

Pontifícia Universidade Católica De Goiás
Escola De Ciências Médicas e da Vida
Departamento De Medicina
Trabalho de Conclusão de Curso



**RADIORRESISTÊNCIA TUMORAL DO CÂNCER DE MAMA
RELACIONADA A MUTAÇÕES NO GENE TP53 ABORDADA POR
DIFERENTES METODOLOGIAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Gabriel Mota Nascimento
Pedro Afonso Marques Gonçalves
Juliana Castro Dourado Pinezi

Goiânia

2022

RESUMO

Em resposta ao dano ao DNA induzido por irradiação, a ativação dos pontos de verificação do ciclo celular resulta na parada do ciclo, permitindo tempo para o reparo do DNA. Este artigo analisa o impacto de diferentes metodologias em estudos sobre os efeitos da radiação em células tumorais com mutante TP53 no câncer de mama. Um total de 420 artigos foram localizados de 1993 a 7 de fevereiro de 2022. Dos 21 trabalhos, um utilizou citometria de fluxo e outro imunohistoquímica associada a western blotting. Um artigo apresentou resultados inconclusivos quanto a influência do genótipo do TP53 na radiorresistência tumoral porque na sua metodologia não houve o confronto estatístico dos subgrupos com e sem mutação. Excluindo esses três artigos, 8 utilizaram sequenciamento de DNA como parte de sua metodologia e 10 utilizaram apenas imunohistoquímica. Foi encontrada uma grande diferença no resultado percentual quanto a capacidade do estudo de evidenciar que a radiorresistência tumoral do câncer de mama está relacionada a mutações no gene TP53 entre os trabalhos que utilizaram sequenciamento de DNA como parte de sua metodologia e os que utilizaram apenas imunohistoquímica, contudo a análise estatística não comprovou esta diferença, embora a pequena amostra desta revisão possa ser a responsável pela falta de significância estatística. De modo que sugerimos que revisões com maior amostra sejam realizadas para comprovar que a imunohistoquímica é muito inferior ao sequenciamento de DNA a ponto de comprometer os resultados encontrados em estudos de radiogenômica.

Palavras-chave: câncer de mama, TP53, radiosensibilidade, radioterapia, radiogenômica

1. INTRODUÇÃO

Em uma prática geral de radioterapia, o câncer de mama (CM) geralmente compreende aproximadamente 25% do total de pacientes tratados [1]. Yan e cols. [2] afirmaram que, em resposta ao dano ao DNA induzido pela irradiação gama, a ativação dos checkpoints do ciclo celular resulta na parada do ciclo celular, permitindo tempo para o reparo do DNA antes da reentrada no ciclo celular. As células humanas contêm pontos de verificação em G1 e G2. Embora o checkpoint G1 não seja eficaz na maioria das células cancerígenas, geralmente devido a mutações e/ou alterações nos principais reguladores do checkpoint G1 (por exemplo, p53, Ciclina D), o checkpoint G2 raramente é prejudicado nas células cancerígenas. A ativação do ponto de verificação em G2 envolve a ativação de proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada) e ATR (relacionadas a rad3), levando à inibição da quinase CDC2 e subsequente parada do ciclo celular em G2/M. Em resposta à irradiação ionizante, os checkpoints do ciclo celular são ativados rapidamente, resultando na parada do ciclo, permitindo tempo para reparar os danos ou resultando na indução de apoptose para eliminar células desreguladas [2,3]. Fernández-Aroca e cols. [4] argumentaram que a presença de uma proteína p53 funcional é um requisito crítico para a radiosensibilidade associada ao medicamento Palbociclibe.

Muitos autores descrevem o gene TP53 como um gene supressor de tumor que tem sido chamado de guardião do genoma [5-8]. Shajani-Yi e cols. [9] apud Savli e cols. [10] afirmaram que o TP53 é um gene supressor de tumor envolvido no reparo do DNA, metabolismo, parada do ciclo celular, apoptose e senescência. Lazzari e cols. [6] afirmaram que o gene está envolvido na maquinaria de reparo de danos no DNA após irradiação ionizante e, conseqüentemente, na radiosensibilidade alterada.

