubmed PMID: 12890146.
51. Magluta EPS, Klumb CE. Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: associação com mutações específicas no gene TP53? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008; 30(1): 41-6.
52. Seidinger AL, Fortes FP, Mastellaro MJ, et al. Occurrence of neuroblastoma among TP53 p.R337H carriers. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140356. Pubmed PMID: 26452166.
53. He C, Qin H, Tang H, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of the TP53 signaling pathway in Wilms' tumor. *Ann Transl Med.* 2020; 8(19): 1228. doi: 10.21037/atm-20-6047. Pubmed PMID: 33178760.
54. Wang J, Lou S, Huang X, et al. The association of miR34b/c and TP53 gene polymorphisms with Wilms tumor risk in Chinese children. *Biosci Rep.* 2020; 40(2): BSR20194202. Pubmed PMID: 32083300.
55. Lanzkowsky P, Lipton J, Fish J. *Manual of pediatric hematology and oncology.* 5 ed. Philadelphia: Academic Press. 2016. 1058 p.
56. Niederhuber J, Armitage J, Doroshow, J, Kastan M, Tepper J. *Abeloff's Clinical oncology.* 6 ed. Amsterdã: Elsevier, 2019. 2072 p.
57. Stefan DC, Galindo CR. *Pediatric hematology-oncology in countries with limited resources: a practical manual.* Berlim: Springer. 2014. 863 p.

## CONCLUSÃO

No presente estudo, pacientes com câncer infanto-juvenil no nordeste de Santa Catarina, diagnosticados no período de 2005 a 2015, foram avaliados retrospectivamente quanto a expressão do gene *TP53* via imuno-histoquímica. Nossas principais conclusões obtidas foram:

- Dos 282 casos avaliados, 71 indivíduos (25,2%) apresentaram positividade para p53.

- Os indivíduos positivos quanto a proteína p53 distribuíram-se entre 52,5% (n = 37; 27,6% de positividade) de casos femininos e 47,5% (n = 34; 23% de positividade) masculinos, sem diferença significativa.

- Quanto à idade dos pacientes, esses distribuíram-se em 45 casos (16,0%) abaixo de 2 anos (lactentes), 45 (16,0%) de 3 a 5 anos (pré-escolares), 67 (23,7%) de 6 a 11 anos (escolares) e 125 (44,3%) acima de 11 anos (adolescentes). A expressão positiva do *TP53* foi maior entre os lactentes (35,6%) e menor entre os pré-escolares (11,1%); porém, o reduzido número de indivíduos em cada faixa etária não permite afirmar com segurança a existência de uma diferença significativa.

- A maioria dos pacientes (n = 160; 56,7%) corresponderam a um dos cinco principais tipo de tumores infanto-juvenis quanto à frequência na casuística, enquanto 122 pacientes (43,3%) apresentaram outras especificações histológicas não destacadas no presente estudo. Dessa forma, na casuística detalhada no estudo, os cinco principais tumores quanto a frequência foram os linfomas (n = 66; sendo 21 Hodgkin, 42 Não Hodgkin e 3 não classificados), as leucemias (n = 34; sendo 16 leucemias linfoblásticas agudas, 14 leucemias mieloblásticas agudas, 4 não classificadas), os tumores do SNC (n = 29; sendo 21 astrocitomas, 3 meduloblastomas, 3 ependimomas e 2 retinoblastomas), os neuroblastomas (n = 20) e nefroblastomas (n = 11). A imuno-deteção da proteína p53 foi maior entre os casos de linfomas (31,8%) e menor nas leucemias (5,9%), sem diferenças significativas.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science, 2002. 1400 p.
- ANDREOTTI, V.; CIRIBILLI, Y.; MONTI, P.; et al. A p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 6, 2011.
- ARRUDA, J. T.; BORDIN, B. M.; MIRANDA, L. C. B.; et al. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 123-141, 2008.
- BAINER, R. O.; TRENDOWSKI, M. R.; CHENG, C.; et al. A p53-regulated apoptotic gene signature predicts treatment response and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Management and Research**, v. 13, n. 9, p. 397- 410, 2017.
- BANDOH, N.; HAYASHI, T.; KISHIBI, K.; et al. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 16, p. 1968-1980, 2002.
- BERTHEAU, P.; LEHMANN-CHE, J.; VARNA, M.; et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **Breast**, v. 22, n. 2, p.27- 29; 2013.
- BRENNAN, M.; MIGLIORATI, C. A.; LOCKHART, P. B et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, **Oral Radiology & Endodontics**, v. 103, p S19.e1-S19.e12; 2007.
- BYKOV, V. J. N.; ERIKSSON, S. E.; BIANCHI, J.; et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 2, p. 89-102, 2007.
- CAMARGO, B.; MELARAGNO, R. **Oncologia pediátrica** - diagnóstico e tratamento. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2013. 396 p.
- CAMARGO, B.; SANTOS, M. O.; REBELO, M. S.; et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715-720, 2010.
- CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; et al. P53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.
- CHANG, C.; CHAO, C. H.; XIA, W.; et al. p53 regulates epithelial- esenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. **Nature Cell Biology**, v.13, n. 3. 2011.
- DANG M, PHILLIPS PC. Pediatric Brain Tumors. Continuum (Minneap Minn). **Journal of Neuro-Oncology**, v. 23, n. 6, p. 1727-1757, 2017.

