



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA
E EXPERIMENTAL – CLINEX

**“Identificação de Mutações Germinativas no
Gene *TP53* em Mulheres com História Familiar
de Câncer de Mama”**

Siane Campos de Souza

**Rio de Janeiro
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA
E EXPERIMENTAL – CLINEX

**“Identificação de Mutações Germinativas no
Gene *TP53* em Mulheres com História Familiar
de Câncer de Mama”**

Siane Campos de Souza

Dissertação submetida à Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (CLINEX) no Departamento de Biologia Celular e Genética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Rio de Janeiro
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Siane Campos

“Identificação de Mutações Germinativas no Gene *TP53* em Mulheres com História Familiar de Câncer de Mama”/ Siane Campos de Souza. Rio de Janeiro, UERJ, 2005.

xvii, 84p.: il.

Orientadora: Cláudia Vitória de Moura Gallo.

Co-orientador: Júlio Cesar da Paixão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gene *TP53* 2. Câncer de mama 3. Síndrome de Li-Fraumeni I. de Moura Gallo, Cláudia Vitória / Paixão, Júlio Cesar da. II. Universidade do Rio de Janeiro – UERJ. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA
E EXPERIMENTAL – CLINEX

**“Identificação de Mutações Germinativas no
Gene *TP53* em Mulheres com História Familiar
de Câncer de Mama”**

Siane Campos de Souza

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Co-orientador: Dr^º Júlio Cesar da Paixão**

Aprovada em _____ de novembro de 2005 pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Prof. Dra. _____

Prof. Dra. _____

**Rio de Janeiro
2005**

A meus pais,
Edson e Yolanda,
por orientar seu filhos
nas atividades intelectuais.

A meu irmão,
Savio, por me ensinar
que a vida sem um sorriso
não tem a menor graça.

A minha irmã,
Suian, por ser mais
que uma amiga durante
toda a minha vida.



A meu marido, Rodolfo,
pelo amor, carinho e
compreensão durante
todo esse trabalho.

A minha filha, Beatriz,
por tornar tudo
isso valioso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nunca me abandonar e me conceder mais essa vitória em minha vida.

À minha família, por me apoiar sempre e nunca me deixar desistir.

À minha orientadora, Dr. Cláudia Vitória de Moura Gallo, por ter confiado em mim para a execução deste trabalho, além de ter me ensinado muito profissionalmente.

Ao Dr. Júlio César da Paixão pelo apoio profissional dando todo suporte e estrutura para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Juan Clinton Llerena Jr. pela oportunidade de me colocar em contato com a pesquisa na área humana e pelas generosas dicas neste trabalho.

As amigas Priscila, Silvia e Valéria pela alegria no laboratório, e principalmente a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Marcos, que foi muito importante no desenvolvimento técnico de todo o trabalho, acelerando o processo de finalização dos experimentos.

Aos amigos do Instituto Fernandes Figueira, Lúcia, Vera, Camilo, Milene, Leila, Maria Helena, Renata, Socorro, Elenice, Beto, “Dona Cristina”, Nara, Letícia, Jane, Laura, e todos que por lá passaram, pela amizade de tantos anos e por sempre estarem comemorando comigo as minhas vitórias.

Aos médicos, Dr. Roberto Vieira e principalmente, Viviane Esteves pela grande contribuição e ajuda na realização deste trabalho.

As amigas Nívea e Gabriela que apesar de não fazerem mais parte do mesmo ambiente de trabalho que eu, permanecem como grandes amigas.

A todas as pacientes que colaboraram com o projeto, depositando em nós a esperança de uma vida melhor. E a todos que, diretamente e indiretamente, tenham contribuído na realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Funções do gene *TP53* descobertas desde 1979 (Fonte: Hofseth *et al.*, 2004). **Pág.: 2**
- Figura 2** – Estrutura do gene *TP53* humano (Fonte: Reisman *et al.*, 1996). **Pág.: 4**
- Figura 3** – Estrutura da p53. As regiões escuras indicam os cinco domínios conservados durante a evolução (Fonte: Cadwell e Zambetti, 2001). **Pág.: 4**
- Figura 4** – Envolvimento da p53 em vias de múltiplos estresses celulares (Fonte: modificado de Hofseth *et al.*, 2004). **Pág.: 6**
- Figura 5** – Organograma explicativo da ordem e aplicação das técnicas utilizadas. **Pág.: 26**
- Figura 6** – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação específica dos exons 5, 6, 7 e 8 (Fonte: Ahomadegbe *et al.*, 1995) **Pág.: 28**
- Figura 7** – Oligonucleotídeos p5334F e p5334R utilizados para amplificar regiões polimórficas. **Pág.: 35**
- Figura 8** – Análise do exon 8 das amostras de DNA genômico das mulheres do BNDNA, por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. A seta indica a amostra RJ229 com o perfil de migração eletroforética alterada no exon 8. **Pág.: 39**
- Figura 9** – Confirmação da alteração da amostra RJ229 indicada pela seta. **Pág.: 40**
- Figura 10** – Eletroferograma correspondente ao exon 8 da amostra RJ 229. A seta indica a mutação c.282G>C. **Pág.: 40**
- Figura 11** – Representação da freqüência dos diferentes tipos de mutações germinativas em *TP53*, segundo o seu efeito na proteína. **Pág.: 42**
- Figura 12** – Representação da freqüência e posição dos códons mais afetados nas mutações germinativas. **Pág.: 43**

Figura 13 – Representação dos tipos de mutações germinativas mais encontradas em *TP53*. **Pág.: 43**

Figura 14 – Tipos de tumores mais encontrados em mutações germinativas. **Pág.: 44**

Figura 15 – Heredograma da família da amostra RJ229. **Pág.: 46**

Figura 16 – Análise do exon 8 das amostras de DNA genômico dos indivíduos da família do probando, por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. **Pág.: 48**

Todas as amostra demonstraram um perfil de migração eletroforética normal.

Figura 17 – Idiograma do cromossomo 17. A seta indica a região 17p13.1 normal observada em ambos os cromossomos 17 do indivíduo III.1. **Pág.: 48**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Característica da população analisada **Pág.: 37**
- Tabela 2** – Tipos de cânceres relatados nas famílias dos indivíduos analisados. **Pág.: 38**
- Tabela 3** – Características dos indivíduos analisados da família do portador da mutação. **Pág.: 47**
- Tabela 4** – Tipos de cânceres relatados na família do indivíduo RJ229. **Pág.: 47**
- Tabela 5** – Polimorfismos PIN3 do íntron 3 e Pro72 do exon 4 no gene *TP53* analisado dos membros da família da amostra RJ229. **Pág.: 49**
- Tabela 6** – Trabalhos que encontraram a mesma mutação c.282G>C em uma das amostras analisadas. **Pág.: 57**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	adenina
Arg	arginina
AT	ataxia telangectasia
<i>ATM</i>	ataxia telangectasia mutante
APE 1	Do inglês <i>apurinic/aprimidinic endonuclease-1</i>
APAF-1	Do inglês <i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
ATR	ataxia telangectasia Rad 3
APO1/faz/CD95	simbologia alternativa de TNFRSF6 – tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
APS	persulfato de amônio
BAX	Bcl-2 associado a proteína X
BER	reparo de excisão de base (do inglês <i>base excision repair</i>)
<i>Bcl-2</i>	oncogene do inglês <i>B-cell leukemia 2</i>
<i>BCL10</i>	oncogene do inglês <i>B-cell leukemia/lymphoma 10</i>
<i>BLM</i>	gene da síndrome de Bloom
BNDNA	Banco Nacional de DNA
<i>BRCA 1</i>	do inglês <i>breast cancer 1</i>
<i>BRCA 2</i>	do inglês <i>breast cancer 2</i>
C	Citosina
°C	graus Celsius
CA	Câncer
Cdc2	proteína que interage com GADD45 no ciclo celular
CDKs	quinase dependente de ciclina – do inglês <i>cycline-dependent kinases</i>
CDKN2A	do inglês <i>cycline-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CHEK1 / CHK1	proteína do <i>checkpoint</i> celular 1
CHEK2 / CHK2	proteína do <i>checkpoint</i> celular 2
CpG	regiões ricas em ligações G-C
del	Deleção
DHPLC	do inglês <i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato

dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
E2F	fator de transcrição
EDTA	ácido etileno diamino tetraacético
<i>FancD2</i>	gene da anemia de Fanconi grupo de complementação D2
G	Guanina
G1	fase G1 do ciclo celular
G2	fase G2 do ciclo celular
g	Gramas
<i>GADD45</i>	do inglês <i>growth arrest and DNA-damage-inducible</i>
GML	<i>glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule-like protein</i>
HCl	ácido clorídrico
<i>HDM2</i>	oncogene do inglês <i>human-double-minute chromosome</i>
HR	recombinação homóloga
H ₂ O	Água
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IFF	Instituto Fernandes Figueira
iNOS	Do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>
LFL	Li-Fraumeni-like
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
kDa	kilodáltons
KCl	cloreto de potássio
KHCO ₃	bicarbonato de potássio
KH ₂ PO ₃	fosfato de potássio
Killer/DR5	simbologia alternativa de TNFRSF10B – tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B
M	fase mitose do ciclo celular
<i>MDM-2</i>	oncogene do inglês <i>murine-double-minute chromosome</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMR	do inglês <i>mismatch repair</i>

mt	Mutante
μl	Microlitro
μg	microgramas
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato monobásico de sódio anidro
NaOH	hidróxido de sódio
Nbs1	Do inglês <i>nijmegen breakage syndrome</i>
NER	reparo de excisão de nucleotídeos (do inglês <i>nucleotide excision repair</i>)
ng	nanograma
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NHERJ	do inglês <i>non-homologous end-joining</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
NOXA	do latim “dano”
p	braço curto do cromossomo
P1	promotor 1 do gene <i>TP53</i>
P2	promotor 2 do gene <i>TP53</i>
P2XM	do inglês <i>purinergic receptor skeletal muscle-expressed</i>
<i>p14^{ARF}</i>	simbologia alternativa de CDKN2A
<i>p21^{waf1}</i>	simbologia alternativa de CDKN1A; <i>waf1</i> = <i>wildtype p53-activated fragment 1</i>
p48	identifica lesões específicas no DNA
p53	fosfoproteína de 53kDa do gene <i>TP53</i>
<i>p53R2</i>	p53 redutase
p5334R	Oligonucleotídeo <i>reverse</i> do polimorfismo do gene <i>TP53</i>
p5334F	Oligonucleotídeo <i>forward</i> do polimorfismo do gene <i>TP53</i>
pb	pares de base
PCNA	do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomolar
Pro	prolina

<i>PTEN</i>	Gene relacionado à síndrome de Cowden
PUMA	do inglês <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
q	braço longo do cromossomo
RJ229	identificação da amostra portadora de mutação
rpm	rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura
RNA	ácido ribonucléico
S	fase S do ciclo celular
SDS	dodecil sulfato de sódio
SMC1	do inglês <i>structural maintenance of chromosomes-1</i>
SSCP	polimorfismo de conformação de DNA fita simples (do inglês <i>single strand conformation polymorphism</i>)
<i>STK11</i>	do inglês <i>serina/threonina protein kinase 1</i>
SV40	Vírus símio 40
T	timina
TAE	tampão Tris-Acetato EDTA
TBE	tampão Tris-Borato EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TEMED	N'N'N'N'- tetrametiletilenodiamina
TP53	Gene supressor de tumor <i>TP53</i>
TP63	gene da família do <i>TP53</i>
Tris	trihidroxi-metil-amino-metano
<i>Trp53</i>	gene supressor de tumor <i>TP53</i> em camundongos
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	unidade
UV	ultravioleta
WRN	gene referente a síndrome de Werner
wt	tipo selvagem do inglês <i>wild-type</i>
XPB	Xeroderma pigmentoso grupo B
XPB	Xeroderma pigmentoso grupo D
<i>14-3-3σ</i>	do inglês <i>tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein σ isoform</i>

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – O Gene <i>TP53</i>	3
1.2 – A proteína p53	5
1.2.1 – Estrutura da p53	5
1.2.2 – Ativação, fosforilação e estabilidade da p53	5
1.2.3 – Função da p53	7
A) Controle do Ciclo Celular	7
B) Apoptose	8
C) Reparo do DNA	9
1.3 – Fatores de Risco ao Câncer de Mama	11
1.3.1 – Genes Ligados à Predisposição ao Câncer de Mama	11
A) <i>BRCA 1</i> e <i>BRCA 2</i>	12
B) <i>ATM</i>	13
C) <i>CHEK2</i>	14
D) <i>STK11</i>	15
E) <i>PTEN</i>	15
F) <i>TP53</i>	16
1.4 – Síndrome de Li-Fraumeni (LFS)	20
2 - OBJETIVOS	24
	25
3 – MATERIAL E MÉTODOS	

3.1 – Pacientes	25
3.2 – Métodos	26
3.2.1 – Extração de DNA	27
3.2.2 – Quantificação do DNA	28
3.2.3 – Reação em Cadeia da Polimerase	28
3.2.4 – Polimorfismo de Conformação de DNA fita simples	29
A) Composição do Gel de Poliacrilamida 8%	30
3.2.5 – Coloração por Prata	30
3.2.6 – Purificação do produto de PCR	31
3.2.7 – Seqüenciamento	32
3.2.8 – Análise Citogenética	33
A) Implante de sangue periférico	33
B) Citologia	33
C) Preparação de Lâminas	34
D) Bandeamento GTG	34
3.2.9 – Identificação dos Polimorfismos do gene <i>TP53</i>	35
A) Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase	35
B) Análise dos polimorfismos do gene <i>TP53</i>	36
4 – RESULTADOS	37
4.1 – Características da População Analisada	37
4.2 – Detecção de Mutações Germinativas no gene <i>TP53</i>	39
4.3 – Análise das Mutações Germinativas em <i>TP53</i>	41
4.4 – Análise da Família do Indivíduo Portador da Mutação	45
5 – DISCUSSÃO	51
6 – CONCLUSÃO	63
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

O processo de carcinogênese envolve ganho de função atribuído a proto-oncogenes e/ou a perda da função de supressores de tumor, através de mutações que alteram a estrutura da proteína resultante. O *TP53* é um gene supressor de tumor frequentemente mutado em vários tumores, que codifica uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução do processo de apoptose. As alterações mais comuns encontradas neste gene são mutações pontuais que alteram proteína em um aminoácido levando a perda da função. A maioria das mutações estão concentradas no domínio central da proteína, que correspondem aos exons 5, 6, 7 e 8, e que estão envolvidos diretamente na ligação da proteína ao DNA. As mutações encontradas em *TP53* podem ser somáticas ou germinativas. Mutações germinativas em *TP53* predispõem a uma variedade de tumores malignos de desenvolvimento precoce estando normalmente relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni, uma doença rara de câncer familiar. O tipo de câncer mais freqüente em pacientes portadores de mutação germinativa com história familiar positiva é o câncer de mama. Assim, este trabalho consistiu em um estudo transversal, onde amostras de DNA foram analisadas para determinação da freqüência de mutações em *TP53* em mulheres com história de susceptibilidade genética pessoal e familiar ao desenvolvimento do câncer. Cento e quatro pacientes com forte história familiar de câncer de mama residentes no Estado do Rio de Janeiro e pertencentes ao Banco de DNA do Projeto Câncer de Mama e Genética do IFF/FIOCRUZ (BNDNA), foram avaliadas neste trabalho. Os DNAs foram extraídos de sangue total destas pacientes e posteriormente submetidos a técnica de PCR-SSCP para a avaliação dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*. As amostras que apresentaram um perfil eletroforético alterado foram posteriormente seqüenciadas. Foram observadas 12 alterações, mas em apenas uma foi confirmada a presença de mutação no exon 8. Esta mutação foi confirmada por DHPLC e seqüenciada sendo do tipo *missense*, situada no códon 282 em sítio CpG, sendo uma transversão G→C, ocorrendo uma troca Arginina→Prolina. A comparação da mutação identificada com o banco de mutações em TP53 do IARC mostrou que esta mutação ainda não foi descrita na literatura em mutações germinativas. A família da paciente foi contactada e a análise de 13 membros desta mostrou que nenhum outro familiar apresentou a mesma alteração gênica apesar da alta incidência de cânceres. A análise citogenética do cromossomo 17 em um dos membros da família não apresentou alteração na sua estrutura. Já, quanto à análise dos polimorfismos do gene, um número maior de indivíduos devem ser analisados para uma melhor conclusão. Assim, apesar da baixa freqüência de mutação encontrada (1 caso em 104 (0,96%)), tal resultado corrobora a freqüência encontrada na literatura e, ainda, a mutação identificada não foi ainda descrita entre as mutações germinativas em *TP53*.

ABSTRACT

The process of carcinogenesis involves gain of function of protooncogenes and/or loss of function of tumor suppressor genes, through mutations that modify the structure of the resultant protein. The *TP53* is a tumor suppressor gene, frequently mutated in several tumors, which encodes a nuclear phosphoprotein that plays an important role in the cell cycle control, DNA repair and the induction of the process of apoptosis. The most common alterations found in this gene are missense mutations which modify the protein changing one amino acid leading to a loss of function. The majority of the mutations is concentrated in the central domain of the protein that corresponds to the exons 5, 6, 7 and 8, directly involved in the DNA-binding domain. Mutations found in *TP53* can be somatic or germline. Germline mutations in *TP53* predispose to a variety of malignant tumors of precocious development being normally related in Li-Fraumeni syndrome, a rare disease of familial cancer. The most frequent type of cancer in patients bearing a germline mutation is breast cancer. Thus, this work consisted of a transversal study, where samples of DNA had been analyzed for determination of the *TP53* mutation frequency in women with history of personal and familial genetic susceptibility to cancer development. One hundred and four patients with strong familial history of breast cancer, residents of the State of Rio de Janeiro and participating in the project “*Câncer de Mama e Genética*” of IFF/FIOCRUZ (BNDNA), were analyzed in this work. The DNAs were extracted from total blood of these patients and submitted to the technique of PCR-SSCP. Exons 5, 6, 7 and 8 of the *TP53* gene were evaluated. The samples that presented a modified profile were directly sequenced. Twelve alterations were observed, but the presence of mutation was confirmed in only one sample. This mutation was a missense mutation, situated at codon 282, in a CpG site, being a transversion G→C which resulted in a Arginine→Proline exchange. The comparison between the identified mutation and the mutations in IARC / *TP53* database showed that it has not yet been described among the germline mutations. The family of the patient was contacted and the analysis of 13 members showed that nobody from the family had the same genetic alteration despite the high incidence of cancers. The cytogenetics analysis of the chromosome 17 in one member of the family did not show any genetic alteration. Thus, despite the low frequency of mutations (1 case in 104 (0,96%)), such result corroborates the frequency found in the literature and, still, the identified mutation was not described among the germline *TP53* mutations.