Uma variação da sequência de DNA que afeta apenas um nucleotídeo é classificada como um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), e essas variações estão associadas à função alterada da p53 e a um risco aumentado de câncer, progressão rápida ou resposta alterada a tratamentos [6]. Dahabreh e cols. [11] apud Huszno e cols. [12] relataram que o SNP mais frequente é uma variação G/C na segunda posição do códon 72 no exon 4 (SNP72; rs1042522), levando a variantes da proteína Arg72 ou Pro72, que desempenham funções em vários tipos de câncer.

Em termos de mutações, alguns autores afirmam que mutações no gene TP53 levam à produção de uma proteína não funcional que não é capaz de se ligar efetivamente ao DNA, resultando na falha dos mecanismos de reparo do DNA e, posteriormente, na proliferação anormal dessas células mutantes, e isso seria consistente com o fato de que as linhagens celulares com p53 mutante têm demonstrado historicamente ser mais radorresistentes do que as células com p53 do tipo selvagem [5,6,13]. Portanto, McIlwrath e cols. [14] apud Schütze e cols. [15] observaram que o aumento da agressividade do câncer está associado à perda da função da proteína p53 e que a quimio e a radorresistência já foram correlacionadas com proteínas p53 deletadas ou mutadas; assim, a avaliação molecular precisa do status da proteína p53 pode ser usada para estratificar os pacientes, que podem responder a terapias adicionais, como radioterapia, levando a um melhor prognóstico.

Muitos autores afirmam que mutações no gene TP53 foram associadas a uma resposta diminuída à radioterapia [14,16-18]. Como exemplo, Wu e cols. [20] apud Schon e cols. [8] estimaram que as chances de sobrevida livre de câncer para mulheres portadoras da mutação TP53 eram 65,2, 33,0 e 2,9% nas idades de 30, 45 e 60 anos, respectivamente. No entanto, uma meta-análise produzida por Yang e cols. [21] apud Nguyen e cols. [22] revelaram uma associação entre alterações de p53 (superexpressão e mutações) e piora da sobrevida global, mas não sobrevida livre de recorrência no câncer de mama.

Em relação aos métodos de identificação de mutação em p53, a imuno-histoquímica (IHQ) é um deles, e utiliza a interação antígeno-anticorpo para localizar tecidos biológicos específicos. Há duas formas de se obter a reação antígeno-anticorpo: a IHQ direta e a IHQ indireta. Na IHQ direta, um anticorpo marcado reage diretamente com o antígeno tecidual, enquanto na IHQ indireta, há a participação de um anticorpo não marcado (reage com o antígeno) e um anticorpo marcado (reage com o anticorpo não marcado). A IHQ é uma das metodologias que avaliam o acúmulo da proteína p53, que é um indicativo indireto da presença da mutação no gene TP53.

2. METODOLOGIA

O objetivo geral do presente estudo é analisar o impacto de diferentes metodologias em estudos sobre os efeitos da radiação em células tumorais com mutante TP53 no câncer de mama.

Como estratégia de busca inicial, os termos utilizados na busca sistemática na base de dados PubMed, sem restrição de campos específicos, de artigos a partir de setembro de 2011, foram: (TP53 OR p53) AND (mutation OR status) AND ("câncer de mama" OR "tumor de mama") E (radiação OR radioterapia).

A questão a ser respondida com a revisão sistemática narrativa da literatura foi definida como: diferentes metodologias em estudos sobre os efeitos da radiação em células tumorais com mutante TP53 no câncer de mama podem impactar nos resultados encontrados?

Como não houve revisão sistemática do tema entre os artigos desse período, que seria atualizada caso existisse, todos os artigos publicados na base PubMed foram incluídos sem restrição de data. Foram localizados 420 artigos até 7 de fevereiro de 2022, sendo o mais antigo do ano de 1993. Os 420 artigos resultantes da busca na base de dados foram avaliados quanto ao tema abordado por seus autores, e houve concordância entre os dois pesquisadores em a inclusão de 50 artigos por terem um tema relacionado a esta revisão sistemática e a concordância entre os dois pesquisadores na não inclusão de 281 artigos por serem de temas diferentes. Os 89 artigos de discordância foram discutidos com o orientador, com a inclusão de outros 38 artigos e a não inclusão de 51 artigos, totalizando 88 artigos incluídos.

Na etapa seguinte de avaliação, os 88 artigos foram avaliados quanto aos critérios de inclusão e exclusão desta revisão sistemática. Após essa avaliação dos critérios, outros 56 artigos foram excluídos. Dos 32 artigos restantes, 11 artigos adicionais foram excluídos por motivos alheios aos critérios de inclusão e exclusão, como metodologia.