DEMIR S, BOLDRIN E, SUN Q, H et al., Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 170-181, 2020.

DENT, P. Non-canonical p53 signaling to promote invasion. **Cancer Biology & Teraphy**, v. 14, p. 879-880, 2013.

DEVITA, H.; ROSENBERG'S. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 11 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams& Wilkins, 2019. 2432 p.

DING LW, SUN QY, TAN KT et al. Mutational Landscape of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Research**, v. 77, n. 2, p. 390-400, 2017.

FELIPPE, J. J. **Oncologia médica - fisiopatologia e tratamento**. 1 ed. São Paulo: Sarvier. 2019. 1152 p.

FERMO, V. C.; LOURENÇATTO, G. N.; MEDEIROS, T. D. S.; et al. Early diagnosis of child cancer: the journey taken by families. **Esc Anna Nery Rev Enferm**, v. 18, n. 1, p. 54-59, 2014.

FERNANDES, M. G. M.; FERREIRA, F. V. A.; FERREIRA, S. N. H.; et al. MIB 1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 29-37, 2002.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2010. 770 p.  
FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002 .

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

FORREST, S. J.; GEOERGER, B.; JANEWAY, K. A. Precision medicine in pediatric oncology. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 30, n. 1, p. 17-24, 2018.

GARAY, H. M.; ALVES, J.; OCHIUCCI, J. M.; et al. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 60-70, 2003.

GARRITANO, S.; INGA, A.; GEMIGNANI, F.; et al. More targets, more pathways and more clues for mutant p53. **Oncogenesis**, v. 1, n. 7, p. 1-7, 2013.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. P53 and human cancer: the first thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, v. 77, p 81-137. 2000.

HAINAUT, P.; OLIVIER, M.; EELES, R.; et al. The IARC TP53 Database: New Online Mutation Analysis and Recommendations to User. **Human Mutation**, v. 19, p. 607-614, 2002.

HAINAUT, P.; WIMAN, K. G.; BYKOV, V. J.; et al. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. **Oncogene**, v. 29, n. 9, p. 1329-1338; 2010.

HALL, P. A.; LANE, D. P. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? **The Journal of Pathology**, v. 166, p. 329-330, 1992.

HALL, P. A.; MCCLUGGAGE, W. G. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. **The Journal of Pathology**, v. 208, p. 1-6, 2006.

HARRIS, C. C.; WESTON, A.; WILLEY, JC.; et al. Biochemical and molecular epidemiology of human cancer: Indicators of carcinogen exposure, DNA damage, and genetic predisposition. **Environmental Health Perspectives**, v. 75; p. 109-119, 1987.