1 – INTRODUÇÃO:

O câncer pode ser considerado uma doença genética, resultado de alterações em genes que causam ruptura no crescimento e diferenciação celular normal. A transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa ocorre através do acúmulo de alterações genéticas em duas classes de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (Tworek *et al.*, 1999). Esse processo, conhecido como carcinogênese, pode ser compreendido como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, especialmente os genes supressores tumorais, que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, o crescimento celular, a imunidade e a quimio-resistência às drogas, agindo normalmente como reguladores da proliferação celular. Nesse grupo, destaca-se o gene *TP53*, cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer, por levar a um aumento de uma população celular com maior instabilidade genética (Cavalcanti *et al.*, 2002).

A proteína p53 foi descoberta há mais de 25 anos como uma proteína celular de 53 kilodaltons (kDa) formando um complexo com o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (Hofseth *et al.*, 2004). Inicialmente clonado a partir de tumores humanos ou de roedores, o gene se comportou como um oncogene que cooperava com o gene *ras* na transformação de fibroblastos primários de ratos (Hainaut e Hollstein, 2000). Ao final da década de 80, constatou-se que esta propriedade era exibida por algumas formas mutantes, enquanto o gene do tipo selvagem era capaz de reprimir a transformação *in vitro*, assim como, o crescimento de tumores *in vivo* (Hainaut e Hollstein, 2000). Diante de tais resultados, ficou fácil deduzir que o gene descoberto era então um supressor de tumor. Em 1989, Vogelstein e Minna foram os primeiros a relatar a presença de

mutações em *TP53* em células de câncer de pulmão e colo retal (Soussi, 2000). Em 1990, alterações constitutivas do *TP53* foram detectadas em pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni, uma doença autossômica rara, caracterizada pelo aparecimento prematuro de vários tipos de câncer. Em 1992, Donehower e colaboradores mostraram que camundongos nocautes para o gene *TP53* apresentavam um desenvolvimento essencialmente normal, porém eram propensos ao desenvolvimento prematuro de vários tipos de câncer (Donehower *et al.*, 1992). Estas observações levaram a especulação de que o *TP53* era o “principal gene supressor de tumor” (**figura 1**). Tais achados também foram confirmados por outros grupos, e as descobertas resultaram em várias publicações sobre estrutura, funções e mutações em *TP53* (Hainaut e Hollstein, 2000), além de 21512 mutações somáticas e 283 mutações germinativas descritas na literatura (<http://www-p53.iarc.fr/>).

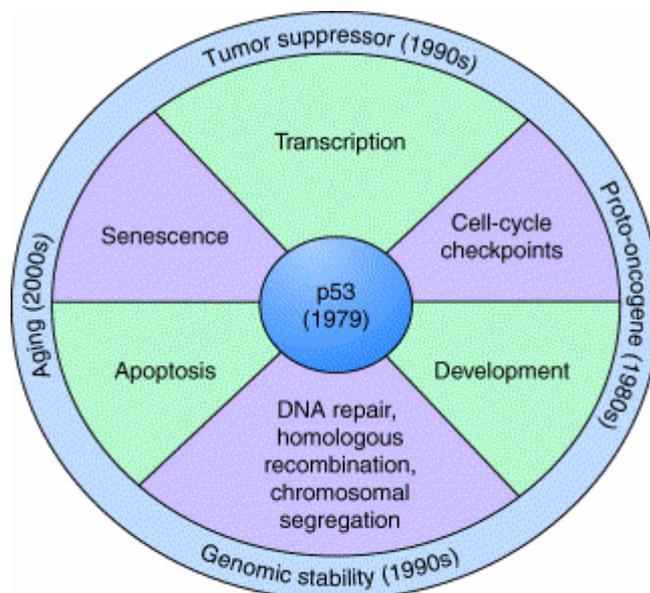


Figura 1: Funções do gene *TP53* descobertas desde 1979 (Hofseth *et al.*, 2004).

Um banco de dados de mutações pontuais em *TP53* foi iniciado em 1990 por pesquisadores da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, órgão da OMS, e desenvolvido desde então. Este banco de dados é o maior banco de mutações pontuais do mundo em *TP53* e atualmente contém mais de 21000 mutações somáticas identificadas por sequenciamento (<http://www-p53.iarc.fr/>) (Hainaut e Hollstein, 2000; Guimaraes e Hainaut, 2002; Olivier *et al.*, 2002).

1.1 – O gene *TP53*:

O gene supressor tumoral *TP53* (GeneID: 7157) localiza-se no braço curto do cromossomo 17 em humanos (17p13), contendo 11 exons que se estendem por 20 kilobases. Estes exons, com exceção do primeiro, codificam uma fosfoproteína nuclear tetramérica de 53 kDa. Este gene está alterado na maioria dos cânceres invasivos e estas alterações incluem perda alélica, mutações pontuais (principalmente *missense*) e inativação da proteína por antígenos virais ou proteínas celulares (Guimaraes e Hainaut, 2002). Essas alterações são detectadas em aproximadamente 50% de todos os tipos de câncer no mundo (Hofseth *et al.*, 2004), tornando este gene o alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico (Hainaut e Hollstein, 2000).

No *TP53* humano, foram identificados dois promotores: P1 e P2. O P1 está localizado anteriormente ao exon 1 e é responsável pela transcrição do principal RNA mensageiro. O P2 é oito a dez vezes maior que o P1 e localiza-se dentro do intron 1, aproximadamente 1000 pb após ao exon 1 (**figura 2**) (Reisman *et al.*, 1996).

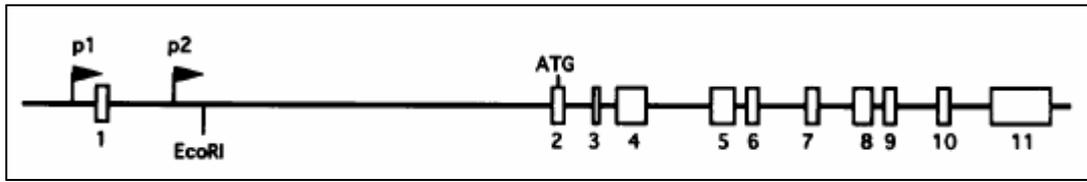


Figura 2: Estrutura do gene *TP53* humano (Reisman et al., 1996).

A estrutura geral do gene e a seqüência de vários domínios, que correspondem às características estruturais importantes da proteína, são bem conservadas em todos os vertebrados (Hainaut e Hollstein, 2000). Os exons 1, 4, 5, 7 e 8 são os cinco sítios de conservação considerados essenciais para o funcionamento normal da p53 (**figura 3**) (Martin *et al.*, 2003). Até hoje, entretanto, nenhum homólogo do *TP53* foi encontrado em invertebrados (Hainaut e Hollstein, 2000).

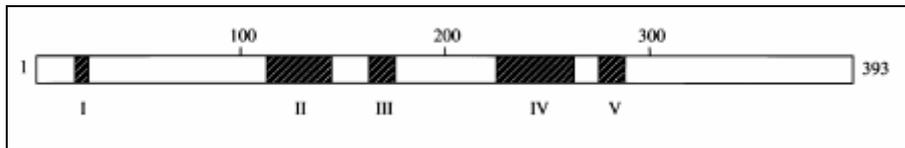


Figura 3: Estrutura da p53. As regiões escuras indicam os cinco domínios conservados durante a evolução (Cadwell e Zambetti, 2001).

1.2 – A Proteína p53:

1.2.1) Estrutura da p53:

A proteína p53 atua como um fator de transcrição multifuncional envolvido no controle do ciclo celular, morte celular programada, senescência, diferenciação e desenvolvimento, manutenção da estabilidade do genoma, replicação do DNA, transcrição e reparo do DNA (Hollstein *et al.*, 1999). Ela possui 393 aminoácidos e é organizada em 5 regiões estruturais e funcionais. Estas regiões incluem um domínio de ativação transcricional N-terminal (resíduos 1-50), um domínio regulatório rico em prolina (resíduos 63-92), um domínio de ligação ao DNA seqüência-específica (resíduos 100-300), um domínio de oligomerização (resíduos 323-355) e um domínio multifuncional C-terminal, envolvido na regulação da ligação ao DNA (resíduos 363-393) (Hainaut e Hollstein, 2000).

1.2.2) Ativação, fosforilação e estabilização da p53:

A proteína é fracamente expressa em todas as células humanas (Hainaut e Mann, 2001), estando sob a forma latente em condições normais (Hainaut e Hollstein, 2000). Entretanto, é facilmente ativada por modificações pós-traducionais em resposta a múltiplas formas de estresse, tanto genotóxicas (irradiação, carcinógenos químicos, ou agentes citotóxicos usados em terapias do câncer) como não genotóxicas (hipóxia, depleção de ribonucleotídeos e ativação oncogênica constitutiva de cascatas de sinalização do crescimento celular) (**figura 4**) (Martin, *et al.*, 2002). Uma vez ativada, a p53 acumula-se em altos níveis no núcleo e atua como um fator multifuncional de

transcrição aumentando a expressão de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, resposta adaptativa ao estresse, diferenciação e reparo de DNA (figura 4) (Vogelstein *et al.*, 2000).

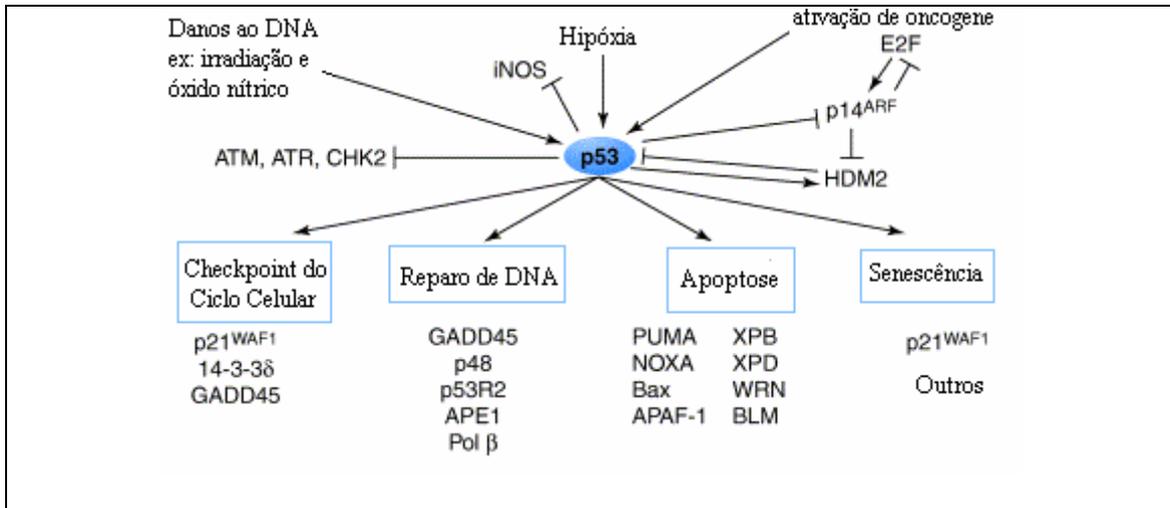


Figura 4: Envolvimento da p53 em vias de múltiplos estresses celulares (baseado em Hofseth *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, a proteína p53 tem meia-vida curta, avaliada em minutos. Este controle é feito principalmente via *mdm-2*, um oncogene originalmente identificado como um dos vários genes contidos em um duplo cromossomo mínimo em murinos (do inglês “*murine double-minute chromosome*”) presente em derivados de células 3T3 transformadas, que promove rápida degradação da forma fosforilada da proteína p53 (Tokino e Nakamura, 2000). Em vista disso, a função da p53 é eliminada pela interação com o produto do gene *MDM2*, onde tal produto leva a p53 à via de degradação (Bargonetti e Manfredi, 2002) (figura 4). Por outro lado, p53 ativa a expressão do gene *MDM2*, resultando em uma auto-regulação fechada (Tokino e Nakamura, 2000).

A rápida ativação pós-traducional de proteínas de sinalização, como a p53, é muitas vezes resultado de modificações covalentes, em especial da fosforilação destas proteínas induzidas como resposta ao estresse (Oren, 1999). Diferentes sinais podem ativar caminhos variáveis que resultam em diferentes formas fosforiladas da p53 (Bargonetti e Manfredi, 2002). Um efeito potencial de fosforilação pode ser a estabilização da p53 através da inibição da conjugação com a ubiquitina e da redução da taxa de degradação da proteína (Caspari, 2000). A fosforilação do amino terminal, principalmente serina 15, serina 20 e treonina 18, rompe a interação entre a p53 e a proteína Mdm2, o que leva a estabilização e aumento dos níveis de proteína (Bargonetti e Manfredi, 2002).

1.2.3) Funções da p53:

A) Controle do ciclo celular:

O termo “guardião do genoma” atribuído à proteína p53 é decorrente da sua função no monitoramento da integridade do genoma, impedindo a proliferação de células cujo DNA esteja mutado (Cavalcanti *et al.*, 2002). Um dos primeiros efeitos da expressão de p53, em quase todos os tipos de células de mamíferos, é o bloqueio do ciclo celular (Volgelstein *et al.*, 2000). Após a ativação de *TP53*, a proteína se acumula no núcleo da célula, estimulando diretamente a expressão de $p21^{waf1}$, um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKs – cycline-dependentkinases). Os CDKs são reguladores do ciclo celular, que garantem a progressão do ciclo celular de G1 para S. Através de um efeito negativo sobre vários CDKs, $p21^{waf1}$ inibe tanto G1 para S, quanto de G2 para a fase de mitose (Volgelstein *et al.*, 2000). Embora $p21^{waf1}$ seja o principal

gene alvo de p53 no controle da parada do ciclo celular G1/S, *p21^{waf1}* e *14-3-3 σ* , que é um alvo transcricional de p53, atuam de forma complementar no *checkpoint* da transição G2/M. A ausência de *p21^{waf1}* conduz a célula a continuar o ciclo celular entrando em mitose, enquanto que a ausência de *14-3-3 σ* é incompatível tanto com G2 estável quanto com mitose normal. Então, na ausência de ambos *p21^{waf1}* e *14-3-3 σ* , as células morrem rapidamente durante a fase G2 (Bargonetti e Manfredi, 2002). Outro alvo de p53 é *GADD45* que também pode causar parada do ciclo celular quando super expressa (Hainaut e Hollstein, 2000). O gene *GADD45* produz interação com várias proteínas relacionadas com o ciclo celular como Cdc2 e PCNA e contribui no reparo do DNA e na parada do ciclo celular na transição G2/M, favorecendo assim a manutenção da estabilidade do genoma (Cadwell e Zambetti, 2001).

B) Apoptose:

Em alguns tipos celulares, a ativação de p53 resulta em apoptose em vez de produzir uma parada no ciclo celular, em resposta a formas específicas de danos ao DNA como, por exemplo, hipóxia ou super-expressão de proto-oncogenes (Hainaut e Hollstein, 2000; Cadwell e Zambetti, 2001). A ativação da morte programada pela proteína p53 não é totalmente conhecida, mas alguns genes já conhecidos como regulados por p53 têm sido identificados como indutores pró-apoptóticos (Cadwell e Zambetti, 2001). Entre esses estão envolvidos *PUMA*, *BAX*, *FAS/CD95* (de Moura Gallo *et.al.*, 2005), *GML*, *P2XM*, *Killer/DR5*, *PAG608* (Tokino e Nakamura, 2000).

A mitocôndria faz o principal papel nos eventos apoptóticos através da liberação de fatores pró-apoptóticos (Hofseth *et al.*, 2004). Sabe-se que a p53 induz expressão de

receptores de morte como *Killer/DR5* e *APO1/fas/CD95* que liberam uma cascata de eventos induzindo apoptose, onde se destaca a ocorrência da alteração da membrana mitocondrial e liberação do citoplasma. Isso ocorre porque a p53 induz expressão do gene *BAX* e reprime a de *Bcl-2*, aumentando a permeabilidade mitocondrial nos poros de transição (Hainaut e Hollstein, 2000). Recentemente, o gene *NOXA* foi descoberto sendo diretamente ativado por p53 e, assim como *BAX*, a proteína Noxa também está localizada na mitocôndria (Vogelstein *et al.*, 2000).

A ativação de p53 pode diretamente ou indiretamente modular a expressão destas proteínas e outras proteínas que controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial podendo, portanto, controlar a liberação de proteínas mitocondriais durante o processo de apoptose (Hofseth *et al.*, 2004).

C) Reparo do DNA:

Em eucariotos, os cinco principais processos de reparo de DNA são: reparo de excisão de nucleotídeos (*NER*), reparo de excisão de base (*BER*), *mismatch repair* (*MMR*), *non-homologous end-joining* (*NHEJ*) e recombinação homóloga (*HR*). Embora apenas a função de transativação independente de p53 esteja envolvida na regulação de *HR*, a proteína p53 modula quase todos os outros processos de reparo de DNA tanto por vias de transativação dependente quanto independente (Sengupta e Harris, 2005).

O *p53R2* é um exemplo de gene que está envolvido em uma via dependente de p53 no *checkpoint* do ciclo celular em resposta ao dano no DNA, além de ser alvo direto

da proteína p53. A proteína p53R2 é necessária para a produção de desoxiribonucleotídeos e é importante tanto para replicação quanto para o reparo do DNA. Esse é um caminho onde p53 contribui no reparo do DNA unindo este processo à parada do crescimento celular (Bargonetti e Manfredi, 2002).

Um mecanismo importante envolve a indução do gene que regula a excisão de nucleotídeos no reparo do DNA, o *NER*, onde p53 é a chave reguladora (Hartman e Ford, 2003). *NER* opera em bases danificadas e na ruptura do pareamento das bases causada pela luz ultravioleta (UV) ou por dano oxidativo, onde tais danos são conduzidos a mudar a estrutura da dupla fita de DNA. Outro mecanismo seria através do gene *BER*, que protege células mamárias de danos causados pelo metabolismo celular, incluindo danos resultantes de metilação e agentes oxidativos, além de “despurinizações” espontâneas (Sengupta e Harris, 2005). Todos esses genes mantêm o controle celular, além de responder a erros no DNA em muitos organismos (Vogelstein *et al.*, 2000).

Diante disso, a proteína p53 parece ter influência direta no reparo do DNA (Bargonetti e Manfredi, 2002), tendo uma importante função na manutenção da estabilidade genética (Vogelstein *et al.*, 2000).

1.3 – Fatores de risco ao câncer de mama:

Existem diversos fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de mama. A variação na exposição aos fatores de risco influencia de forma significativa a incidência da doença em vários países. Esta incidência varia de acordo com a idade e se deve a fatores de risco endógenos e exógenos (Sellers *et al.*, 1999).

Alguns fatores associados a um risco aumentado incluem alta densidade mamária, hiperplasia atípica, obesidade após a menopausa, reposição hormonal pós-menopausa, exposição à radiação ionizante, exposição a pesticidas ou organoclorados e tabagismo (Kelsey e Gammon, 1991).

Porém, sabe-se que a história familiar é um dos fatores de risco mais bem estabelecidos para o câncer de mama. Esse risco varia de acordo com o grau de parentesco, o número de pessoas da família afetadas pelo câncer de mama e/ou ovário e a idade em que a doença foi diagnosticada (de Jong *et al.*, 2002).