Os critérios de inclusão utilizados para selecionar os artigos para a revisão sistemática narrativa da literatura foram: os estudos científicos podem ser observacionais ou experimentais, desde que haja exposição (radioterapia para o tratamento da doença); estudos que avaliam a resposta à radioterapia (pré-operatória, adjuvante ou in vitro) de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento do câncer de mama; estudos que analisam o genótipo do tumor em relação à existência de mutações no gene TP53; e artigos publicados em inglês ou português.

Os critérios de exclusão utilizados durante a seleção dos artigos para a revisão sistemática narrativa da literatura foram: estudos que não especificaram qual mutação foi encontrada nas células tumorais dos pacientes; estudos que não especificam a resposta do tumor de mama/célula tumoral à radiação; e metodologia do estudo incompatível com os resultados encontrados.

3. RESULTADOS

Nos trabalhos incluídos nesta revisão diferentes metodologias de avaliação do status do gene TP53 foram utilizadas: sequenciamento de DNA, western blotting, citometria de fluxo e imunohistoquímica com diferentes anticorpos (BP53-12-1, E26, DO-1 MoAb, DO7 MoAb, PAb1801 e PAb240).

O sequenciamento de DNA é o padrão-ouro para que seja determinado o genótipo do gene confirmando a presença ou não de variantes genéticas de significado incerto, variantes provavelmente patogênicas e variantes patogênicas, contudo por se tratar de um método de custo mais alto nem sempre é o empregado nos artigos.

Quanto a técnica de western blotting, a transferência de proteínas ou ácidos nucleicos para membranas microporosas é chamada de “blotting” e as proteínas que são resolvidas em géis de eletroforese são normalmente transferidas para suportes de membrana adsorvente sob a influência de uma corrente elétrica em um procedimento conhecido como western blotting [46].

Em relação à citometria de fluxo, trata-se de uma tecnologia que fornece análise multiparamétrica rápida de células individuais em solução [47]. Os citômetros de fluxo utilizam lasers como fontes de luz para produzir sinais de luz dispersos e fluorescentes que são lidos por detectores como fotodiodos ou tubos fotomultiplicadores [47]. Esses sinais são convertidos em sinais eletrônicos que são analisados por um computador e gravados em um arquivo de dados de formato padronizado (.fcs) e as populações celulares podem ser analisadas e/ou purificadas com base em suas características fluorescentes ou de dispersão de luz [47].

Sobre a imunohistoquímica (IHC), esta uma técnica que explora a ligação específica entre um anticorpo e um antígeno para detectar e localizar antígenos específicos em células e tecidos, mais comumente detectados e examinados com o microscópio de luz [48].

Dos 21 trabalhos, um utilizou citometria de fluxo e outro imunohistoquímica associada a western blotting. Um artigo apresentou resultados inconclusivos quanto a influência do genótipo do TP53 na radiorresistência tumoral porque na sua metodologia não houve o confronto estatístico dos subgrupos com e sem mutação. Excluindo esses três artigos, 8

utilizaram sequenciamento de DNA como parte de sua metodologia e 10 utilizaram apenas imunohistoquímica. Avaliando esses 18 artigos, 50% dos artigos que utilizaram apenas imunohistoquímica evidenciaram resultados positivos indicando que a mutação do TP53 aumenta a radiorresistência tumoral e 87,5% dos artigos que utilizaram sequenciamento de DNA como parte de sua metodologia evidenciaram resultados positivos indicando que a mutação do TP53 aumenta a radiorresistência tumoral ($p=0,152$). Apesar da diferença encontrada no resultado absoluto, a análise estatística não comprovou esta diferença, embora a pequena amostra possa ser a responsável pela falta de significância estatística.

4. CONCLUSÃO

Foi encontrada uma grande diferença no resultado percentual quanto a capacidade do estudo de evidenciar que a radiorresistência tumoral do câncer de mama está relacionada a mutações no gene TP53 entre os trabalhos que utilizaram sequenciamento de DNA como parte de sua metodologia e os que utilizaram apenas imunohistoquímica, contudo a análise estatística não comprovou esta diferença, embora a pequena amostra desta revisão possa ser a responsável pela falta de significância estatística. De modo que sugerimos que revisões com maior amostra sejam realizadas para comprovar que a imunohistoquímica é muito inferior ao sequenciamento de DNA a ponto de comprometer os resultados encontrados em estudos de radiogenômica.