HARRIS, M. H.; CZUCHLEWSKI, D. R.; ARBER, D. A.; et al. Genetic Testing in the Diagnosis and Biology of Acute Leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 152, n.3, p. 322-346, 2019.

HE C, QIN H, TANG H, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of the TP53 signaling pathway in Wilms' tumor. **Annals of Translation Medicine**, v. 8, n. 19, 1228, 2020.

HEMANN, M. T.; LOWE, S. W. P53 Links Tumor Development to Cancer Therapy. In: HAINAUT, P.; WIMAN, K. G. (Eds.) **25 Years of p53 Research**. Springer, Dordrecht. 2007. 339-351 pp.

HOCK, A. K.; CARTER, S.; VIGNERON, A.; et al. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 24, p. 4921-4930, 2011.

HOLLSTEIN, M. C.; SIDRANSKI, D.; VOGELSTEIN, B.; et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, p. 49-53, 1991.

ICHIKAWA, A.; KINOSHITA, T.; WATANABE, T.; et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 8, p. 529-534, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE**. Informações do PIB. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/pib.php>. Acesso em: 5 jan. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA**. Rio de Janeiro, 2019. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/Instituto Nacional de Câncer. - Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.: Il.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA**. Rio de Janeiro, 2019. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade./Instituto Nacional de Câncer. - Rio de Janeiro: INCA, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 18 jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/ministerio-da-saude-alerta-responsaveis-e-profissionais-de-saude-para-o-cancer-em-criancas>. Acesso em: 08 dez. 2020.

ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D. Medicina Interna, **Nueva Editorial Interamericana**, p. 498-500, 1995.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. **Annual Review of Biochemistry**, v. 2, n. 85, p. 375-404, 2016.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2002.

JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genetics**, v. 21, p. 163-167, 1999.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; et al. **Genética Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 297 p.

JURACH, M. T.; MEURER, L.; MOREIRA, L. F. Expression of the p53 protein and clinical and pathologic correlation in adenocarcinoma of the rectum. **The Archives of Gastroenterology**, v. 43, p. 14-19, 2006.

KAWAMURA, M. DNA circulante em paciente com câncer. **Germinis - Boletim Informativo Conselho Federal de Biologia**. 1999. 2, 8.

KLUMB, C. E.; CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 111-125, 2002.

KNUST, R. E.; PORTELA, M. C.; PEREIRA, C. C. A.; et al. Estimativa dos custos da assistência do câncer de pulmão avançado em hospital público de referência. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

KWON, M. J.; KANG, S. Y.; CHO, H.; et al. Clinical relevance of molecular subgrouping of gliomatosis cerebri per 2016 WHO classification: a clinicopathological study of 89 cases. **Brain Pathology**, v. 30, n. 2, p. 235-245, 2020.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 8, n. 359, p. 486-487, 1992.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. **Nature**, v. 278, p. 261-263, 1979.

LANZKOWSKY, P.; LIPTON, J.; FISH, J. **Manual of Pediatric Hematology and Oncology**. 5 ed. Philadelphia: Academic Press. 2016. 1058 p.

LEMOES, J. A. R. **Efeitos das mutações do gene supressor de tumor p53 na leucemogênese**. Sociedade Brasileira de Genética, Revisão (Monografia da Faculdade de Medicina) - USP, Ribeirão Preto, 1995. v. 2.

LEVINE, A. J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3: p 323-31, 1997.

LEVINE, A. J. The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. **Virology**, v. 177, n. 2, p. 419-426, 1990.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumour supressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991.

LIU, Z.; YANG, Q.; CAI, N.; et al. Enigmatic differences by sex in cancer incidence: Evidence from childhood cancers. **Americal Journal of Epidemiology**, v. 188, n. 6, p. 1130-1135, 2019.

MAGLUTA, E. P. S.; KLUMB, C. E. Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: associação com mutações específicas no gene TP53?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, n. 1, p. 41-46, 2008.

MARQUES C.B. TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil. **Mutation Research**, v. 696, n. 1, p. 10-15, 2010.