1.3.1) Genes ligados à predisposição ao Câncer de Mama:

Vários genes foram identificados por causar predisposição ao câncer de mama, uma doença comum com uma etiologia complexa (Angèle *et al.*, 2000). O câncer de mama está associado com diferentes tipos de alterações genéticas somáticas como mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor (Borresen-Dale, 2003). Os principais deles são o *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53* e *CHEK2*. Além desses genes, vários outros genes relacionados com outras síndromes autossômicas dominantes têm

sido descritos como predisponentes ao câncer de mama familiar. Entre essas síndromes, figuram a Síndrome de Peutz-Jegher e a Síndrome de Cowden.

A) *BRCA1* e *BRCA2*:

O gene *BRCA1* se localiza no cromossomo 17q12-21 e foi clonado em 1994 por Miki e colaboradores. Ele codifica uma proteína ubiquitária que participa em processos fundamentais para todas as células, tais como: o reparo e recombinação do DNA, controle do ciclo celular e a regulação da atividade transcricional (Venkitaraman, 2002).

As mutações no *BRCA1* se distribuem ao longo de toda a seqüência do gene e consistem de inserções, deleções, e substituições de bases nitrogenadas (Wooster e Weber, 2003). Embora no câncer de mama de origem esporádica as mutações no gene *BRCA1* sejam raras, sua função encontra-se freqüentemente comprometida pela hipermetilação da região promotora do gene (Lerebours e Lidereau, 2002; Venkitaraman, 2002; Lambie *et al.*, 2003).

O gene *BRCA2* se localiza no cromossomo 13q12-13 e foi completamente caracterizado em 1995 e 1996 (Wooster *et al.*, 1995; Tavtigian *et al.*, 1996). Como o gene *BRCA1*, o *BRCA2* também codifica uma proteína multifuncional envolvida na manutenção da integridade genômica, no controle do ciclo celular e na transcrição (Kerr e Ashworth, 2001; Venkitaraman *et al.*, 2002; Pellegrini e Venkitaraman, 2004), além de um possível envolvimento na diferenciação terminal das células epiteliais da mama (Vidarsson *et al.*, 2002).

Mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* são responsáveis por 30 a 40% dos casos de câncer de mama de origem hereditária e por 2 a 3% do total de casos (Wooster e Weber, 2003). O risco de câncer de mama associado às mutações no *BRCA1* varia de 59% a 87%, enquanto que em *BRCA2* é um pouco menor, variando de 38% a 80% (Antoniou *et al.* 2003).

B) ATM:

O gene *ATM* também é um dos candidatos a genes de suscetibilidade (Angèle *et al.*, 2000), encontrando-se mutado em pacientes com Ataxia Telangectasia (AT) (Coutinho *et al.*, 2004). AT é uma doença autossômica recessiva infantil caracterizada por ataxia cerebelar, telangectasias ocular e de pele, imunodeficiências, extrema sensibilidade celular à radiação ionizante e predisposição ao câncer (Angèle *et al.*, 2000; Coutinho *et al.*, 2004). O gene *ATM* está localizado no cromossomo 11q23.1 (Coutinho *et al.*, 2004) e codifica uma proteína quinase de 350 kDa, que tem como função principal a detecção e reparo de quebras da fita dupla do DNA. A proteína ATM é principalmente nuclear, presente como um dímero nas células humanas (Angèle *et al.*, 2003).

A exposição à radiação ionizante induz a autofosforilação da proteína na serina 1981 conduzindo o dímero à dissociação e acessibilidade ao domínio quinase. O sinal subsequente da cascada no qual, substratos de ATM, incluindo p53, Mdm2, Chk2, BRCA1, SMC1, Nbs1, e FancD2, são fosforilados resultando na ativação do *checkpoint* do ciclo celular, reparo do DNA, ou processo de apoptose (Angèle *et al.*, 2003).

Estudo com mulheres heterozigotas para mutações no gene *ATM* tem revelado um aumento no risco relativo de cinco a sete vezes no desenvolvimento do câncer de mama. Esses resultados sugerem que heterozigotos *ATM* podem representar aproximadamente 8% de todos os casos de cânceres de mama (Thull e Vogel, 2004). O risco de paciente AT heterozigoto desenvolver câncer de mama é estimado em 11% até aos 50 anos e de 30% até aos 70 anos (De Jong *et al.*, 2002). Apesar dessa estimativa, um estudo com pacientes jovens com câncer de mama, não selecionados através da história familiar, não encontrou mutações em *ATM*, sugerindo que o gene pode não estar tão envolvido no desenvolvimento precoce do câncer de mama como suspeitavam inicialmente (Thull e Vogel, 2004).

C) CHEK2:

Novos genes de suscetibilidade ao câncer de mama estão sendo estudados e conferem um menor risco no desenvolvimento do câncer de mama quando comparados com mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. *CHEK2* é uma quinase atuante no *checkpoint* do ciclo celular e que responde a danos ao DNA através da ativação de p53 e BRCA1. Uma deleção específica em *CHEK2*, 1100delC, foi recentemente estudada e associada à baixa penetrância no desenvolvimento de câncer de mama (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002). Esta mutação foi identificada em algumas famílias com suscetibilidades ao câncer de mama e cólon hereditário. Embora testes para detecção do alelo mutado (*CHEK2* 1100delC) tenham começado a ser desenvolvidos, a aplicabilidade clínica desses testes ainda precisa ser determinada (Thull e Vogel, 2004).

D) STK11:

A síndrome de Peutz-Jegher se caracteriza por pigmentações muco cutâneas, predisposição a pólipos intestinais e a vários tipos de tumor, incluindo o tumor de mama. Essa síndrome é causada por mutações germinativas no gene *STK11*, um gene supressor de tumor com atividade serina/treonina quinase, que se localiza no cromossomo 19p13.3 (Hemminki *et al.*, 1997; Jenne *et al.*, 1998). Em mulheres com a síndrome de Peutz-Jegher, o risco relativo é de 20.3 (95% CI, 7.4 to 44.2) no desenvolvimento de câncer ginecológico e de mama (Boardman *et al.*, 1998).

E) PTEN:

A suscetibilidade ao câncer de mama foi também observada em indivíduos portadores de síndrome de Cowden, uma doença autossômica dominante nos quais os indivíduos afetados desenvolvem câncer de mama bilateral, papilomatose oral, pólipos gastrointestinais, tumor no trato genital feminino e tumores malignos ou benignos na tireóide (Hanssen e Fryns, 1995). Essa doença é causada por mutações germinativas no gene *PTEN*, que se localiza no cromossomo 10q23.3 (Li *et al.*, 1997). As portadoras de mutações nesse gene possuem de 30 a 50% de chance de virem a desenvolver câncer de mama até os 50 anos de idade (Radford e Zehnbauer, 1996). Entretanto, nenhuma mutação nesse gene tem sido encontrada em mulheres com padrão de suscetibilidade ao câncer de mama que não apresentam a síndrome de Cowden (Martin e Weber, 2000).

F) TP53:

Mutações no gene supressor de tumor, *TP53*, são as alterações genéticas mais comuns encontrada em câncer humano. O tipo e localização das mutações no gene são diferentes em distintos cânceres humanos. Esta variabilidade e espectro de mutações podem representar fatores etiológicos agindo no processo de transformação maligna (Simão *et al.*, 2002). A ocorrência de mutações varia em torno de 12 a 60% de todos os casos de câncer de mama, sendo o gene que se apresenta mais mutado nesta neoplasia (Olivier e Hainaut, 2001), e a presença dessas alterações está associada com os tipos de tumores mais agressivos, porém ainda não está esclarecido se as mutações se restringem a um subtipo específico desta neoplasia (Hainaut e Hollstein, 2000).

Alterações genéticas no *TP53* são apontadas como um fator de mau prognóstico em câncer de mama, já tendo sido observada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutações no gene e um prognóstico ruim para esta neoplasia (Soong *et al.*, 1997; Simão *et al.*, 2002). Entretanto, evidências de que tumores sem mutação respondem melhor à terapia do que tumores apresentando mutações são limitadas (Olivier e Hainaut, 2001).

As mutações encontradas em *TP53* podem ser somáticas, ocorrendo no tecido tumoral ou germinativas, ocorrendo em todas as células do organismo, incluindo células reprodutivas, o que caracteriza a Síndrome de Li-Fraumeni. Mutações somáticas encontradas entre os cânceres humanos que foram identificados por seqüenciamento, apresentam 87,2% de substituições de uma única base e 12,8% apresentam mutações mais complexas, deleções e inserções. As mutações que promovem a troca de

aminoácidos (*missense*) são observadas em 231 dos 393 códons (Hainaut e Hollstein, 2000), enquanto que as mutações silenciosas representam 3,9% das mutações descritas (Strauss, 1997). De todas as mutações já identificadas, 93% estão presentes no domínio de ligação ao DNA e correspondem aos exons 5,6,7,e 8 do gene *TP53*. As inserções, deleções e códons de terminação representam 48% das mutações no domínio N-terminal e 60% no C-terminal, mas apenas 17% no domínio de ligação ao DNA (Hainaut e Hollstein, 2000).

O câncer de mama esporádico apresenta um perfil de mutações muito similar ao de outros tipos de câncer, porém com menos transversões G:C>T:A (9% contra 15% nos demais tipos de câncer) e mais transições A:T>G:C (15% contra 11% em outros cânceres) (IARC, 2005). A alta frequência de G:C>T:A em alguns tipos de câncer, como câncer de pulmão em fumantes e carcinoma hepatocelular relacionado à aflatoxina, é atribuída ao importante papel de carcinógenos em sua etiologia. A prevalência destas transversões em câncer de mama é similar à encontrada em outros cânceres que não os de pulmão e fígado. O tipo mais frequente de mutação observado é de transições G:C>A:T, distribuídas entre sítios CpG e não CpG. No geral, o padrão de mutações no *TP53* em câncer de mama não mostra qualquer aspecto que o distinga significativamente de outros tipos de câncer (Olivier e Hainaut, 2001).

Cinco dos seis códons mais mutados codificam resíduos de Arginina (175, 248, 249, 273 e 282) e representam 25% de todas as mutações. Estas argininas exercem um papel bem definido nas interações DNA-proteína, seja pelo contato direto com o DNA (248, 273) ou por contribuir para a estabilidade na superfície de ligação ao DNA (175, 249 e 282) (Cho *et al.*, 1994). Mutações nestes resíduos inativam a proteína p53 por

impedir o contato com o DNA ou através da desestabilização da superfície de ligação. Porém, muitos outros sítios de mutação estão espalhados no domínio e provavelmente inativam a p53 alterando a arquitetura global do domínio de ligação ao DNA (Hainaut e Hollstein, 2000).

Como já mencionado, mutações no gene *TP53* não ocorrem apenas a nível somático, mas também em linhagens germinativas. A detecção dessas mutações germinativas é importante na identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver câncer (Frebourg *et al.*, 1992). Mutações germinativas em *TP53* predisõem uma variedade de tumores malignos de desenvolvimento precoce incluindo câncer de mama, câncer cerebral, sarcoma ósseo e carcinoma adrenocortical (Varley *et al.*, 2001). Essas mutações foram inicialmente relatadas em pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome rara de câncer familiar, onde parentes afetados desenvolvem diversos tumores malignos (Frebourg *et al.*, 1992; Kleihues *et al.*, 1997). Atualmente existem muitos trabalhos na literatura identificando mutações germinativas no gene *TP53* em famílias com a síndrome de Li-Fraumeni clássica (LFS), de “*Li-Fraumeni like*” (LFL) ou em famílias incompletas para ambas as classificações, além de grupos de pacientes com tipos particulares de tumores ou com múltiplos cânceres (Varley *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003).

Além das mutações, vários polimorfismos têm sido descritos no gene *TP53*. A presença dessas alterações pode acarretar aumento, diminuição ou perda da função da proteína polimórfica. Até o momento 21 polimorfismos já foram observados no gene *TP53*, sendo localizados tanto em exons como em introns. Alguns estudos têm investigado uma possível associação dos polimorfismos do gene *TP53* com o risco para

diferentes tipos de câncer, sendo os polimorfismos do intron 3 (inserção de 16pb), exon 4 (Arg72Pro) e intron 6 (G→A) associados ao câncer de mama. Todos os três polimorfismos exibem um forte desequilíbrio de ligação. Entretanto, cinco estudos analisando os três polimorfismos do gene não encontram nenhuma associação com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama. Surpreendentemente, o risco de desenvolver câncer de mama para homozigotos polimórficos diminuiu nos três polimorfismos estudados (de Jong *et al.*, 2002).

O espectro total de mutações encontrado na linhagem germinativa é similar à observada em tumores esporádicos, sendo predominantemente mutações *missense* (~75%) em regiões codificadoras do gene no domínio central de ligação ao DNA (exons 5 a 8), resultando em um defeito na ação transcricional do gene (Kleihues *et al.*, 1997; Varley *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003). Entre as mutações pontuais, transições G:C→A:T são mais frequentes, seguidas de A:T→G:C e transversões G:C→T:A. Aproximadamente 50% das transições G:C→A:T são em sítios CpG (Kleihues *et al.*, 1997). Todos os outros tipos de mutações são observados: mutação *nonsense*, deleções ou inserções em seqüências repetitivas que podem ser explicadas por erros durante a replicação do DNA, e mutações em sítios de *splicing* responsáveis pela falta de exons, retenção de introns ou ativação de sítios críticos de *splicing* (Chompret, 2002).

O tipo de câncer mais frequente em pacientes portadores de mutação germinativa no *TP53* com história familiar positiva é o câncer de mama (30.6%), seguido de sarcoma (17.8%), tumor cerebral (14%), sarcoma ósseo (13.4%), e carcinoma adrenocortical (6.5%). Os menos frequentes incluem pulmão, sistema hematopoético, estômago, colo retal, pele e ovário (Olivier *et al.*, 2003).

1.4 – Síndrome de Li-Fraumeni (LFS):

A descoberta em 1990 de mutações germinativas associadas a uma complexa síndrome de câncer familiar, abriu uma ampla área de pesquisa (Kleihues *et al.*, 1997). Muitas síndromes de predisposição ao câncer têm sido identificadas devido à ocorrência de múltiplos cânceres agregados em uma mesma família. Estudos epidemiológicos são necessários para se distinguir entre causa ambiental e genética, e em muitos casos há a confirmação da existência da predisposição hereditária. Um exemplo é a síndrome de Li-Fraumeni (OMIM #151623), que foi inicialmente descrita em 1969 e confirmada subsequentemente por vários estudos epidemiológicos (Varley, 2003). Estudos em diferentes séries de famílias confirmaram que agregado de tumores malignos nas famílias LFS ocorre devido à predisposição hereditária e não por fatores ambientais (Patrikidou *et al.*, 2002)

A síndrome de Li-Fraumeni representa uma das mais devastadoras predisposições genéticas ao câncer (Bougeard *et al.*, 2003), sendo uma doença autossômica dominante rara caracterizada por tumores malignos agrupados em famílias, com a predominância de sarcomas, câncer de mama, tumores cerebrais, e carcinomas adrenocortical diagnosticados antes dos 45 anos de idade. Outros cânceres, tais como leucemia, câncer de pulmão, melanoma, câncer gástrico, câncer pancreático, e câncer de próstata estão presentes em excesso em algumas famílias e, em alguns casos, tumores de células germinativas, e tumor de Wilms são também relatados (Olivier *et al.*, 2003). Diante desse espectro, foi verificado que a LFS está associada com uma variedade de diferentes tipos de tumores ocorrendo sobre uma ampla faixa de idade, incluindo a infância (Varley, 2003).

Uma definição da LFS originada do trabalho de Li e Fraumeni de 1988 tem como critério um probando com sarcoma diagnosticado antes de 45 anos, com um parentesco em primeiro grau com qualquer câncer diagnosticado antes de 45 anos, além do parentesco de primeiro ou segundo grau na mesma linhagem familiar com qualquer câncer antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma em qualquer idade. Birch e colaboradores em 1994 formularam a definição para LFL baseando-se em informações mais extensas e atualizadas dos tipos de tumores e idades dos indivíduos das famílias afetadas. LFL é definido como um probando com qualquer tumor infantil, ou um sarcoma, tumor cerebral ou adrenocortical diagnosticado antes dos 45 anos, além do parentesco de primeiro e segundo grau na mesma linhagem familiar com um tumor típico da LFS em qualquer idade, e outro parentesco de primeiro ou segundo grau na mesma linhagem familiar com qualquer tipo de câncer antes dos 60 anos (Varley, 2003).

A frequência de mutações germinativas no gene *TP53* é descrita em aproximadamente 70% dos casos de LFS, 20% em LFL e 6% em casos de história familiar com critérios incompletos para Li-Fraumeni (Chompret, 2002). Devido à alta penetrância, mulheres com a LFS têm 80% de risco de desenvolver câncer de mama (Lehman *et al.*, 2000), sendo seu risco relativo 18 vezes maior para mulheres com menos de 45 anos quando comparado a mulheres da população geral (de Jong *et al.*, 2002). Este excesso é maior em mulheres com idade inferior a 20 anos e declina com o aumento da idade, onde o risco relativo de câncer de mama após os 45 anos é igual a 1.8 (de Jong *et al.*, 2002). Famílias com LFS têm um aumento de 50% na incidência de múltiplos cânceres primários até os 30 anos de idade comparados ao da população de

1% (Martin *et al.*, 2003). Além disso, estima-se que mais de 90% dos portadores de mutação germinativa no *TP53* desenvolverão câncer até 70 anos (Martin *et al.*, 2003).

Em pacientes pertencentes a famílias com LFS portadores da mutação hereditária, células normais são heterozigotas (p53 wt/mt), enquanto em algumas células cancerígenas o alelo selvagem foi perdido ou inativado por um mecanismo somático (Hainaut e Hollstein, 2000). A perda do alelo selvagem é menos comum em tumores de pacientes com mutação no domínio central do gene, pois em geral essas mutações tem ganho-de-função e/ou são dominantes e não precisam da perda do alelo selvagem para desenvolver o tumor, diferentemente dos pacientes com mutação nula (*nonsense*, em sítios de *splicing*, deleções e inserções), onde a inativação ou deleção do alelo selvagem deve ocorrer para que o tumor se desenvolva (Varley, 2003). Apesar de estudos experimentais mostrarem que o alelo selvagem mantém a capacidade de suprimir a proliferação celular mesmo na presença do alelo mutado (Hainaut e Hollstein, 2000), experimentos com camundongos nocautes heterozigotos (*Trp53^{+/-}*) apresentaram desenvolvimento de tumores espontâneos precocemente, assim como, na LFS em humanos. Tal resultado indica que a p53 é haploinsuficiente para supressão de tumor, já que a redução da dose de p53, resultado da heterozigozidase mostrou em muitos tecidos de camundongos um nível intermediário da atividade transcricional, do controle celular e da apoptose, quando comparado a células selvagens ou *Trp53^{-/-}* (Blackburn e Jerry, 2002).

Entretanto, as mutações germinativas de *TP53* não são responsáveis por todos os casos de LFS, 20-30% das famílias afetadas pela LFS não são portadores da mutação no gene (Lehman *et al.*, 2000; Varley, 2003). Na maioria dessas famílias, o defeito

genético responsável pela predisposição ao câncer permanece desconhecido, embora mutações no gene *CHEK2* já terem sido relatadas em um pequeno grupo de famílias com LFS (Attwool *et al.*, 2002).