5. REFERÊNCIAS

1. Haffty BG, Buchholz TA, Perez, CA. Early Stage Breast Cancer. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 1175.
2. Yan Y, Hein AL, Greer PM, Wang Z, Kolb RH, Batra SK, Cowan KH. A novel function of HER2/Neu in the activation of G2/M checkpoint in response to γ -irradiation. *Oncogene*. 2015 Apr 23;34(17):2215-26. doi: 10.1038/onc.2014.167. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909175; PMCID: PMC4362969.
3. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2004; 14:11. [PubMed: 15108799]
4. Fernández-Aroca DM, Roche O, Sabater S, Pascual-Serra R, Ortega- Muelas M, Sánchez Pérez I, Belandia B, Ruiz-Hidalgo MJ, Sánchez- Prieto R. P53 pathway is a major determinant in the radiosensitizing effect of Palbociclib: Implication in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2019 Jun 1; 451:23-33. doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.049. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30872077.
5. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007; 26:2157–2165. doi: 10.1038/sj.onc.1210302

6. Lazzari G, Buono G, Zannino B, Silvano G. Breast Cancer Adjuvant Radiotherapy in BRCA1/2, TP53, ATM Genes Mutations: Are There Solved Issues? *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2021 May 12; 13:299-310. doi: 10.2147/BCTT.S306075. PMID: 34012291; PMCID: PMC8126701
7. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C et al (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502(7471):333–339
8. Schon K, Tischkowitz M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Jan;167(2):417- 423. doi: 10.1007/s10549-017-4531-y. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29039119; PMCID: PMC5790840.
9. Shajani-Yi, Z., de Abreu, F.B., Peterson, J.D., Tsongalis, G.J., 2018. Frequency of somatic TP53 mutations in combination with known pathogenic mutations in Colon adenocarcinoma, non–Small cell lung carcinoma, and gliomas as identified by next-generation sequencing. *Neoplasia* 20 (3), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.12.005>
10. Savli H, Sertdemir N, Aydin D, Dursun B, Kurtas O, Reka S, Sunnetci- Akkoyunlu D, Eren-Keskin S, Uygun K, Ozden E, Isik U, Cabuk D, Demir G, Guzdolu E, Gokbayrak M, Aksu MG, Canturk NZ, Cine N. TP53, EGFR and PIK3CA gene variations observed as prominent biomarkers in breast and lung cancer by plasma cell-free DNA genomic testing. *J Biotechnol.* 2019 Jul 20; 300:87-93. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.005. Epub 2019 May 14. PMID: 31100334.
11. Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S and Trikalinos TA: Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: A systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 177: 1317-1325, 2013.
12. Huszno J, Grzybowska E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2018 Jul;16(1):34-40. doi: 10.3892/ol.2018.8627. Epub 2018 May 3. PMID: 29928384; PMCID: PMC6006469.
13. Chakradeo S, Sharma K, Alhaddad A, Bakhshwin D, Le N, Harada H, Nakajima W, Yeudall WA, Torti SV, Torti FM, Gewirtz DA. Yet another function of p53—the switch that determines whether radiation- induced autophagy will be cytoprotective or nonprotective: implications for autophagy inhibition as a therapeutic strategy. *Mol Pharmacol.* 2015 May;87(5):803-14. doi: 10.1124/mol.114.095273. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25667224; PMCID: PMC4407732.
14. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, et al. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.* 1994; 54:3718–3722.
15. Schütze A, Vogeley C, Gorges T, Twarock S, Butschan J, Babayan A, Klein D, Knauer SK, Metzen E, Müller V, Jendrossek V, Pantel K, Milde- Langosch K, Fischer JW, Röck K. RHAMM splice variants confer radiosensitivity in human breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2016 Apr 19;7(16):21428-40. doi: 10.18632/oncotarget.7258. PMID: 26870892; PMCID: PMC5008296.