MARQUES CLTQ. **Oncologia: Uma abordagem multidisciplinar**. 1 ed. São Bento do Sul: Carpe Diem, 2016. 1459 p.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; JORDAN, J. J.; et al. Changing the p53 master regulatory network: Elementary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2191-2201, 2007.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M. A. The expanding universe of p53 targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 724-737, 2009.

MILLER, L. D.; SMEDS, J.; GEORGE, J.; et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13550-13555, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Protocolo de diagnóstico precoce para oncologia pediátrica**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/17/Protocolo-deDiagnostico-Precoce-do-Cancer-Pediatico.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde. MS**, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: INCA, 2006.

MONDAL, R.; SARKAR, S. **Essential Pediatric Oncology**. 1 ed. Nova Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015. 320 p.

MUTTI, C. F.; CRUZ, V. G.; SANTOS, L. F.; et al. Perfil clínico-epidemiológico de crianças e adolescentes com câncer em um serviço de oncologia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 3, p. 293-300, 2018.

NAG, S.; QIN, J.; SRIVENUGOPAL, K. S.; et al. The MDM2-p53 pathway revisited. **The Journal of Biomedical Research**, v. 27, p. 254-271, 2013.

NIEDERHUBER J, ARMITAGE J, DOROSHOW, J, et al. **Abeloff's Clinical Oncology**. 6 ed. Amsterdã: Elsevier, 2019. 2072 p.

NWEKE, M.; OGUN, G.; ADELEYE, A.; et al. Immunohistochemical characterisation and histopathology of astrocytic neoplasms at a tertiary Nigerian hospital. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 6, e14094, 2021.

NYLANDER, K.; DABEISTEEN, E.; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, p. 413-25, 2000.

OH, L.; HAFSI, H.; HAINAUT, P.; et al. p53, stem cell biology and childhood blastomas. **Current Opinion in Oncology**, v. 31, n. 2, p. 84-91, 2019.

OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations patterns in breast cancer: searching for clues of environmental carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11: p. 353-60. 2001.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation*, **Oxford**, v. 10, n. 4, p. 431-442, 2003.

OSBORNE, R. J.; HAMSHERE, M. G. A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 3706-3712, 2000.

PAMPALONA, J.; FRÍAS, C.; GENESCÀ, A.; et al. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 4, p. e1002679, 2012.

PASKULIN, D. D.; FRAGA, L.R.; DUTRA, C. G.; et al. P53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 3, p. 1871-1877, 2014.

PASKULIN, D. D.; PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R.; HAINAUT, P.; BORTOLINI, M. C.; Ashton-Prolla, P. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 939-946, 2012.

PEREIRA, A. A. **A prevenção do câncer de mama na atenção primária à saúde no Brasil** – uma revisão narrativa do tema no período de 1990 a 2017. / Adriana Alves Pereira. - Rio de Janeiro, 2019.

PIETSCH, E. C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M. E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v. 25, n. 11, p. 1602-1611, 2006.

PIMENTA V. S. C., PRADO Y. C. L., SILVA D. R.; et al. Papel da proteína p53 na proliferação neoplásica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n.17; p. 1992, 2013.

PINHO, M. S. L. **Biologia molecular do câncer: fundamentos para a prática médica**. 1st ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 248 p.

PINTO, F. N.; PRUDENTE, F. V. B.; GONÇALVES, M. S.; et al. Mutação do gene p53 induzindo predisposição hereditária ao câncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. **Revista de Medicina**, v. 81, n. ¼, p. 42-6, jan./dez. 2002.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2015. 1320 p.

PLUQUET, O. E.; HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Letters**, v. 174, n. 1, p. 1-15, 2001.

POPE, L. Z. B.; SERAPIÃO, M. J.; SERAPIÃO, C. J.; et al. Pediatric glioblastoma: a clinicopathological study of 12 cases with p53 protein immunohistochemistry. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 4, p. 1056-1061, 2007.