Alterações genéticas afetando proteínas da via de sinalização de p53 podem produzir fenótipos idênticos à LFS como *CHEK1* e *CHEK2* (Chompret, 2002). Mutações em *CHEK2* foram encontradas em quatro casos de LFS/LFL, porém dois deles não foram confirmados sendo um dos casos mais tarde mostrado em um fragmento homólogo localizado no cromossomo 15 e o outro um polimorfismo (Chompret, 2002). Outros genes envolvidos nas vias de sinalização do *TP53*, apoptose ou controle do ciclo celular, como *MDM2*, *TP63*, *BCL10*, *CDKN2A* e *PTEN* têm sido considerados como genes candidatos para LFS, mas todos os estudos com esses genes tiveram, entretanto, um resultado negativo (Bougeard *et al.*, 2003). Desse modo, a LFS é raramente atribuída a esses genes (Chompret, 2002).

Alguns estudos tentam relacionar o tipo de mutação com o tipo de câncer desenvolvido, porém essas associações tecido/célula específico com a mutação germinativa herdada ainda permanece incompreendido (Varley, 2003). Por outro lado, existe um aumento na evidência de que o *background* genético das famílias afetadas pode influenciar no alvo como órgão específico de indivíduos da mesma família. Uma explicação alternativa seria que algumas famílias têm sido expostas a carcinógenos ambientais similares ou fatores de estilo de vida, facilitando a tumorigênese em determinados tecidos alvos (Kleihues *et al.*, 1997).

2 – OBJETIVOS:

Desde a descoberta do envolvimento do gene *TP53* na LFS, a definição clínica clássica da LFS tem sido revisada por vários grupos de pesquisa, já que algumas famílias que carregam a mutação não preenchem os critérios definidos (Olivier *et al.*, 2003). Diante disso, o trabalho teve como objetivos:

► Determinar a frequência de mutações germinativas nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*, em mulheres com alta incidência de câncer de mama e múltiplos cânceres primários na família, residentes no estado do Rio de Janeiro.

► Comparar as mutações germinativas identificadas com o banco mundial de dados de mutações do *TP53* da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC).

► Uma vez identificadas as mutações, analisar a família dos indivíduos portadores da mutação e caracterizar a suscetibilidade das famílias ao câncer.

3 – MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 – Os Pacientes:

Este trabalho consistiu em um estudo transversal, onde amostras de DNA foram analisadas para determinação da frequência de mutações em *TP53* em mulheres com história de suscetibilidade genética pessoal e familiar ao desenvolvimento do câncer.

As mulheres eram participantes do Projeto Câncer de Mama e Genética que criou o Banco Nacional de DNA (BNDNA) coordenado pelo Dr. Roberto Vieira, onde amostras de DNA, extraídas de sangue periférico de mulheres residentes de vários estados brasileiros, foram armazenadas para estudo de suscetibilidade ao câncer de mama e ovário.

Foram utilizadas nesse estudo 104 amostras de DNA pertencentes ao BNDNA provenientes de mulheres portadoras de câncer de mama (11 mulheres – 10%) e mulheres não portadoras de câncer de mama (93 mulheres – 90%), todas com forte história familiar de câncer, principalmente mama, residentes no Estado do Rio de Janeiro. Todas as amostras utilizadas também foram analisadas, em parte, dos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* em um estudo prévio. As pacientes foram cadastradas e acompanhadas no ambulatório de Ginecologia do IFF/FIOCRUZ sob supervisão do Dr. Roberto Vieira. A coleta de dados para a caracterização e atualização das pacientes foi obtida através de prontuários.

3.2 – Métodos:

Todas as amostras extraídas foram analisadas para a detecção de mutação nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene TP53. Caso alguma amostra apresentasse alterações no método de triagem (SSCP), e esta alteração fosse confirmada por seqüenciamento como sendo uma mutação no gene, a família do probando também era analisada para detecção da mutação no gene TP53. Após esta análise, resolvemos estender a investigação para uma análise citogenética do cromossomo 17 a fim de identificar a causa da alta freqüência de cânceres na família da probanda, quando a mutação da probando não fosse encontrada nos demais membros da família. Além disso, os polimorfismos nos intron 3 e exon 4 do gene *TP53*, tanto do portador da mutação quanto aos familiares quando disponíveis, também foram genotipados para verificar a distribuição desses polimorfismos dentro de uma mesma família (**figura 5**).

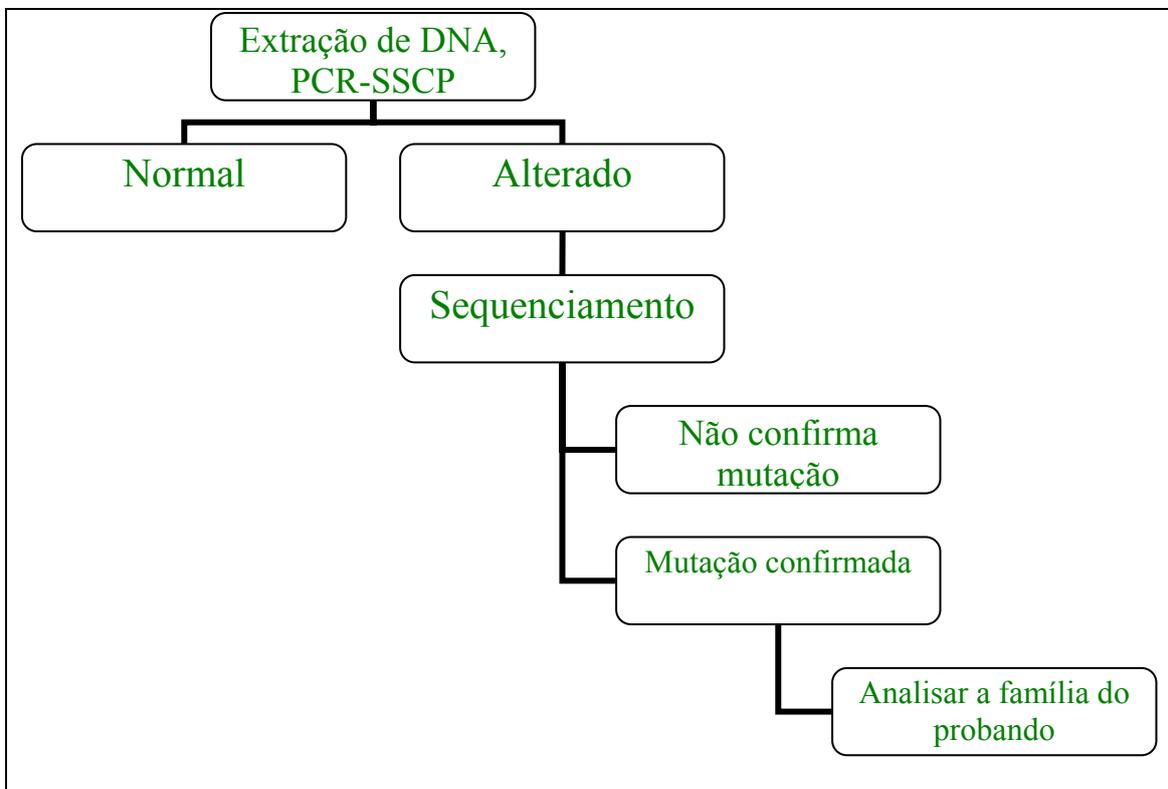


Figura 5: Organograma explicativo da ordem e aplicação das técnicas utilizadas.

3.2.1 – Extração de DNA:

O DNA foi extraído a partir dos linfócitos de sangue periférico total segundo Miller *et al.* (1988). Dez mililitros de sangue foram diluídos em 35mL de tampão de lise de hemácias (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 Mm, EDTA 1,0 mM pH 7,4). Após 30 minutos à temperatura de aproximadamente 4°C, o material foi homogeneizado lentamente e centrifugado a 1800 rpm por 12 minutos (Centrífuga EPPENDORF). Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 10 mL do tampão de lise de hemácias. O material foi novamente centrifugado a 1800 rpm por 12 minutos e o processo foi repetido até se obter um precipitado branco. Em seguida o material foi ressuspenso em 3 mL de tampão de lise de núcleo (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2,0 mM pH 8,2), e homogeneizado. Foram, então, adicionados 150 µL de SDS 10% (100 g de dodecil sulfato de sódio em 1000 mL de H₂O) misturando levemente e 200 µL de proteinase K (50 µg/mL). O material foi incubado a 37°C durante aproximadamente 18 horas. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de NaCl saturado, sendo o material misturado por 15 segundos e centrifugado por 10 minutos 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon ao qual foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. O DNA foi precipitado e transferido para um tubo eppendorf ao qual foram adicionados 500 µL de etanol 70%. Depois de nova centrifugação a 1400 rpm (Microcentrífuga EPPENDORF 5415F) por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante, o material foi seco à temperatura ambiente e em seguida ressuspenso em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0).

3.2.2 – Quantificação do DNA:

A estimativa da quantificação de DNA das amostras foi obtida após eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X, por comparação com o marcador de massa molecular (DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hind III*) (100 ng/ μ L). A corrida ocorreu por 2 horas a 65 volts, após a qual o gel foi corado em solução contendo brometo de etídio (5 μ g/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR):

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar as regiões dos DNAs genômicos correspondentes aos exons 5 (303 pb), 6 (231 pb), 7 (204 pb) e 8 (255 pb) do gene *TP53*. Quatro pares de oligonucleotídeos senso e antisense foram sintetizados pela firma IMPRINT DO BRASIL:

Exon 5: SENSO – 5' TGTTTGTTTCTTTGCTGCGCTGT 3'
ANTISENSE – 5' CCCTGTCGTCTGTCCAGCCC 3'

Exon 6: SENSO – 5' GGGGCTGGAGAGACGACAGG 3'
ANTISENSE – 5' AACCCCTTAACCCCTCCT 3'

Exon 7: SENSO – 5' CTCATCTTGGGCCTGTGTT 3'
ANTISENSE – 5' GGGTCAGCGGCAAGCAGAG 3'

Exon 8: SENSO – 5' CTGCCTCTTGCTTCTCTTTT 3'
ANTISENSE – 5' GAGGCAAGGAAAGGTGATAA 3'

Figura 6: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação específica dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* (Ahomadegbe *et al.*, 1995)

Na reação de PCR de 50 μL de volume final, utilizou-se: 5 μL de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl – pH 8,3 – e 50 mM de KCl), 1,5 μL de MgCl_2 50 mM (BIOTOOLS), 4 μL de mistura de dNTPs a 2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – PHARMACIA), 1,0 U de *Tth* DNA polimerase (BIOTOOLS), 2 μL de cada oligonucleotídeo a 10 pmoles/ μL (**Figura 6**), 200 ηg da amostra de DNA a ser analisada e água milliQ estéril para completar 50 μL . A amplificação foi realizada na máquina de PCR (MJ RESEARCH, INC e EPPENDORF – MASTERCYCLE GRADIENT), com uma pré-desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo em três etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C para os exons 5 e 6, 60°C para o exon 7 e 58°C para o exon 8 por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. Um ciclo adicional foi realizado por 10 minutos a 72°C (Ahomadegbe *et al.*, 1995). Após a reação, a eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para verificar se os produtos de PCR tinham sido amplificados como deveriam.

3.2.4 – Polimorfismo de Conformação de DNA Fita Simples (*Single Strand Conformation Polymorphism – SSCP*):

Este método permite detectar, por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, alterações no padrão de migração que pode corresponder a mutações na molécula de DNA. Uma simples troca de base, uma deleção ou inserção é suficiente para que ocorra uma mudança na migração eletroforética do fragmento de DNA em estudo.

Após a amplificação do DNA por PCR, 3 μL do produto da reação foram desnaturados com 6 μL da solução composta por 95% de formamida, 100 mM EDTA e

corante (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) – MERCK, aquecido por 5 minutos a 95°C e posteriormente colocados no gelo. Foram aplicados 9 µL do preparado em gel de poliacrilamida 8%. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, por aproximadamente 18 horas em uma voltagem constante de 60 volts em uma cuba de eletroforese vertical modelo v16-2 (LIFE TECHNOLOGIES).

A) Composição do Gel de Poliacrilamida 8%:

O gel foi composto de 8,0 mL de solução de acrilamida:bis (acrilamida 30% - 29:1) (PHARMACIA), 6,0 mL de tampão TBE 5X (0,45 M Tris-borato e 0,01 M EDTA – PROMEGA), 15,74 mL de água destilada, 0,25 mL de persulfato de amônio 10% (APS – MERCK) e 15 µL de N’N’N’N’tetrametiletilenodiamina (TEMED – GIBCO BRL) (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.5 – Coloração por Prata:

Após a corrida eletroforética, as placas foram desmontadas, e o gel foi transferido para uma solução fixadora de ácido acético 10% (MERCK), ficando totalmente submerso na solução e sob agitação lenta por 20 minutos, para a fixação das bandas de DNA. Após a fixação, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada, por 2 minutos e então transferido para uma solução de nitrato de prata (0,1% de nitrato de prata, 0,15% de formaldeído – MERCK) por 30 minutos. Transcorrido este tempo, o gel foi novamente lavado com água destilada por 10 segundos e revelado em solução contendo 3% de Na₂CO₃ anidro, 0,15% formaldeído e 0,02% de tiosulfato de sódio 10 mg/mL (MERCK) até o aparecimento das bandas. Após essa etapa, o gel foi

imediatamente transferido para uma solução de ácido acético 10% para bloqueio da revelação. O gel foi seco entre duas folhas de papel celofane presas a uma placa de vidro e fotografado utilizando o sistema Kodak Digital Science 1D e tanto o gel quanto o registro da imagem foram arquivados.

3.2.6 – Purificação do Produto de PCR:

Antes do seqüenciamento, todos os produtos de PCR foram purificados de acordo com o método WIZARD SV Gel e PCR Clean-up system (PROMEGA).

3.2.7 – Seqüenciamento:

As amostras foram seqüenciadas pelo programa “Plataforma de seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ” no seqüenciador 48 – Capilar ABI 3730 DNA Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS). Este programa visa à otimização dos aparelhos de seqüenciamento da FIOCRUZ, onde pesquisadores da instituição que tem interesse em seqüenciar amostras de sua pesquisa devem se cadastrar pelo site do programa e, seguindo algumas regras, tem o direito de enviar amostras para seqüenciar gratuitamente e receber o resultado via e-mail.

O produto de PCR juntamente com os primers de seqüenciamento foram entregues aos responsáveis pelo programa e eles realizaram as reações, precipitações e seqüenciamento das amostras.

3.2.8 – Análise Citogenética:

A) Implante de Sangue Periférico (Bender, 1965; Moorhead *et al.*, 1960):

O implante das culturas de linfócitos, a partir do sangue periférico, foi realizado em tubos estéreis. Foram feitas culturas em duplicata e colocou-se em cada tubo 6 mL de meio RPMI-1640 (CULTILAB) contendo antibióticos para cultivo celular, 1,5 mL de soro fetal bovino (CULTILAB), 0,2 mL de fitohemaglutinina M (5%-CULTILAB), e 11 gotas de sangue total. As culturas ficaram incubadas a 37° C, durante 72 horas.

Um sistema idêntico ao anterior, porém com adição de BrdU e timidina em uma das culturas e brometo de etídio na outra, foi realizado em paralelo para a obtenção de cromossomos distendidos e com isso ser possível a análise em alta resolução. Uma hora e meia antes do término foram adicionadas 3 gotas ($\pm 0,05$ mL) de colcemid (CIBA 0.8 $\mu\text{g/mL}$).

B) Citologia (Hipotonização e Fixação):

Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm durante 10 minutos. Após este tempo, retirou-se o sobrenadante, homogenizou-se o precipitado com KCl (0.007 M) e permanecendo durante 30 minutos a 37° C para hipotonização. Centrifugou-se durante 10 minutos a 1800 rpm, retirou-se o sobrenadante, homogenizou-se o precipitado, e acrescentou-se fixador (Metanol:Ácido acético – 3:1(MERCK)). Este procedimento foi realizado até o sobrenadante estar límpido.

C) Preparação de Lâminas:

Retirou-se a suspensão celular do freezer, com cuidado para não ressolubilizar o decantado. Aproximadamente 2,5 mL de fixador foi removido e reservado em tubo cônico de 15 mL não estéril. O precipitado foi ressuspensão no líquido residual do tubo com a pipeta Pasteur. Com a pipeta Pasteur, duas gotas do pellet ressuspensão foram pingadas nas duas extremidades da lâmina, a qual foi seca em placa aquecedora a 50°C, e guardada em bandejas, devidamente identificadas, para posterior bandeamento.

D) Bandeamento GTG (Seabright, 1971):

Esta técnica é utilizada na rotina e pesquisa dos principais laboratórios de Citogenética Humana. Permite a identificação precisa de todos os pares de cromossomos após tratamento com tripsina e Giemsa.

As lâminas foram submetidas por 12 segundos à solução de tripsina (100 mg de Tripsina e 100 mL de Tampão Dulbecco (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 , 1,44 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e água deionizada até completar 1000 mL). Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato (6,81 g de KH_2PO_4 , 0,88 g de NaOH em 1000 mL de água destilada), e coradas por 3 minutos na solução de Giemsa 5% (água deionizada 70 mL, Tampão Fosfato 25 mL, Giemsa 5 mL – MERCK), e finalmente lavadas em água deionizada e secas ao ar livre.

3.2.9 – Identificação dos Polimorfismos do gene *TP53*:

As regiões contendo o íntron 3 e exon 4 do gene *TP53* foram amplificadas por PCR utilizando-se o mesmo par de oligonucleotídeos para essas regiões, sendo os oligonucleotídeos p5334R e p5334F (**figura 7**) utilizados na reação para a amplificação de um fragmento que contém tanto o íntron 3 quanto o exon 4 (Medina, 2001). Após a extração do DNA genômico, as amostras foram amplificadas através da técnica de PCR e os produtos da reação foram avaliados.

A) Amplificação do DNA por Reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

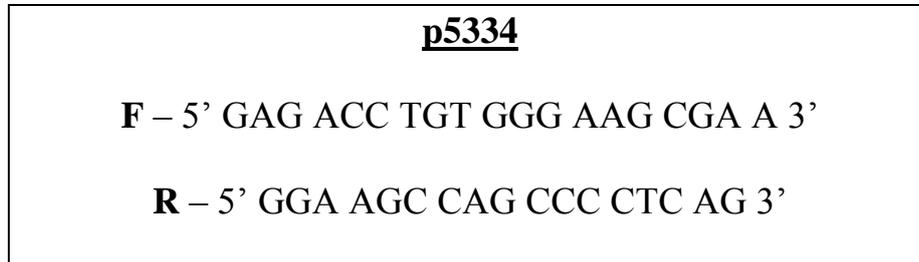


Figura 7: Oligonucleotídeos p5334F e p5334R utilizados para amplificar regiões polimórficas localizados no íntron 3 e exon 4 do gene *TP53* (Medina, 2001).