16. Hematulin A, Sagan D, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Wongkham S (2014) Association between cellular radiosensitivity and G1/G2 checkpoint proficiencies in human cholangiocarcinoma cell lines. *Int J Oncol* 45(3):1159–1166.
17. Kandioler D, Zwrtek R, Ludwig C, Janschek E, Ploner M, Hofbauer F, Kuhrer I, Kappel S, Wrba F, Horvath M, Karner J, Renner K, Bergmann M, Karner-Hanusch J, Potter R, Jakesz R, Teleky B, Herbst F (2002) TP53 genotype but not p53 immunohistochemical result predicts response to preoperative shortterm radiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg* 235(4):493–498
18. Kappel S, Janschek E, Wolf B, Rudas M, Teleky B, Jakesz R, Kandioler D. TP53 germline mutation may affect response to anticancer treatments: analysis of an intensively treated Li-Fraumeni family. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jun;151(3):671-8. doi: 10.1007/s10549-015-3424-1. Epub 2015 May 16. PMID: 25981898.
19. Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B, Hrstka R. Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2014 Oct;32(4):1695-702. doi: 10.3892/or.2014.3346. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25051299.
20. Wu C-C, Krahe R, Lozano G, Zhang B, Wilson CD, Jo E-J et al (2011) Joint effects of germline TP53 mutation, MDM2 SNP309, and gender on cancer risk in family studies of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Genet* 129(6):663–673
21. Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D, Swain SM. p53, HER2 and tumor cell apoptosis correlate with clinical outcome after neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy in breast cancer. *Int J Oncol.* 2011;38(5):1445-1452. doi:10.3892/ijo.2011.966 [PMCID: PMC7316373] [PubMed: 21399868] [CrossRef: 10.3892/ijo.2011.966]
22. Nguyen D, Yu J, Reinhold WC, Yang SX. Association of Independent Prognostic Factors and Treatment Modality With Survival and Recurrence Outcomes in Breast Cancer. *JAMA Netw Open.* 2020 Jul 1;3(7):e207213. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.7213. PMID: 32644137; PMCID: PMC7348688.
23. Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D. Radiation-induced apoptosis in normal and pre-neoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and p53 status. *Int J Cancer.* 1996 Feb 8;65(4):466-72. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960208)65:4<466::AID-IJC13>3.0.CO;2-8. PMID: 8621229.
24. Hill JW, Tansavatdi K, Lockett KL, Allen GO, Takita C, Pollack A, Hu JJ. Validation of the cell cycle G(2) delay assay in assessing ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Cancer Manag Res.* 2009 Apr 30;1:39-48. doi: 10.2147/cmar.s4548. PMID: 21188122; PMCID: PMC3004657.
25. Li SJ, Liang XY, Li HJ, Li W, Zhou L, Chen HQ, Ye SG, Yu DH, Cui JW. Low- dose irradiation promotes proliferation of the human breast cancer MDA-MB-231 cells through accumulation of mutant P53. *Int J Oncol.* 2017 Jan;50(1):290-296. doi: 10.3892/ijo.2016.3795. Epub 2016 Dec 6. PMID: 27959407.
26. Liu W, Ip MM, Podgorsak MB, Das GM. Disruption of estrogen receptor alpha-p53 interaction in breast tumors: a novel mechanism underlying the anti- tumor effect of

radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 May;115(1):43-50. doi: 10.1007/s10549-008-0044-z. Epub 2008 May 15. PMID: 18481172; PMCID: PMC4066453.

27. Dong C, Zhang F, Luo Y, Wang H, Zhao X, Guo G, Powell SN, Feng Z. p53 suppresses hyper-recombination by modulating BRCA1 function. *DNA Repair (Amst).* 2015 Sep;33:60-9. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.06.005. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26162908; PMCID: PMC4960982.

28. Tanikawa C, Zhang YZ, Yamamoto R, Tsuda Y, Tanaka M, Funauchi Y, Mori J, Imoto S, Yamaguchi R, Nakamura Y, Miyano S, Nakagawa H, Matsuda K. The Transcriptional Landscape of p53 Signalling Pathway. *EBioMedicine.* 2017 Jun;20:109-119. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.017. Epub 2017 May 18. PMID: 28558959; PMCID: PMC5478243.

29. Ghaleb A, Yallowitz A, Marchenko N. Irradiation induces p53 loss of heterozygosity in breast cancer expressing mutant p53. *Commun Biol.* 2019 Nov 27;2:436. doi: 10.1038/s42003-019-0669-y. PMID: 31799437; PMCID: PMC6881331.