QUEIROZ, L. B.; Avaliação da expressão das proteínas p53 e prb em cacarcinoma escamocelular e papilomas orais pelo método imuno-histoquímico. **Universidade Federal da Bahia**. Instituto de ciências da saúde programa de pós-graduação em imunologia, 2006.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105-111, 2001.

RIBEIRO, J. R. U.; SAFATLE-RIBEIRO, A. V. p53 in clinical contexts: yes or not? **The Archives of. Gastroenterology**, v. 43, n. 1, p. 6-7, 2006.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E.; et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2. 179-184, 2001.

ROCHA, A. O.; COUTINHO, L. M. B.; LEBOUTE, L. D. P.; et al. Immunohistochemical expression and prognostic value of the p53 protein in gallbladder carcinoma: a 60-case study. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 403-410, 2004.

SCHMITT, C. A.; FRIDMAN, J. S.; YANG, M.; et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 335-346, 2002.

SEIDINGER, A. L.; FORTES, F. P.; MASTELLARO, M. J.; et al. Occurrence of Neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. **PLoS One**, v. 10, n. 10, e0140356, 2015.

SHAHBAZI, J.; LOCK, R.; LIU, T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. 80, 2013.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. HPV e câncer: o papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 48-54, 2003.

SIMON, S. D. A biologia molecular aplicada ao diagnóstico e tratamento do câncer. **Diálogo Científico**, v.1, n. 3, p.18-22, 2004.

Sociedade Brasileira de Pediatria - **SBP**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/pdfs/doc\\_onco\\_parteIII.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/doc_onco_parteIII.pdf). Acesso em: 18 jun 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **SBP**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/pdfs/doc\\_onco\\_partei.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/doc_onco_partei.pdf). Acesso em: 18 jun. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **SBP**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/pdfs/doc\\_onco\\_parteIII.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/doc_onco_parteIII.pdf). Acesso em: 11 dez. 2020.

SOUSSI, T.; LOZANO, G. p53 mutation heterogeneity in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 3, p. 834-842, 2005.

STEFAN, D. C.; GALINDO, C. R. **Pediatric Hematology-Oncology in Countries with Limited Resources: A Practical Manual**. Berlim: Springer. 2014. 863 p.

TAMBER, M. S.; RUTKA, J. Pediatric supratentorial high-grade glioma. **Journal of Neurosurgery**, v. 14, n. 2, p. 1-8, 2003.

UPPAR, A. M.; SUGUR, H.; PRABHURAJ, A. R.; et al. H3K27M, IDH1, and ATRX expression in pediatric GBM and their clinical and prognostic significance. **Child's Nervous System**, v. 35, n. 9, p. 1537-1545, 2019.

VOGELSTEIN, B.; FEARON, E. R.; HAMILTON, S. R.; et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New England Journal of Medicine**, v.319, p. 525-532, 1988.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOGT, U.; ZACZEK, A.; KLINKE, F.; et al. P53 Gene status in relation to ex vivo chemosensitivity of non-small cell lung cancer. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 128, p. 141-147, 2002.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

WANG, F.; MARSHALL, C. B.; YAMAMOTO, K.; et al. Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 3, p. 590-603, 2008.

WANG, J.; LOU, S.; HUANG, X.; et al. The association of miR34b/c and TP53 gene polymorphisms with Wilms tumor risk in Chinese children. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 2, 2020.

WANG, L.; KIRSCHMEIER, P.; WU, Q.; et al. Analysis of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43604-43610, 2001.

WHYTE, D. A.; BROTON, C. E.; SHILLITOE, E. J. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53? **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31 n. 3, p. 125-33, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer; Cancer research Uk. **World Cancer Factsheet**. Cancer Research UK, London; 2014. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home> Acesso em: 26 de junho. 2021.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

YAMAGUCHI, K.; SUGANO, K.; FUKAYAMA, N.; et al. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 307-312, 1997.

YAMAGUCHI, T.; SHINDOH, M.; AMEMIYA, A.; et al. Detection of Human Papillomavirus Type 2 Related Sequence in Oral Papilloma. **Analytical Cellular Pathology**, v. 16, p. 125-130, 1998.