Para amplificação dos fragmentos de DNA por PCR foram utilizadas as seguintes condições: 5,0 µL de tampão de reação 10X (750 mM de Tris-HCl pH 9,0; 20 mM de MgCl₂; 500 mM de KCl e 200 mM de (NH₄)₂ SO₄ – BIOTOOLS); 0,25 U de *Tth* DNA polimerase (BIOTOOLS); 1,0 mM de MgCl₂ (BIOTOOLS); 4 µM da solução de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - PHARMACIA); 15 pmoles de cada

oligonucleotídeo (senso e antisenso); 200 ng de DNA genômico. O volume final da reação foi de 50 µL. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador M. J. RESEARCH modelo PTC-100. O ciclo térmico foi precedido por uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos e foi composto por 40 ciclos em três etapas: 95°C por 45 segundos, 61°C por 45 segundos, e 72°C por 45 segundos. Ao final dos ciclos foi acrescentada uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

B) Análise dos polimorfismos do gene TP53:

O estudo do polimorfismo do íntron 3 que corresponde a uma inserção de 16pb (PIN3) consistiu da análise direta dos produtos da reação de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em TBE 1X (0,09 M de Tris-Borato, e 0,002 M de EDTA – MERCK). A eletroforese era realizada à temperatura ambiente e conduzida à voltagem constante de 100V, por aproximadamente duas horas e trinta minutos. Após a corrida eletroforética, o gel era corado em uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, durante 10 minutos. Como padrão de massa molecular foi utilizado DNA controle amplificado com o mesmo par de oligonucleotídeos e com massa conhecida.

O estudo do polimorfismo do exon 4, que corresponde a uma troca de aminoácido no códon 72 substituindo arginina por prolina (Pro72), consistiu na digestão dos produtos da reação de PCR com a enzima de restrição *Bsh1236I* (FERMENTAS), isoesquisômero da enzima de restrição *BstUI*, e posterior análise em gel de agarose 1,5%. Sete microlitros do produto das PCRs foram digeridos com 1,25 U de *Bsh1236I* em 10 µL de reação, no tampão recomendado pelo fabricante, a 37°C, durante uma hora.

4 – RESULTADOS:

4.1 – Características da População Analisada:

Foram analisadas 104 amostras de DNA, extraídas de sangue periférico, de mulheres portadoras ou não de câncer de mama com forte história familiar de câncer de mama, residentes no Estado do Rio de Janeiro. A média de idade das mulheres analisadas sem câncer de mama foi de 44,0 anos e das mulheres afetadas de 37,5 anos. A **tabela 1** apresenta a distribuição do grau de parentesco dos indivíduos afetados com tumores malignos, pertencentes às famílias.

Tabela 1: Característica da população analisada.

CLASSIFICAÇÃO	QUANTIDADE (%)
Parente de 1º grau afetado com câncer	83 (79%)
Parente de 1º grau afetado CA de mama	68 (65%)
Parente de 2º grau afetado CA de mama	21 (20%)
Pacientes afetados com câncer de mama	11 (10%)
Número total de amostras analisada	104 amostras

Os dados da história familiar dos indivíduos estudados quanto à presença de câncer, foram revisados de modo que os relatos de todos os cânceres encontrados em todas as histórias familiares pudessem ser agrupados e contabilizados. O câncer de mama é o principal câncer relatado na história familiar da população analisada, atingindo 62% de todos os relatos (**tabela 2**).

Tabela 2: Tipos de cânceres relatados nas famílias dos indivíduos analisados.

Tipo de Câncer	Nº de Relatos dos Casos (%)
Mama	237 (62%)
Útero	28 (8%)
Ovário	24 (7%)
Pulmão	14 (4%)
Estômago	9 (3%)
Fígado	9 (3%)
Intestino	8 (2,5%)
Próstata	8 (2,5%)
Cólon	5 (2%)
Leucemia	5 (2%)
Cérebro	4 (1,5%)
Laringe	4 (1,5%)
Pele (não melanoma)	4 (1,5%)
Abdominal	4 (1,5%)
Ósseo	3 (1%)
Lipossarcoma	3 (1%)
Mediastino	2 (0,5%)
Cabeça e Pescoço	2 (0,5%)
Bexiga	2 (0,5%)
Rins	2 (0,5%)
Garganta	2 (0,5%)
Outros: { Vias biliares Melanoma Esôfago Vulva Gastrointestinal Vesícula Boca Orofaringe Reto	9 (3%)

4.2 – Detecção de Mutações Germinativas no Gene *TP53*:

Todas as 104 amostras foram analisadas através do método PCR-SSCP para detectar mutações nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*. Das 104 amostras, 12 mostraram uma possível alteração na migração eletroforética nos diferentes exons e foram seqüenciadas. Dessas amostras, apenas a amostra RJ229 pôde ser confirmada quanto à presença de mutação no exon 8. (**figura 8**).

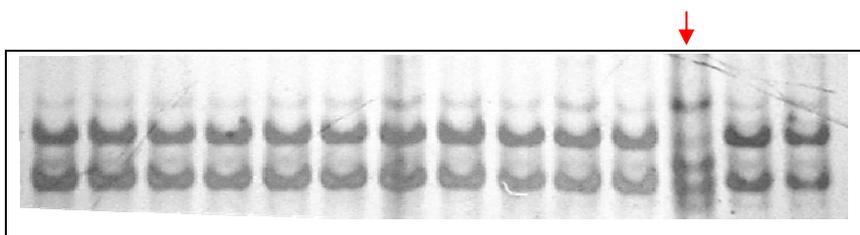


Figura 8: Análise do exon 8 das amostras de DNA genômico das mulheres do BNDNA, por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. A seta indica a amostra RJ229 com o perfil de migração eletroforética alterada no exon 8.

A alteração observada na amostra RJ229 (**figura 8**), foi confirmada pelo método DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) no IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (**figura 9**) e posteriormente seqüenciada no seqüenciador automático também do IARC. O DHPLC é uma técnica de biologia molecular muito utilizada como um método de triagem altamente eficaz na detecção de alterações genômicas.

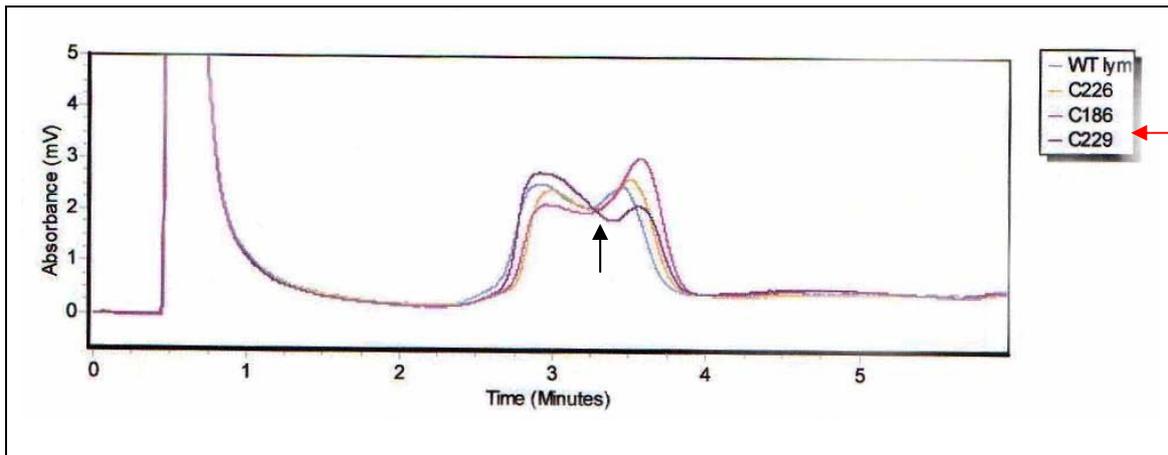


Figura 9: Confirmação da alteração da amostra RJ229 indicada pela seta.

A amostra sequenciada mostrou uma mutação do tipo *missense* no códon 282, considerado um *hot spot* do gene. A mutação ocorre em sítio CpG e é uma transversão G→C (**figura 10**), ocorrendo uma troca do aminoácido Arginina para o aminoácido Prolina. Isso confirma a condição do indivíduo como portador da síndrome de Li-fraumeni.

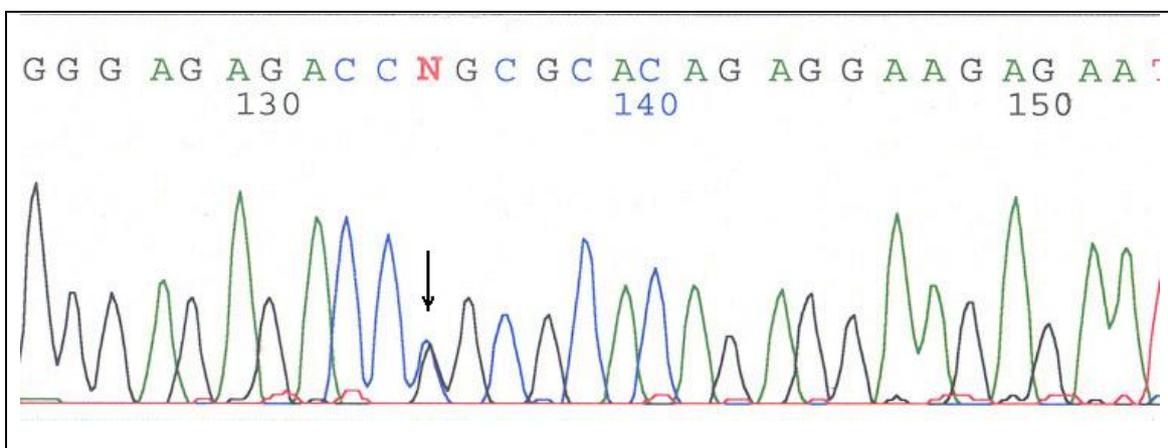


Figura 10: Eletroferograma correspondente ao Exon 8 da amostra RJ 229. A seta indica a mutação c.282G>C.

4.3 – Análise das mutações germinativas em TP53: pesquisa no banco de dados do IARC/TP53 database, R10:

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) é um órgão da OMS, de política de Pesquisa em Câncer e é onde está localizado o maior banco mundial de dados de mutações em *TP53*. Esse banco de dados coordenado pelo Dr. Pierre Hainaut e Dra. Magali Olivier (Olivier *et al.*, 2002), contém informações sobre todas as mutações, somáticas e germinativas, já descritas no gene *TP53* e permite a análise estatística da frequência dos tipos de mutações, seus efeitos e sítios tumorais mais encontrados. Esse serviço é gratuito e disponível na internet para comunidade científica e também, atualiza toda e qualquer mutação nova descrita no gene *TP53* (<http://www-p53.iarc.fr/>) Atualmente o banco já contabilizou 283 mutações germinativas, pertencentes a 280 famílias ou indivíduos, em 129 publicações.

As análises feitas no banco de dados de mutações em *TP53* mostram que o tipo de mutação mais freqüente é a troca de bases, do tipo *missense*, correspondendo a mais de 70% de todas as mutações (**figura 11**).

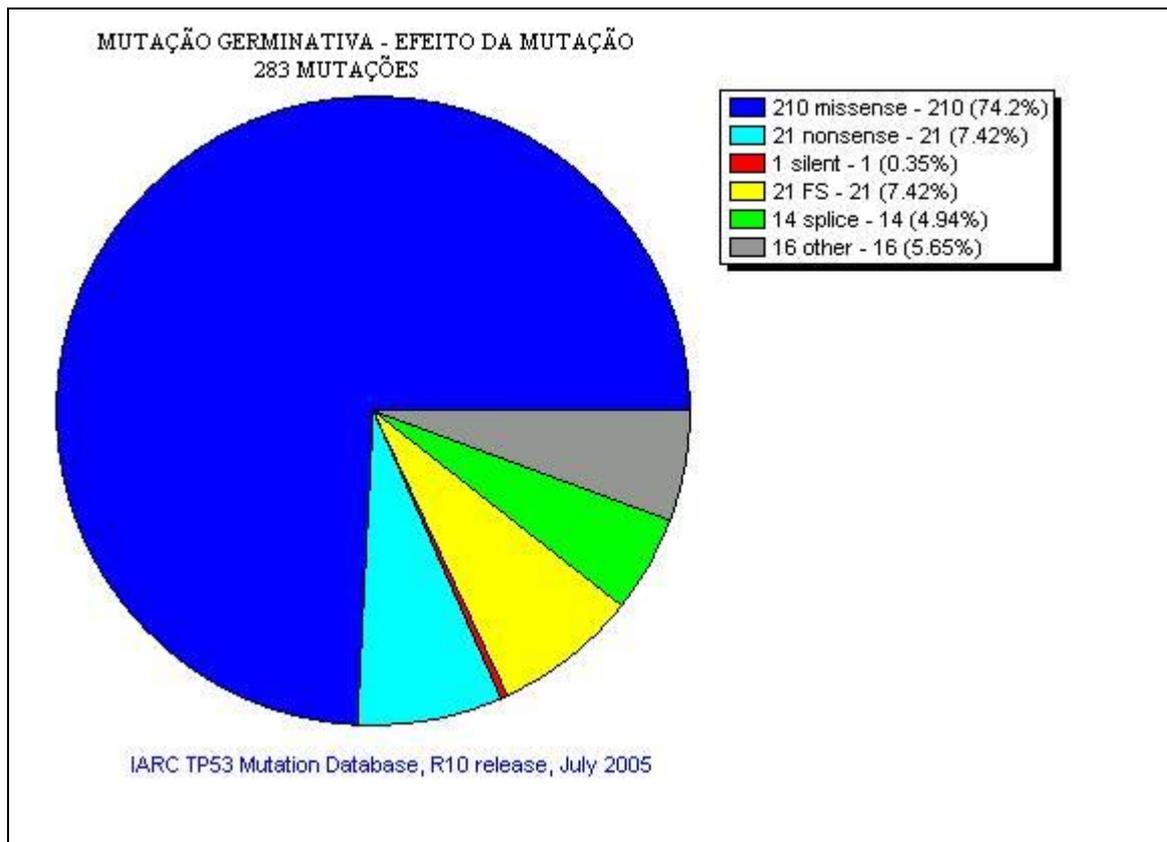


Figura 11: Representação da frequência dos diferentes tipos de mutações germinativas em *TP53*, segundo o seu efeito na proteína.

A **figura 12** mostra a frequência dos códons mais mutados nas mutações germinativas em *TP53*. Os códons identificados como mais freqüentes são considerados *hot spot* e são os códons 245, 248 337 e 173. A figura 6 mostra a frequência dos tipos mais encontrados de mutação germinativa, sendo a substituição G:C>A:T em sítios CpG as mais encontradas correspondendo a mais de 48%. Essas análises mostram o perfil das mutações germinativas encontradas em *TP53*, mostrando os códons mais afetados e mutações mais encontradas nas mutações germinativas (**figuras 12 e 13**).

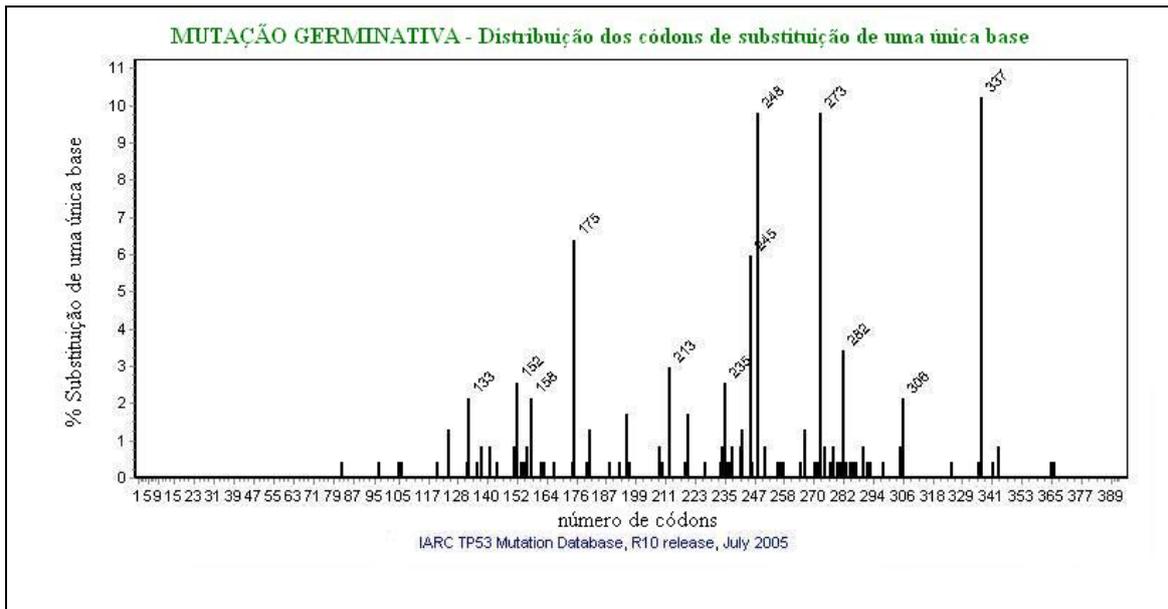


Figura 12: Representação da frequência e posição dos códons mais afetados nas mutações germinativas.

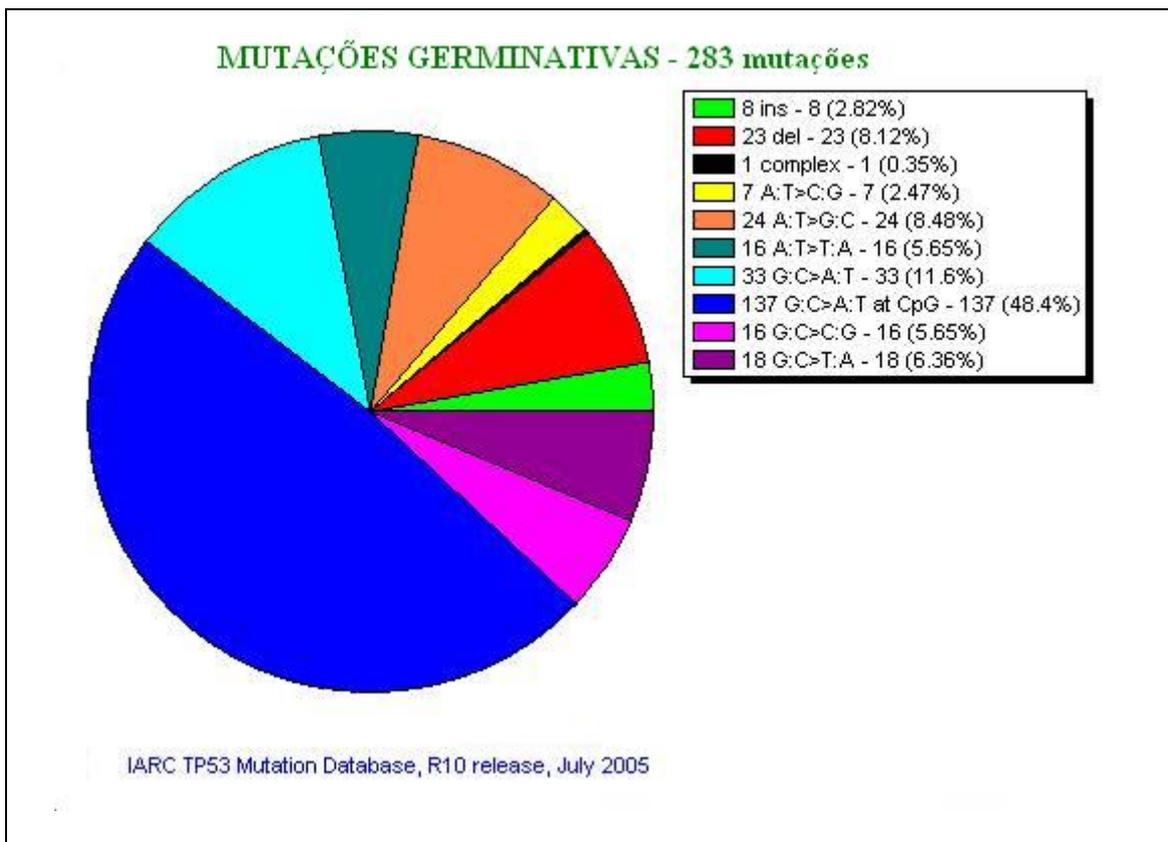


Figura 13: Representação dos tipos de mutações germinativas mais encontradas em *TP53*.