30. Balcer-Kubiczek EK, Yin J, Lin K, Harrison GH, Abraham JM, Meltzer SJ. p53 mutational status and survival of human breast cancer MCF-7 cell variants after exposure to X rays or fission neutrons. *Radiat Res.* 1995 Jun;142(3):256-62. PMID: 7761574.

31. Formenti SC, Dunnington G, Uzieli B, Lenz H, Keren-Rosenberg S, Silberman H, Spicer D, Denk M, Leichman G, Groshen S, Watkins K, Muggia F, Florentine B, Press M, Danenberg K, Danenberg P. Original p53 status predicts for pathological response in locally advanced breast cancer patients treated preoperatively with continuous infusion 5-fluorouracil and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Dec 1;39(5):1059-68. doi: 10.1016/s0360-3016(97)00506-3. PMID: 9392545.

32. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A, Nieruchalski M, Fourquet A, Clough K, Dieras V, Pouillart P, Sastre-Garau X. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer.* 1998 Feb 20;79(1):27-33. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980220)79:1<27::aid-ijc6>3.0.co;2-y. PMID: 9495354.

33. Zellars RC, Hilsenbeck SG, Clark GM, Allred DC, Herman TS, Chamness GC, Elledge RM. Prognostic value of p53 for local failure in mastectomy-treated breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2000 May;18(9):1906-13. doi: 10.1200/JCO.2000.18.9.1906. PMID: 10784631.

34. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Galazios G, Sivridis E. Molecular analysis of local relapse in high-risk breast cancer patients: can radiotherapy fractionation and time factors make a difference? *Br J Cancer.* 2003 Mar 10;88(5):711-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6600755. PMID: 12618880; PMCID: PMC2376345.

35. Jansson T, Inganäs M, Sjögren S, Norberg T, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. p53 Status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. *J Clin Oncol.* 1995 Nov;13(11):2745-51. doi: 10.1200/JCO.1995.13.11.2745. PMID: 7595733.

36. Amornmarn R, Bui MM, Prempre TB, Masood S. Molecular predictive factors for local recurrence and distant metastasis of breast cancer after lumpectomy with postoperative radiation therapy. *Ann Clin Lab Sci.* 2000 Jan;30(1):33-40. PMID: 10678581.

37. Lee DS, Kim SH, Kim S, Suh YJ, Kim HK, Shim BY. Prognostic significance of breast cancer subtype and p53 overexpression in patients with locally advanced or high-risk breast cancer treated using upfront modified radical mastectomy with or without post- mastectomy radiation therapy. *Int J Clin Oncol*. 2012 Oct;17(5):447- 55. doi: 10.1007/s10147-011-0309-0. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21898181.
38. Askmalm MS, Carstensen J, Nordenskjöld B, Olsson B, Rutqvist LE, Skoog L, Stål O. Mutation and accumulation of p53 related to results of adjuvant therapy of postmenopausal breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2004;43(3):235-44. doi: 10.1080/02841860410029474. PMID: 15244246.
39. Turner BC, Gumbs AA, Carbone CJ, Carter D, Glazer PM, Haffty BG. Mutant p53 protein overexpression in women with ipsilateral breast tumor recurrence following lumpectomy and radiation therapy. *Cancer*. 2000 Mar 1;88(5):1091-8. PMID: 10699900.
40. Stål O, Stenmark Askmalm M, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Ferraud L, Sullivan S, Carstensen J, Nordenskjöld B. p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncol*. 1995;34(6):767-70. doi: 10.3109/02841869509127184. PMID:7576743.
41. Osin PP, Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res*. 1999;1(1):36-40. doi: 10.1186/bcr11. Epub 1999 Oct 27. PMID: 11250681; PMCID: PMC138499.
42. Klumb, C. E., & Cavalcanti Júnior, G. B. (2002). Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 24, 111-125.
43. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih leM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol*. 2011 Sep;24(9):1248-53. doi: 10.1038/modpathol.2011.85. Epub 2011 May 6. PMID: 21552211.
44. Chan JK, Ip YT, Cheuk W. The utility of immunohistochemistry for providing genetic information on tumors. *Int J Surg Pathol*. 2013 Oct;21(5):455-75. doi: 10.1177/1066896913502529. PMID: 24065374.
45. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol*. 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S123-S131. doi: 10.1097/PGP.0000000000000488. PMID: 29517499; PMCID: PMC6127005.
46. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1312:17-30.
47. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11.
48. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-298.