ZAMBETTI, G. P. **More on p53 in Pediatric Cancers: p53**. Disponível em: [https://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars\\_list/seminar\\_detail/?pts\\_id=2242](https://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars_list/seminar_detail/?pts_id=2242). Acesso em: 20 out. 2019.

## ANEXOS

### Anexo 1: Parecer da aprovação Comitê de Ética em Pesquisa.

	<b>UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE UNIVILLE</b>	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>		
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>		
<b>Título da Pesquisa:</b> AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO P53 NA POPULAÇÃO COM CANCER INFANTO-JUVENIL NO NORTE DE SANTA CATARINA		
<b>Pesquisador:</b> HUGO MARTINS DE OLIVEIRA		
<b>Área Temática:</b>		
<b>Versão:</b> 2		
<b>CAAE:</b> 19870219.1.0000.5366		
<b>Instituição Proponente:</b> FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE		
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio		
<b>DADOS DO PARECER</b>		
<b>Número do Parecer:</b> 3.619.240		
<b>Apresentação do Projeto:</b> Consta no Parecer Substanciado do CEP - Número 3.580.468 emitido em 17 de Setembro de 2019.		
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Consta no Parecer Substanciado do CEP - Número 3.580.468 emitido em 17 de Setembro de 2019.		
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Consta no Parecer Substanciado do CEP - Número 3.580.468 emitido em 17 de Setembro de 2019.		
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Consta no Parecer Substanciado do CEP - Número 3.580.468 emitido em 17 de Setembro de 2019, contudo, a informação sobre a guarda e posse do material está de acordo com a Resolução 466/12.		
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Consta no Parecer Substanciado do CEP - Número 3.580.468 emitido em 17 de Setembro de 2019, no entanto, as pendências foram respondidas. A folha de rosto foi enviada e está de acordo.		
<b>Recomendações:</b> Ao finalizar a pesquisa, o (a) pesquisador (a) responsável deve enviar ao Comitê de Ética, por meio		
<b>Endereço:</b> Rua Paulo Malechitzki, nº 10, Bloco B, Sala 119, campus Bom Retiro		
<b>Bairro:</b> Zona Industrial <b>CEP:</b> 89.219-710		
<b>UF:</b> SC <b>Município:</b> JOINVILLE		
<b>Telefone:</b> (47)3461-0235 <b>E-mail:</b> cometica@univille.br		



Continuação do Parecer: 3.619.249

do sistema Plataforma Brasil, o Relatório Final (modelo de documento na página do CEP no site da Univille Universidade).

Segundo a Resolução 466/12, no item

**XI- DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

d) Elaborar e apresentar o relatório final;

Modelo de relatório para download na página do CEP no site da Univille Universidade.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto "AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO P53 NA POPULAÇÃO COM CANCER INFANTO-JUVENIL NO NORTE DE SANTA CATARINA", sob CAAE "19870219.1.0000.5366" teve suas pendências esclarecidas pelo (a) pesquisador(a) "HUGO MARTINS DE OLIVEIRA", de acordo com a Resolução CNS 466/12 e complementares, portanto, encontra-se APROVADO.

Informamos que após leitura deste parecer, é imprescindível a leitura do item "O Parecer do CEP" na página do Comitê no site da Univille, pois os procedimentos seguintes, no que se refere ao enquadramento do protocolo, estão disponíveis na página. Segue o link de acesso [https://www.univille.edu.br/pt\\_br/institucional/proreitorias/prppg/setores/coordenacao\\_pesquisa/comite\\_etica\\_pesquisa/status-parecer/645062](https://www.univille.edu.br/pt_br/institucional/proreitorias/prppg/setores/coordenacao_pesquisa/comite_etica_pesquisa/status-parecer/645062).