Outra análise feita com o banco de dados do IARC é a frequência dos tumores desenvolvidos devido às mutações germinativas no gene *TP53*. Em um total de 680 tumores desenvolvidos em indivíduos portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, o câncer mais frequente é o câncer de mama, representando 27,1% de todos os tumores malignos descritos (**figura 14**).

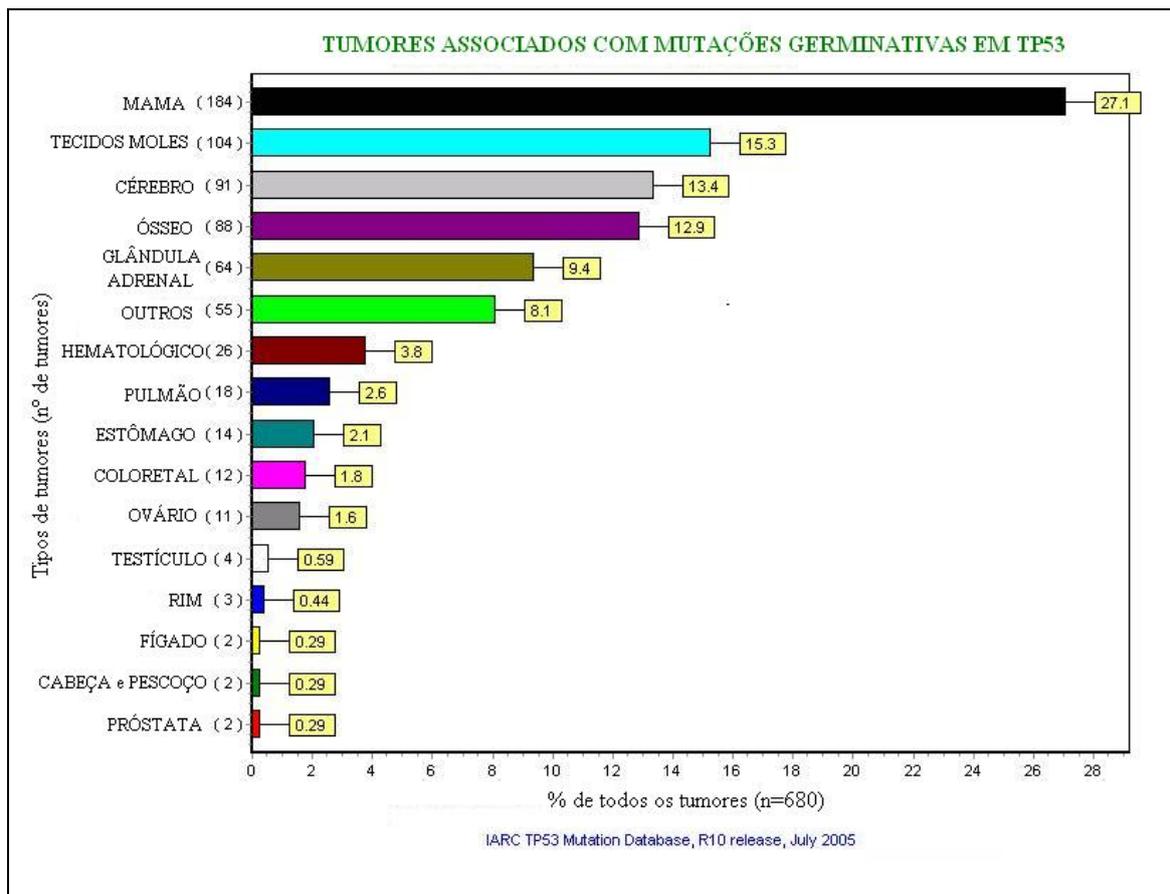


Figura 14: Tipos de tumores mais encontrados em mutações germinativas.

4.4 – Análise da Família do Indivíduo Portador da Mutação:

A família da portadora da mutação c.282G>C foi contactada, quando então fomos informados do falecimento da mesma. A família foi informada da pesquisa e do resultado da amostra RJ229, e as análises foram então estendidas aos demais membros da família. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, e doaram 5mL de sangue periférico para posterior extração do DNA. Além disso, cada participante passou por uma entrevista a fim de revelar novos dados da história familiar para a confecção de um novo heredograma (**figura 15**).

Nas informações obtidas através das entrevistas feitas com os indivíduos da família, 16 membros eram afetados por algum tipo de câncer, dos quais apenas três permanecem vivos. Diante disso, não foi possível analisar todos os membros da família, participando um total de 13 indivíduos onde 4 apresentavam algum tipo de câncer (**tabela 3**).

De acordo com os relatos, o câncer de mama foi o mais freqüente na família (**tabela 4**), sendo o perfil de tipos de câncer apresentados pela família muito semelhante ao perfil da população analisada.

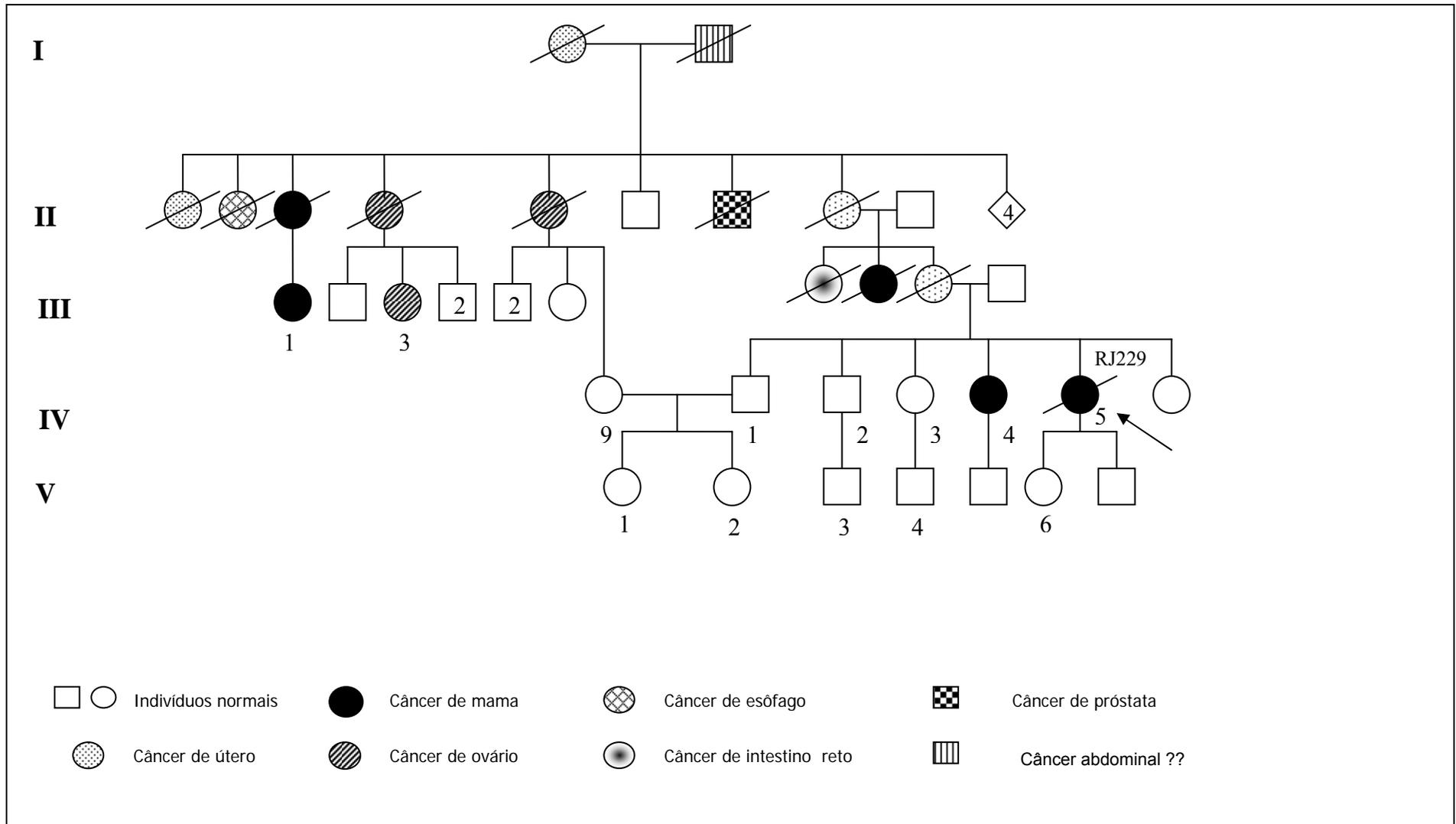


Figura 15: Heredograma da família da portadora da mutação c.282G>C (amostra RJ229).

Tabela 3: Características dos indivíduos analisados da família do portador da mutação.

Identificação dos Indivíduos	Sexo	Idade Atual	Tipo de Câncer	Idade do Diagnóstico
III.1	F	41	Mama	30
III.3	F	42	Ovário	38
III.9	F	36	_____	_____
IV.1	M	35	_____	_____
IV.2	M	40	_____	_____
IV.3	F	31	_____	_____
IV.4	F	38	Mama	38
IV.5 (RJ229)	F	Faleceu aos 25	Mama	24
V.1	F	6	_____	_____
V.2	F	3	_____	_____
V.3	M	3	_____	_____
V.4	M	11	_____	_____
V.6	F	11	_____	_____

*(_____) indivíduos sem câncer.

Tabela 4: Tipos de cânceres relatados na família do indivíduo RJ229.

Tipos de Cânceres	Número de Casos	Média da idade do diagnóstico
Mama	5	39
Útero	4	59
Ovário	3	54,6
Esôfago	1	58
Próstata	1	67
Intestino Reto	1	46
Abdominal	1	70
TOTAL	16	52,3

O exon 8 do *TP53* das amostras dos familiares do probando foi analisado por PCR-SSCP. Na análise de mutação c.2828G>C, nenhum membro da família da amostra alterada RJ229, apresentou alteração eletroforética, de modo que não foi preciso fazer o sequenciamento (**figura 16**).

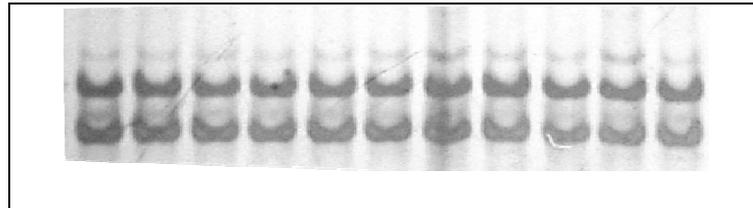


Figura 16: Análise do exon 8 das amostras de DNA genômico dos familiares do probando, por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. Todas as amostras demonstraram um perfil de migração eletroforética normal.

Além da análise mutacional, foi feita uma análise citogenética em um dos membros da família, afetado pelo câncer de mama (**figura 15**, indivíduo III.1). A análise citogenética teve como finalidade verificar a integridade dos cromossomos do indivíduo, principalmente a região 17p13 localizado o gene *TP53* (**figura 17**).

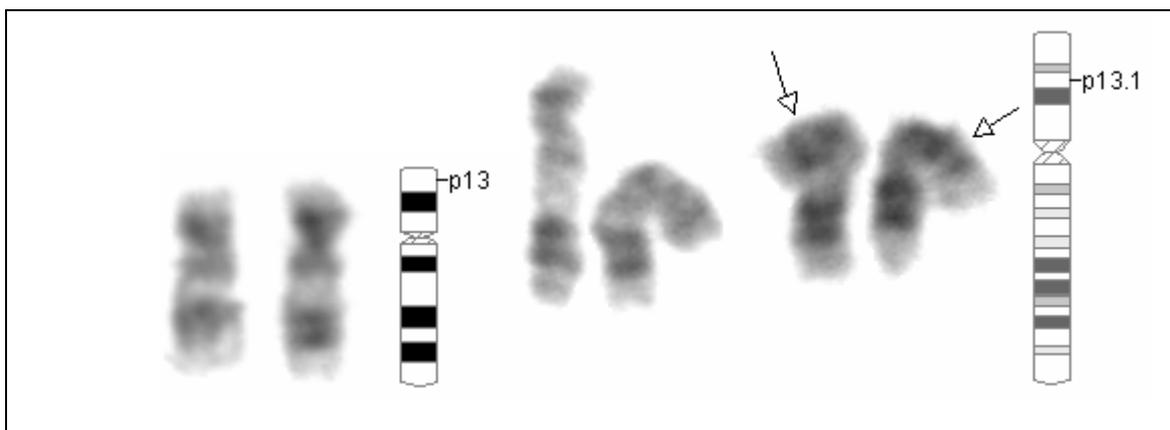


Figura 17: Idiograma do cromossomo 17. A seta indica a região 17p13.1 normal observada em ambos os cromossomos 17 do indivíduo III.1.

Os cromossomos foram obtidos a partir de cultura de células de sangue periférico total com e sem alta resolução, e a análise em bandeamento GTG procurando cromossomos altamente distendidos a fim de se observar melhor a região de interesse. Não foi encontrada nenhuma alteração cromossômica nesta amostra, e por isso tal análise não se estendeu para os demais membros da família.

Outra análise feita na família foi a determinação dos polimorfismos presentes no íntron 3 (PIN3) e o exon 4 (Pro72) do gene *TP53*, a fim de identificar o padrão polimórfico de uma família altamente susceptível ao desenvolvimento do câncer. O resultado desta análise está representado na **tabela 5**.

Tabela 5: Polimorfismos PIN3 e Pro72 no gene *TP53* analisado dos membros da família da amostra RJ229.

MEMBROS DA FAMÍLIA	ÍNTRON 3	EXON 4
III.1	NA	NA
III-3	NA	NA
III-9	2:2	R:P
IV-1	1:1	R:R
IV-2	1:1	R:R
IV-3	1:2	R:P
IV-4	1:1	R:R
IV-5 (RJ229)	1:2	P:R
V-1	1:1	R:R
V-2	1:1	R:R
V-3	1:2	P:P
V-4	1:1	R:R
V-6	1:2	R:P

Legenda:

Intron 3: 1:1 – homocigoto selvagem

1:2 – heterocigoto

2:2 – homocigoto polimórfico

NA – não amplificou

Exon 4: R:R – homocigoto selvagem

R:P – heterocigoto

P:P – homocigoto polimórfico

Dos 13 membros da família analisados para os polimorfismos do íntron 3 e do exon 4, 6 são homozigotos selvagens para ambos os polimorfismos analisados e 3 são heterozigotos para ambos os polimorfismos analisados. Dos 4 restantes, 2 não amplificaram, 1 é homozigoto polimórfico para o íntron 3 e heterozigoto para o exon 4 e, 1 é heterozigoto para o íntron 3 e homozigoto polimórfico para o exon 4. Observando a família podemos verificar uma predominância de alelos selvagens nos indivíduos, sugerindo talvez uma associação com a suscetibilidade genética ao desenvolvimento do câncer.

V – DISCUSSÃO:

Nas últimas décadas, diversos estudos têm se dedicado a aprimorar os métodos de diagnóstico e tratamento do câncer. Entretanto, o câncer de mama é o tumor maligno mais comum entre mulheres de todo o mundo, e mais de um milhão de novos casos são diagnosticados todo ano. A incidência e a taxa de mortalidade variam entre diferentes etnias, e embora a incidência tenha aumentado nos últimos 20 anos, o prognóstico tem melhorado devido ao diagnóstico precoce. Sabe-se que o câncer de mama está associado a diferentes tipos de alterações genéticas somáticas em oncogenes e genes supressores de tumor (Borresen-Dale, 2003).

Mutações no gene supressor de tumor *TP53* são a alteração gênica mais comum em câncer de mama, com uma frequência variando entre 12 a 60% dos casos. Essas mutações são mais frequentes em câncer de mama avançado, sugerindo que a inativação de *TP53* seja um evento tardio na carcinogênese mamária. Contudo, isso não exclui que algumas mutações estejam presentes em estágio precoce da doença, em particular em cânceres agressivos que progridam rapidamente para estágios avançados (Olivier e Hainaut, 2001; Simão *et al*, 2002).

Além disso, o câncer de mama é também o mais frequente tipo de câncer encontrado em pacientes com mutações hereditárias em *TP53*, sugerindo que mutações em apenas um alelo do gene podem predispor um câncer de mama precoce (Olivier e Hainaut, 2001).

A população estudada é constituída por mulheres selecionadas do ambulatório de ginecologia e mastologia do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ para participarem do projeto “Projeto Câncer de Mama e Genética” (BNDNA), um estudo genético de câncer de mama na população brasileira, cujo objetivo era avaliar o espectro mutacional dos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* nas famílias com história familiar positiva de câncer de mama. Apesar da alta frequência de tumores de mama nesta população, nem todas as mulheres participantes do projeto seguem os critérios presentes na síndrome de mama e ovário hereditários, tornando-se portanto, uma população interessante sob o ponto de vista de análise da suscetibilidade genética ao câncer de mama.

A síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-like têm critérios definidos, porém a definição clínica clássica da síndrome tem sido revisada por vários grupos de pesquisa, já que algumas famílias que carregam a mutação não preenchem os critérios estabelecidos (Olivier *et al.*, 2003). Como não existe nenhum estudo na população brasileira da frequência de mutação em *TP53*, achamos interessante estudar essas mulheres, mesmo sem que todas se enquadrassem nos critérios da síndrome de Li-Fraumeni ou da Li-Fraumeni-like, para avaliarmos a frequência de mutações neste gene no Brasil. Além disso, esta mesma população faz parte de um amplo estudo de suscetibilidade genética ao câncer de mama, que incluem não só análise dos genes *BRCA 1*, *BRCA 2* e *TP53*, mas também outras análises como polimorfismos dos genes *TP53*, *XRCC1* e *XRCC3*.

Mutações germinativas em *TP53* têm sido detectadas em aproximadamente 70% das famílias com a síndrome de Li-Fraumeni e 20% das famílias com a síndrome Li-Fraumeni-like (Chompret, 2002; Bougeard *et al.*, 2003). A ausência de mutações

germinativas em *TP53* detectada em algumas dessas famílias sugere o envolvimento de outros genes, no entanto, esta hipótese traz controvérsia (Bougeard *et al.*, 2003). O gene *CHK2* foi recentemente citado como um segundo gene candidato a síndrome de Li-Fraumeni, no entanto as expectativas não foram confirmadas. Atualmente mutações neste gene não são consideradas um alelo de alto risco e sim fatores modificadores de risco para alguns genes além dos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* (Evans *et al.*, 2002).

Outras síndromes genéticas ligadas ao aparecimento do câncer de mama não estão associadas a mutações em *TP53*, é o caso da Síndrome de Peutz-Jegher causada por mutações germinativas no gene *STK11/LKB1*, a síndrome de Cowden causada por mutações germinativas no gene *PTEN/MMAC1*, e a Ataxia Telangectasia associada a mutações no gene *ATM*.

Em famílias com múltiplos casos de câncer de mama que não preenchem os critérios para a síndrome de Li-Fraumeni, a frequência de mutações germinativas em *TP53* tem sido investigada em vários estudos, mostrando que mutações em *TP53* estão presente em < 1% das famílias com história de câncer de mama (Martin *et al.*, 2003). Porém, entre famílias com a síndrome de Li-Fraumeni, há uma grande incidência de câncer de mama precoce. Diante disso, esses dados sugerem que mutações germinativas em *TP53* têm forte associação com a suscetibilidade ao câncer de mama hereditário, mas quase exclusivamente no contexto da síndrome de Li-Fraumeni (Martin *et al.*, 2003).

Devido à alta penetrância do câncer de mama precoce e do aumento da incidência de múltiplos cânceres primários nas famílias com a síndrome de Li-

Fraumeni, o presente estudo investigou se mutações germinativas em *TP53* estão associadas com múltiplos cânceres primários em famílias com forte história familiar de câncer de mama sem evidências da síndrome de Li-Fraumeni.

Neste estudo, foram avaliados os exons 5 a 8 do gene *TP53*, onde concentram-se mais de 90% das mutações já detectadas por sequenciamento (Hainaut e Hollstein, 2000). Essas amostras também foram parcialmente analisadas, em outro laboratório, para os genes *BRCA 1* e *BRCA 2*. Os resultados parciais mostram que das 104 amostras analisadas neste trabalho, a amostra RJ086 apresentou uma mutação no exon 11 (4232 ins A) do gene *BRCA 2*, já as amostras RJ049 e RJ209 apresentaram polimorfismo no exon 10 (C1342 A) do gene *BRCA 2* (Narod, *et. al.* dados não publicados).

Mais de 18 mil mutações pontuais já foram detectadas no gene *TP53* (<http://www-p53.iarc.fr/>), sendo 97% somáticas e 3% germinativas e são predominantemente do tipo *missense*, principalmente transições guanina→adenina (Olivier *et al.*, 2002). A mutação encontrada neste estudo ocorre em sítio CpG no códon 282, localizado no exon 8 do gene, e é uma transversão G→C substituindo arginina por prolina (Arg→Pro). A mutação foi detectada em uma mulher com história pessoal de câncer de mama precoce seguida de óbito, e sua família possui múltiplos cânceres primários, além da alta incidência de câncer de mama precoce. Apesar de se tratar de uma mutação germinativa, não identificamos outro membro da família portando a mutação c.282G>C. Esta mutação, portanto, pode ser considerada uma mutação nova, provavelmente adquirida durante a formação embrionária do indivíduo ou em uma das células reprodutoras dos seus progenitores. Esta alteração pode ser transmitida aos descendentes, basta que a prole receba o alelo mutado do progenitor afetado, formando

assim um indivíduo heterozigoto para a mutação. Há ainda a possibilidade da prole não herdar a mutação já que o indivíduo portador da mutação também é heterozigoto, possuindo um alelo mutado e o outro normal.

Apesar da baixa frequência de mutação encontrada (1 caso em 104 (0,96%)), tal resultado corrobora com a frequência descrita na literatura (Martin *et al.*, 2003). Algumas famílias que preenchem os critérios para a LFS não possuem mutação germinativa no gene *TP53*, e algumas que possuem critérios incompletos para a LFS são portadoras de mutação germinativa no gene *TP53*, isso indica a importância da investigação de mutações em *TP53*, em famílias com história familiar de câncer de mama, já que a síndrome de Li-Fraumeni possui um caráter clínico complexo, e as famílias são muitas vezes, confundidas com um agrupamento casual de tumores ou mesmo com a síndrome de mama e ovário hereditários.

O fato de não ter encontrado um número maior de mutações no gene *TP53* pode estar relacionado com as características das mulheres analisadas. Mutações germinativas em *TP53* estão relacionadas quase que exclusivamente ao contexto da síndrome de Li-Fraumeni. Outro fator importante está relacionado com as regiões do gene analisadas. Apesar da alta frequência de mutações nos exons analisados (90%), o gene tem 10 exons codificantes, dos quais apenas 4 foram analisados, o que caracteriza um viés no estudo.

Sabe-se que o sequenciamento direto é o método mais preciso para identificação de mutações, porém o alto custo desta técnica a torna inviável na rotina. Por isso, muitos métodos de triagem têm sido utilizados para detectar mutações em genes de

interesse: imunohistoquímica, PCR-SSCP, DHPLC, entre outros. Dentre esses, o PCR-SSCP seguido de sequenciamento foi utilizado neste trabalho por ser relativamente simples, rápido, barato e eficaz em até 95% (Ren, 2000; Otero *et al.*, 2005). A técnica de SSCP pode detectar mutações pontuais, deleções e inserções, que promovem uma mudança conformacional no DNA de fita simples, devido a uma interação intramolecular diferente, e resultando numa mobilidade alterada em gel de poliacrilamida não desnaturante (Ru *et al.*, 2000). Portanto, seria interessante manter o mesmo método de triagem, PCR-SSCP, aumentando porém o número de exons analisados das amostras. Desse modo, poderia-se fazer uma avaliação mais precisa da frequência de mutações, em uma população que não corresponde aos critérios da síndrome de Li-Fraumeni.

Nas mutações somáticas, há apenas 15 estudos prévios relatando a mesma mutação no banco de dados do IARC (<http://www-p53.iarc.fr/>) (**tabela 6**), e apenas duas relatam esta alteração em tumor de mama. Em um dos estudos, Varley e colaboradores encontraram a mesma transversão G→C no códon 282 em uma biópsia de câncer de mama primário (Varley *et al.*, 1991). O segundo estudo, Conway e colaboradores (2002) mostraram a prevalência e espectro de mutações de p53 em fumantes com câncer de mama (Conway *et al.*, 2002).

Tabela 6: Trabalhos que encontraram a mesma mutação c.282G>C em uma das amostras analisadas.

Referências	População Analisada	Amostra	Nº de Amostra
Varley <i>et al.</i> , 1991	Inglesa	Biopsia de carcinoma de mama	97
Miller <i>et al.</i> , 1992	Americana	Câncer de pulmão	40
Burns <i>et al.</i> , 1993	Inglesa	Carcinoma celular escamoso gengiva	24
Lohmann <i>et al.</i> , 1993	Alemanha	Câncer de pulmão em fumantes	28
Lee <i>et al.</i> , 1994	Taiwan	Câncer de pulmão em fumantes	36
Farrugia <i>et al.</i> , 1994	Canadá	Linfomas	11
Poremba <i>et al.</i> , 1995	Alemanha	Carcinoma gástrico primário	56
Pekkola-Heino <i>et al.</i> , 1996	Finlândia	Carcinoma da cavidade oral (língua)	16
Casey <i>et al.</i> , 1996	Americana	Câncer de ovário	108
Tworek <i>et al.</i> , 1999	Americana	Carcinoma peritoneal	85
Mizobuchi <i>et al.</i> , 2000	Japonesa	Carcinoma de esôfago em fumantes moderados	39
Soong <i>et al.</i> , 2000	Austrália e Nova Zelândia	Câncer de colo retal	995
Conway <i>et al.</i> , 2002	Americana	Carcinoma intraductal infiltrante de mama em fumantes	456
Balz <i>et al.</i> , 2003	Alemanha	Carcinoma celular escamoso na laringe	123
Erill <i>et al.</i> , 2004	Espanha	Câncer de bexiga	76

As mutações mostrando transversões como a encontrada, costumam estar relacionadas a tumores esporádicos associados à exposição a carcinógenos (Olivier e Hainaut, 2001). Cânceres como o de pulmão e de fígado, por exemplo, apresentam alta prevalência das transversões G:C para T:A, que é atribuída à ação de carcinógenos como o benzo[*a*]pireno e a aflatoxina. Separando-se as mutações nos grupos de câncer de origem familiar e cânceres esporádicos, observou-se que as transversões G:C para

T:A não estão presentes no câncer de origem familiar. Isto sugere que a presença destas mutações no câncer esporádico foi consequência de mutações provocadas por carcinógenos no tecido mamário (Olivier e Hainaut, 2001).

Aproximadamente 90% das mutações encontradas na síndrome de Li-Fraumeni são mutações do tipo *missense*, em particular transições G→A em sítios CpG. Porém, todos os outros tipos de mutações podem ser observados: *nonsense*, deleções ou inserções em seqüências repetitivas que podem ser explicadas por erros durante a replicação do DNA (Chompret, 2002). Recombinações entre seqüências repetitivas em várias regiões do genoma humano são conhecidas por causar rearranjos no DNA associados com muitas alterações genéticas. Uma região caracterizada em produzir rearranjos está localizada no cromossomo 17p12 (Potocki *et al.*, 2000), região que flanqueia o gene *TP53*.

Otero e colaboradores (2005) analisaram o gene *TP53* em pacientes com leucemia mieloide crônica que possuíam aberrações cromossômicas em 17p. Dos três casos alterados citogeneticamente, apenas um caso mostrou alteração na corrida eletroforética por SSCP. Tais resultados sugerem que a alteração cromossômica pode anteceder as alterações no gene e significa que a cada divisão celular, uma nova falha pode ser acumulada (Otero *et al.*, 2005). Diante de tais observações, foi feita a análise citogenética do membro III-1 (**figura 15**) da família da amostra RJ229, uma prima de 2º grau que desenvolveu câncer de mama precocemente. A justificativa da escolha deste indivíduo para ser investigado na citogenética, foi devido ao grande comprometimento da irmã da probanda com metástase medular.

Não foi encontrada nenhuma aberração cromossômica na amostra analisada, mesmo quando o cromossomo foi analisado em alta resolução. Porém, a hipótese de *crossing-over* desigual em pequenas regiões que flanqueiam o gene *TP53* ainda não pode ser descartada sem antes uma avaliação por técnicas mais refinadas de citogenética molecular (Potocki *et al.*, 2000). Além disso, a técnica de SSCP possui uma especificidade para fragmentos de 100 a 300pb, e por isso nem todas as alterações podem ser detectadas (Otero *et al.*, 2005).

Muitos polimorfismos têm sido descritos no gene *TP53*. Alguns deles se localizam em regiões codificantes e alteram a função da proteína, porém outros polimorfismos se localizam em regiões não codificantes, íntrons, e seu papel no desenvolvimento do câncer ainda não estão bem estabelecidos (Varley *et al.*, 2001). A grande maioria dos polimorfismos identificados está localizada nos íntrons, fora dos sítios de *splicing* e apenas dois polimorfismos alteram a seqüência de aminoácidos, um sendo a substituição de serina para prolina na posição 47 e o outro uma substituição de arginina para prolina na posição 72. A variante Pro47 é um polimorfismo raro afetando um códon bem conservado na evolução, já o polimorfismo Pro72 tem sido observado com freqüência em diferentes etnias (de Moura Gallo *et al.*, 2005).

O exon 4, no qual se localiza o polimorfismo no códon 72 resulta em duas proteínas alternativas com diferenças biológicas e bioquímicas, afetando a função protéica. A variante p53 com o aminoácido prolina no códon 72 possui menor habilidade em induzir apoptose quando comparada com a proteína com o aminoácido arginina (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003). Foi observado em estudos recentes que os polimorfismos PIN3, *Msp1* e Pro72 nos íntrons 3, 6, e exon 4 respectivamente,

podem ser fatores de risco para o câncer de mama (Weston *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2001; Noma *et al.*, 2004).

Runnebaum e colaboradores mostraram uma associação entre o homozigoto polimórfico *p53*^{PIN3} e o aumento no risco para câncer de ovário na população alemã (Runnebaum *et al.*, 1995). Ainda na população alemã, Wang-Gohrke *et al.* (2002) sugeriu que a presença desse polimorfismo *p53*^{PIN3} confere um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com mais de 50 anos e com histórico familiar da doença. Entretanto, nenhuma associação foi observada por Lancaster e colaboradores em pacientes americanos com câncer de ovário e bexiga (Lancaster *et al.*, 1995).

Noma e colaboradores sugeriram que na população japonesa os homozigotos polimórficos (*p53*^{72Pro/Pro}) estão em risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de mama com receptores de estrogênio positivo em mulheres na pós-menopausa. A frequência de mutações somáticas em *TP53* é similar para heterozigotos *p53*^{72Arg/Pro} e homozigotos selvagens (*p53*^{72Arg/Arg}) sugerindo que a função da proteína não é danificada pela heterozigose. Em um estudo sobre a perda da heterozigose observaram-se números semelhantes para ambos os alelos, indicando que não há perda preferencial do alelo selvagem *p53*^{72Arg} (Noma *et al.*, 2004).

Papadakis e colaboradores observaram uma maior frequência do alelo selvagem *p53*^{72Arg/Arg} no grupo de indivíduos com câncer de mama, sugerindo que este alelo possa atuar como um fator de risco para o desenvolvimento da doença (Papadakis *et al.*, 2000). Os resultados obtidos por Buyru *et al* confirmam o resultado anterior e indicam que indivíduos portadores do alelo selvagem *p53*^{72Arg} possuem um risco de desenvolver

a doença três vezes maior do que indivíduos com os alelos polimórficos p53^{72Pro/Pro} (Buyru *et al.*, 2003).

Na análise dos polimorfismos PIN3 e Pro72 no íntron 3 e no exon 4 respectivamente, nos membros da família da amostra RJ229, encontramos 6 indivíduos homocigotos selvagem para ambas as regiões analisadas, o que corresponde a aproximadamente 46% do total da amostra e aproximadamente 23% do total da amostra são heterocigotos para ambos polimorfismos. De acordo com esses dados, 69% dos indivíduos analisados possuem pelo menos um alelo selvagem para o códon 72. Apesar desses dados não terem valores significativos devido ao baixo número de amostras analisadas, o alelo selvagem para o códon 72 é uma região indicada por muitos estudos como fator de risco para o desenvolvimento de câncer.

As divergências observadas em diversos estudos refletem as diferenças étnicas e epidemiológicas de cada população (Nkondjock e Ghadirian, 2004). Por enquanto, evidências de que polimorfismos no gene *TP53* possam ter funções na suscetibilidade ao câncer ainda devem ser estabelecidos (de Moura Gallo *et al.*, 2005). Contudo, diversos fatores de risco influenciam na frequência do câncer de mama na população e podem atuar como modificadores do risco (Nkondjock e Ghadirian, 2004).

Genes altamente penetrantes na suscetibilidade ao câncer de mama como *BRCA 1* e *BRCA 2* correspondem por menos de 20% do risco genético para o câncer de mama, e outros genes de alta penetrância como *TP53*, *ATM* e *PTEN* correspondem por menos de 5%. Isso porque, provavelmente, a herança mais comum no câncer é a poligenia (Pharoah *et al.*, 2004). O grande número de casos de câncer não atribuído aos genes de

alta penetrância poderia, em parte, estar associado a alterações gênicas ainda não descritas ou genes ainda não identificados (Ponder, 2001). Além disso, muitos casos de câncer familiar parecem estar relacionados às variações polimórficas na seqüência do DNA (Imyanitov *et al.*, 2004).

Por isso, o estudo de famílias com história positiva de câncer de mama é importante para que ocorra o diagnóstico correto. O diagnóstico preciso e a prevenção, fornecidos pelo aconselhamento genético, são ainda as formas mais eficientes de se lidar com o câncer familiar. O diagnóstico da mutação hereditária no gene *TP53* em uma família, explica a alta freqüência dos casos de cânceres na família e leva aos indivíduos da mesma a um monitoramento mais rigoroso, aumentando as chances do diagnóstico precoce e conseqüentemente a maiores chances de sobrevivida.

Atualmente estamos vivenciando uma fase de aperfeiçoamento técnico-científico na área do conhecimento de tratamentos de doenças genéticas. A terapia gênica, assim como a terapia com células tronco, é um modo absolutamente novo de se tratar as doenças humanas. Diante de várias tentativas bem sucedidas citadas pela comunidade científica de todo o mundo, fica claro que já atravessamos o estágio inicial onde se discutia a viabilidade prática desses novos conceitos. Entretanto, essas novas terapias encontram-se na sua infância e ainda não se sabe quando esses tratamentos será um procedimento largamente aplicado. Enquanto isso, o diagnóstico precoce e preciso ainda é a maneira mais eficiente de êxito no tratamento do câncer.

6 – CONCLUSÕES:

- Na análise da frequência de mutações germinativas nos exons 5 a 8 do gene *TP53*, em mulheres com forte história familiar de câncer de mama residentes no Estado do Rio de Janeiro, observamos que 0,96% (1 caso em 104) das amostras analisadas apresentaram mutações germinativas. O resultado corrobora com dados descritos na literatura.
- A mutação germinativa identificada na amostra RJ229 é uma transversão G→C que não corresponde ao perfil mutacional encontrado na maioria das alterações germinativas do gene. Transversões como a identificada têm sido encontradas associadas a fatores carcinogênicos, e ao que tudo indica ainda não foram descritas na literatura em mutações germinativas.
- Nenhum outro membro da família da mulher portadora da mutação c.282G>C apresentou a mesma alteração gênica apesar da alta incidência de cânceres nos familiares.
- O único indivíduo da família da amostra RJ229 analisado para aberrações cromossômicas, não apresentou nenhuma alteração na região 17p.
- O polimorfismo do exon 4 (Pro72) analisado revela uma maior porcentagem de indivíduos portadores do alelo selvagem na família estudada, o que pode sugerir risco aumentado na suscetibilidade do câncer de acordo com alguns estudos.
- O polimorfismo do íntron 3 (PIN3) também mostrou uma prevalência de indivíduos portadores do alelo selvagem.

• 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHOMADEGBE, J.; BARROIS, M.; FOGEL, S.; LE BIHAN, M.L.; DOUC-RASY, S.; DUVILLARD, P.; ARMAND, J.P.; RIOU, G. (1995). High Incidence of *TP53* Alterations (mutation, deletion, overexpression) in Head and Neck Primary Tumors and Metastases; Absence of Correlation with Clinical Outcome. Frequent Protein Overexpression in Normal Epithelium and in Early non-invasive Lesions. **Oncogene**, **10**: 1217-1227.