**Considerações Finais e critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville - Univille, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO 1410748.pdf	20/09/2019 08:16:04		Aceito

**Endereço:** Rua Paulo Malchitzki, nº 10, Bloco B, Sala 119, campus Bom Retiro  
**Bairro:** Zona Industrial **CEP:** 89.219-710  
**UF:** SC **Município:** JOINVILLE  
**Telefone:** (47)3461-9235 **E-mail:** comitetic@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO  
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 3.619.260

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoocorrigido.pdf	20/09/2019 08:13:43	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoalterado.pdf	20/09/2019 08:13:25	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	20/09/2019 08:08:19	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folha1.pdf	20/09/2019 08:06:40	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	29/08/2019 08:57:57	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo.pdf	29/08/2019 08:33:06	HUGO MARTINS DE OLIVEIRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Anexo 2:** Carta de anuência (CEDAP) para autorização de acesso aos dados.

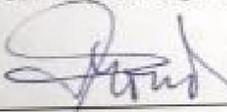
**TERMO DE ANUÊNCIA**

Sr. Hugo Martins de Oliveira

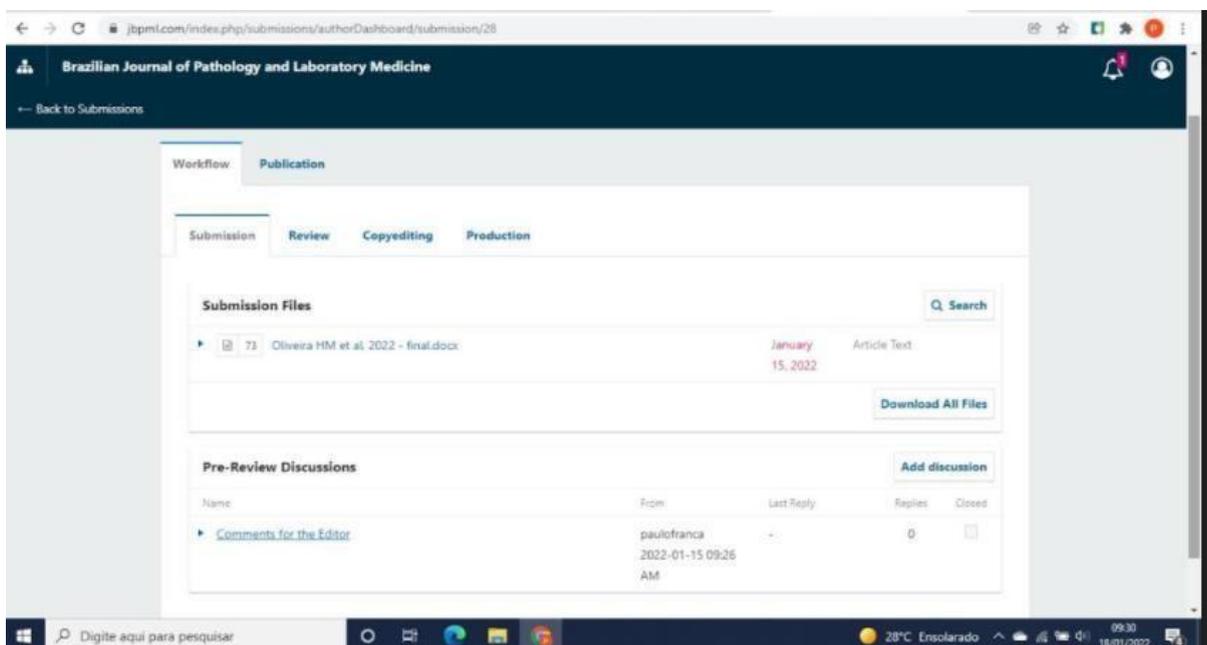
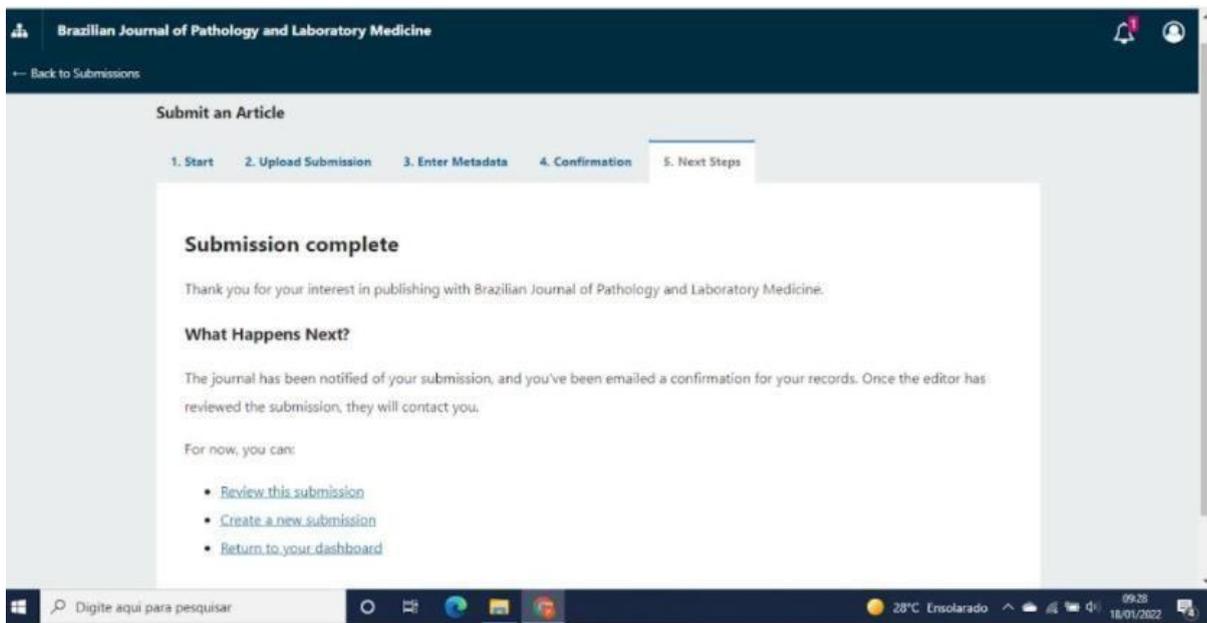
Declaramos para os devidos fins que nós do Centro de Diagnósticos Anátomo Patológicos de Joinville – CEDAP, sob CNPJ nº 01.046.691/0001-27, localizado em Joinville/SC, estamos de acordo com a execução do projeto de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE intitulado "AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO P53 NA POPULAÇÃO COM CANCER INFANTO-JUVENIL NO NORTE DE SANTA CATARINA", sob a condução do pesquisador Hugo Martins de Oliveira e orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do UNIVILLE.

Estamos cientes que não haverá participantes de pesquisa envolvidos diretamente no estudo e a identificação dos pacientes será realizada através de codificação definida exclusivamente para a pesquisa. A identidade de cada indivíduo deverá ser mantida em absoluto sigilo e todos os preceitos éticos e requisitos dispostos na Resolução CNS 466/2012 e complementares, serão estritamente observados pelos pesquisadores.

Joinville, 20 de agosto de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hercilio Fronza Junior.  
Diretor Técnico

### Anexo 3: Comprovante de submissão no periódico Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (ISSN 1676-2444)



## Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 24/01/2022.

1. Identificação do material bibliográfico: ( ) Tese ( x ) Dissertação ( ) Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: HUGO MARTINS DE OLIVEIRA

Orientador: Paulo Henrique Condeixa de França.

Data de Defesa: 28 DE JULHO DE 2021

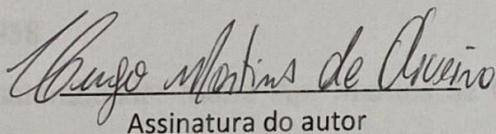
Título: Avaliação da Expressão do Gene TP53 na População com Câncer Infanto-Juvenil no Nordeste de Santa Catarina

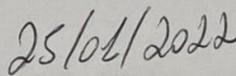
Instituição de Defesa: (UNIVILLE)

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral ( X ) Sim ( ) Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.

  
Assinatura do autor



Local/Data