ANGÈLE, S.; TREILLEUX, I.; TANIÈRE, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; VUILLAUME, M.; BAILLY, C.; BRÈMOND, A.; MONTESANTO, R.; HALL, J.(2000). Abnormal Expression of the *ATM* and *TP53* Genes in Sporadic Breast Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, **6**: 3536-3544.

ANGÈLE, S.; ROMESTAING, P.; MOULLAN, N.; VUILLAUME, M.; CHAPOT, B.; FRIESEN, M.; JONGMANS, W.; COX, D.G.; PISANI, P.; GÉRARD, J.P.; HALL, J. (2003). *ATM* Haplotypes and Cellular Response to DNA Damage: Association with Breast Cancer Risk and Clinical Radiosensitivity. **Cancer Research**, **63**: 8717-8725.

ANTONIOU, A.; PHAROAH, P.D.; NAROD, S.; RISCH, H.A.; EYFJORD, J.E.; HOPPER, J.L.; LOMAN, N.; OLSSON, H.; JOHANNSSON, O.; BORG, A.; PASINI, B.; RADICE, P.; MANOUKIAN, S.; ECCLES, D.M.; TANG, N.; OLAH, E.; ANTON-CULVER, H.; WARNER, E.; LUBINSKI, J.; GRONWALD, J.; GORSKI, B.; TULINIUS, H.; THORLACIUS, S.; EEROLA, H.; NEVANLINNA, H.; SYRJAKOSKI, K.; KALLIONIEMI, O.P.; THOMPSON, D.; EVANS, C.; PETO, J.; LALLOO, F.; EVANS, D.G.; EASTON, D.F. (2003). Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with *BRCA1* or *BRCA2* Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. **American Journal Human Genetics**, **72**: 1117-1130.

ATTWOOLL, C.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; STEWART, F.J.; BIRCH, J.M.; VARLEY, J.M. (2002). Identification of a Rare Polymorphism in the Human *TP53* Promoter. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **135**: 165-172.

BALZ, V.; SCHECKENBACH, K.; GÖTTE, K.; BOCKMÜHL, U.; PETERSEN, I.; BIER, H. (2003). Is the p53 inactivation frequency in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Underestimated? Analysis of p53 Exons 2-11 and Human Papillomavirus 16/18 E6 Transcripts in 123 Unselected Tumor Specimens. **Cancer Research**, **63**: 1188-1191.

BARGONETTI, J.; MANFREDI, J.J. (2002). Multiple roles of the Tumor Suppressor *p53*. **Current Opinion in Oncology**, **14**: 86-91.

BENDER, M.A.(1965): Methods in Human Cytogenetics. **Arquivos Endocrinologia Metabólica**, **14**: 47-72

BIRCH, J.M.; HARTLEY, A.L.; TRICKER, K.J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A.M.; HARRIS, M.; MORRIS JONES, P.H.; BINCHY, A.; CROWTHER, D.; CRAFT, A.W.; EDEN, O.B.; EVANS, D.G.R.; THOMPSON, E.; MANN, J.R.; MARTIN, J.; MITCHELL, E.L.D.; SANTIBANEZ-KOREF, M.F. (1994). Prevalence and diversity of constitutional mutations in the *p53* gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Research**, **54**: 1298-1304.

BLACKBURN, A.C.; JERRY, D.J. (2002). Knockout and Transgenic mice of *Trp53*: What have we learned about p53 in Breast Cancer? **Breast Cancer Res.**, **4**: 101-111.

BOARDMAN, L.A.; THIBODEAU, S.N.; SCHAID, D.J.; LINDOR, N.M.; MCDONNELL, S.K.; BURGART, L.J.; AHLQUIST, D.A.; PODRATZ, K.C.; PITTELKOW, M.; HARTMANN, L.C. (1998). Increased risk for cancer in patients with the Peutz–Jeghers syndrome. **Annals of Internal Medicine**, **128**: 896–899.

BORRESEN-DALE, A.L. (2003). *TP53* and Breast Cancer. **Human Mutation**, **21**: 292-300.

BOUGEARD, G.; BRUGIÈRES, L.; CHOMPRET, A.; GESTA, P.; CHARBONNIER, F.; VALENT, A.; MARTIN, C.; RAUX, G.; FEUNTEUN, J.; BRESSAC-DE-PAILLERETS, B.; FRÉBOURG, T. (2003). Screening for *TP53* Rearrangements in Families with the Li-Fraumeni Syndrome Reveals a Complete Deletion of the *TP53* Gene. **Oncogene**, **22**: 840-846.

BURNS, J.E.; BAIRD, M.C.; CLARK, L.J.; BURNS, P.A.; EDINGTON, K.; CHAPMAN, C.; MITCHELL, R.; ROBERTSON, G.; SOUTAR, D.; PARKINSON, E.K. (1993). Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. **British Journal of Cancer**, **67**: 1274-1284.

BUYRU, N.; TIGLI, H.; NEJAT, D. (2003). *P53* codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncology Reports**, **10**: 711-714.

CADWELL, C.; ZAMBETTI, G.P. (2001). The Effects of Wild-Type p53 Tumor Suppressor Activity and Mutant p53 Gain-of-Function on Cell Growth. **Gene**, **277**: 15-30.

CASEY, G.; LOPEZ, M.E.; RAMOS, J.C.; PLUMMER, S.J.; ARBOLEDA, M.J.; SHAUGHNESSY, M.; KARLAN, B.; SLAMON, D.J. (1996). DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. **Oncogene**, **13**: 1971-1981.

CASPARI, T. (2000). Checkpoint: How to Activate p53. **Current Biology**, **10**: R315-R317.

CAVALCANTI, G.B.; KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. (2002). p53 and Hematological Malignancies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **48**: 419-427.

CHO, Y.; GORINA, S.; JEFREY, P.D.; PAVLETICH, N.P. (1994). Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. **Science**, **265**: 346-355.

CHOMPRET, A. (2002). The Li-Fraumeni Syndrome. **Biochimie**, **84**: 75-82.

CONWAY, K.; EDMISTON, S.N.; CUI, L.; DROUIN, S.S.; PANG, J.; HE, M.; TSE, C.K.; GERADTS, J.; DRESSLER, L.; LIU, E.T.; MILLIKAN, R.; NEWMAN, B. (2002). Prevalence and Spectrum of *p53* Mutations Associated with Smoking in Breast Cancer. **Cancer Research**, **62**: 1987-1995.

COUTINHO, G.; MITUI, M.; CAMPBELL, C.; CARVALHO, B.T.C.; NAHAS, S.; SUN, X.; HUO, Y.; LAI, C.; THORSTENSON, Y.; TANOUYE, R.; RASKIN, S.; KIM, C.A.; LLERENA, J.; GATTI, R.A. (2004). Five Haplotypes Account for Fifty-Five Percent of ATM Mutations in Brazilian Patients with Ataxia Telangiectasia: Seven New Mutations. **American Journal of Medical Genetics**, **126A**: 33-40.

DE JONG, M.M.; NOLTE, I.M.; MEERMAN, G.J.; GRAAF, W.T.A.; OOSTERWIJD, J.C.; KLEIBEUKER, J.H.; SCHAAPVELD, M.; VRIES, E.G.E. (2002). Genes other than *BRCA1* and *BRCA2* Involved in Breast Cancer Susceptibility. **Journal of Medical Genetics**, **39**: 225-242.

DONEHOWER, L.A., HARVEY, M., SLAGLE, B.L., McARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A.J., BUTEL, J.S., BRADLEY, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** **356**: 215-221.

DE MOURA GALLO, C.V.; MENDONÇA, G.A.S.; MORAES, E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. (2005). *TP53* Mutations as Biomarkers for Cancer Epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. **Mutation Research**, **589**: 192-207.

DUMONT, P.; LEU, J.I.; DELLA PIETRA A.C.^{3rd}; GEORGE D.L.; MURPHY, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature Genetics**, **3**: 357-365.

ERILL, N.; COLOMER, A.; VERDU, M.; ROMAN, R.; CONDOM, E.; HANNAOUI, N.; BANUS, J.M.; CORDON-CARDO, C.; PUIG, X. (2004). Genetic and immunophenotype analyses of TP53 in bladder cancer: TP53 alterations are associated with tumor progression. **Diagnostic Molecular Pathology**, **13**: 217-223.

EVANS, D.G.R.; BIRCH, J.M.; THORNEYCROFT, M.; MCGOWN G.; LALLOO, F.; VARLEY, J.M. (2002). Low rate of *TP53* germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. **Journal Medical Genetics**, **39**: 941-944.

FARRUGIA, M.M.; DUAN, L.J.; REIS, M.D.; NGAN, Y. B.; BERINSTEIN, N.L. (1994). Alterations of the p53 Tumor Suppressor Gene in Diffuse Large Cell Lymphomas with Translocations of the *c-MYC* and *BCL-2* Proto-oncogenes. **Blood**, **83**: 191-198.

FREBOURG, T.; KASSEL, J.; LAM, K.T.; GRYKA, M.A.; BARBIER, N.; ANDERSEN, T.I.; BORRESEN, A.L.; FRIEND, S.H. (1992). Germ-line Mutations of the p53 Tumor Suppressor Gene in Patients with High Risk for Cancer Inactivate the p53 protein. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, **89**: 6413-6417.

GASPAR, P.A.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; WEIMER, T.A. (2001). *TP53* polymorphisms and haplotypes in South Amerindians and neo-Brazilians. **Annals of Human Biology**, **28**: 184-194.

GUIMARAES, D.P.; HAINAUT, P. (2002). *TP53*: A Key Gene in Human Cancer. **Biochimie**, **84**: 83-93.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. (2000). p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. **Advances in Cancer Research**, **77**: 81-137.

HAINAUT, P.; MANN, K. (2001). Zinc Binding and Redox Control of p53 Structure and Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, **3**: 611-623.

HANSSEN, A.M.; FRYNS, J.P. (1995). Cowden Syndrome. **Journal of Medical Genetics**, **32**: 117-119.

HARTMAN, A.R.; FORD, J.M. (2003). BRCA1 and p53: Compensatory roles in DNA Repair. **Journal of Molecular Medicine**, **81**: 700-707.

HEMMINKI, A.; TOMLINSON, I.; MARKIE, D.; JARVINEN, H.; SISTONEN, P.; BJORKQVIST, A.M.; KNUUTILA, S.; SALOVAARA, R.; BODMER, W.; SHIBATA, D.; DE LA CHAPELLE, A.; ALTONEN, L.A. (1997). Localization of a Susceptibility Locus for Peutz-Jeghers Syndrome to 19p Using Comparative Genomic Hybridization and Targeted Linkage Analysis. **Nature Genetics**, **15**: 87-90.

HOFSETH, L.J.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. (2004). p53: 25 Years After its Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, **25**: 177-181.

HOLLSTEIN, M.; HERGENHAHN, M.; YANG, Q.; BARTSCH, H.; WANG, Z.Q.; HAINAUT, P. (1999). New Approaches to Understanding p53 Gene Tumor Mutation Spectra. **Mutation Research**, **431**: 199-209.

IARC – International Agency Research Cancer. Disponível em <http://www.iarc.fr/p53> - Acesso em: outubro de 2005.

IMYANITOV, E.N.; TOGO, A.V.; HANSON, K.P. (2004). Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles. **Cancer Letters**, **204**: 3-14.

JENNE, D.E.; REIMANN, H.; NEZU, J.; FRIEDEL, W.; LOFF, S.; JESCHKE, R.; MULLER, O.; BACK, W.; ZIMMER, M. (1998). Peutz–Jeghers Syndrome is Caused by Mutations in a Novel Serine Threonine Kinase. **Nature Genetics**, **18**: 38–43.

KELSEY, J.L.; GAMMON, M.D. (1991). The Epidemiology of Breast Cancer. **Cancer Journal for Clinicians**, **41**: 146-165.

KERR, P.; ASHWORTH, A. (2001). New complexities for *BRCA1* and *BRCA2*. **Current Biology**, **11**: R668-676

KLEIHUES, P.; SCHAUBLE, B.; HAUSEN, A.Z.; ESTEVE, J.; OHGAKI, H. (1997).

Tumors Associated with p53 Germline Mutations. **American Journal of Pathology**, **150**: 1-13.

LAMBIE, H.; MIREMADI, A.; PINDER, S.E.; BELL, J.A.; WENCYK, P.; PAISH, E.C.; MACMILLAN, R.D.; ELLIS, I.O. (2003) Prognostic significance of BRCA1 Expression in Sporadic Breast Carcinomas. **Journal of Pathology**, **200**: 207-213.

LANCASTER, J.M.; BROWLEE, H.A.; WISEMAN, R.W.; TAYLOR, J. (1995). *p53* polymorphism in ovarian and bladder cancer. **The Lancet**, **346**: 182.

LEE, L.N.; SHEW, J.Y.; SHEU, J.C.; LEE, Y.C.; LEE, W.C.; FANG, M.T.; CHANG, H.F.; YU, C.J.; YANG, P.C.; LUH, K.T. (1994). Exon 8 mutation of p53 gene associated with nodal metastasis in non-small-cell lung cancer. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **150**: 1667-1671.

LEHMAN, T.A.; HAFFTY, B.G.; CARBONE, C.J.; BISHOP, L.R.; GUMBS, A.A.; KRISHNAN, S.; SHIELDS, P.G.; MODALI, R.; TURNER, B.C. (2000). Elevated Frequency and Functional Activity of a Specific Germ-Line *p53* Intron Mutation in Familial Breast Cancer. **Cancer Research**, **60**: 1062-1069.

LEREBOURS, F.; LIDEREAU, R. (2002) Molecular Alterations in Sporadic Breast Cancer. **Critical Review in Oncology/Hematology**, **44**: 121–41.

LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSYPANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S.I.; PUC, J.; MILIARESIS, C.; RODGERS, L.; McCOMBIE, R.; BIGNER, S.H.; GIOVANELLA, B.C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M.H.; PARSONS, R. (1997). PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. **Science**, **275**: 1943-1947.

LI, F.P.; FRAUMENI, J.F. Jr.; MULVIHILL, J.J.; BLATTNER, W.A.; DREYFUS, M.G.; TUCKER, M.A.; MILLER, R.W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Research**, **48**: 5358-5362.

LOHMANN, D.; PUTZ, B.; REICH, U.; BOHM, J.; PRAUER, H.; HOFER, H. (1993). Mutational spectrum of the p53 gene in human small-cell lung cancer and relationship to clinicopathological data. **American Journal of Pathology**, **142**: 907-915.

MARTIN, A.C.R.; FACCHIANO, A.M.; CUFF, A.L.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P.; THORNTON, J.M. (2002). Integrating Mutation Data and Structural Analysis of the *TP53* Tumor-Suppressor Protein. **Human Mutation**, **19**: 149-164.

MARTIN, A.M.; WEBER, B.L. (2000). Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, **92**: 1126-1135.

MARTIN, A.M.; KANETSKY, P.A.; AMIRIMANI, B.; COLLIGON, T.A.; ATHANASIADIS, G.; SHIH, H.A.; GERRERO, M.R.; CALZONE, K.; REBBECK, T.R.; WEBER, B.L. (2003). Germline *TP53* Mutation in Breast Cancer Families with Multiple Primary Cancers: is *TP53* a Modifier of *BRCAl*? **Journal Medical Genetics**, **40**: 1-6.

MEDINA, R. (2001). Polimorfismos do gene *p53*. Fatores de risco para o câncer de mama? Monografia de conclusão de curso (Graduação). Ciências Biológicas – Modalidade Médica – UNIRIO.

MEIJERS-HEIJBOER, H.; VAN DEN OUWELAND, A.; KLIJN, J.; WASIELEWSKI, M.; DE SNOO, A.; OLDENBURG, R.; HOLLESTELLE, A.; HOUBEN, M.; CREPIN, E.; VAN VEGHEL-PLANDSOEN, M.; ELSTRODT, F.; VAN DUIJN, C.; BARTELS, C.; MEIJERS, C.; SCHUTTE, M.; MCGUFFOG, L.; THOMPSON, D.; EASTON, D.; SODHA, N.; SEAL, S.; BARFOOT, R.; MANGION, J.; CHANG-CLAUDE, J.; ECCLES, D.; EELES, R.; EVANS, D.G.; HOULSTON, R.; MURDAY, V.; NAROD, S.; PERETZ, T.; PETO, J.; PHELAN, C.; ZHANG, H.X.; SZABO, C.; DEVILEE, P.; GOLDGAR, D.; FUTREAL, P.A.; NATHANSON, K.L.; WEBER, B.; RAHMAN, N.; STRATTON, M.R.; CHEK2-BREAST CANCER CONSORTIUM. (2002). Low-penetrance susceptibility to

breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of *BRCA 1* or *BRCA 2* mutations. **Nature Genetics** **31**: 55-59.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P.A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L.M.; DING, W. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science**, **266**: 66-71.

MILLER, C.W.; SIMON, K.; ASLO, A.; KOK, K.; YOKOTA, J.; BUYS, C.H.; TERADA, M.; KOEFFLER, H.P. (1992). p53 mutations in human lung tumors. **Cancer Research**, **52**: 1695-1698.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. (1988). A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. **Nucleic Acids Research**, **16**: 1215.

MIZOBUCHI, S.; FURIHATA, M.; SONOBE, H.; OHTSUKI, Y.; ISHIKAWA, T.; MURAKAMI, H.; KURABAYASHI, A.; OGOSHI, S.; SASAGURI, S. (2000). Association between p53 immunostaining and cigarette smoking in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, **30**: 423-428.

- MOORHEAD P. S.; NOWELL P. C.; MELLMAN W. J.; BATTIPS D. M.; HUGERFORD D. A. (1960). Chromosome preparation of leukocyte cultured from humans peripheral blood. **Experimental Cellular Research**, **20**: 613-616.
- NKONDJOCK, A.; GHADIRIAN, P. (2004). Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview. **Cancer Letters**, **205**: 1-8.
- NOMA, C.; MIYOSHI, Y.; TAGUCHI, T.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S. (2004). Association of *p53* genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. **Cancer Letters**, **210**: 197-203.
- OLIVIER, M.; HAINAUT, P. (2001). *TP53* Mutation Patterns in Breast Cancers: Searching for clues of environmental Carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, **11**: 353-360.
- OLIVIER, M.; EELES, R.; HOLLSTEIN, M.; KHAN M.A.; HARRIS C.C.; HAINAUT, P. (2002). The IARC Database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Human Mutation**, **19**: 607-614.
- OLIVIER, M.; GOLDGAR, D.E.; SODHA, N.; OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HAINAUT, P.; EELES, R.A. (2003). Li-Fraumeni and Related Syndromes: Correlation between Tumor Type, Family Structure, and *TP53* Genotype. **Cancer Research**, **63**: 6643-6650.
- OREN, M. (1999). Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, **274**: 36031-36034.

OTERO, L.; CAVALCANTI, G.B.; KLUMB, C.E.; SCHEINER, M.A.M.; MAGLUTA, E.P.S.; FERNANDEZ, T.S.; SILVA, M.L.M.; PIRES, V.; ANDRADE, G.V.; MAIA, R.C.; TABAK, D. (2005). Chromosome 17 abnormalities and mutation of the *TP53* gene: Correlation between cytogenetics, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Biology**, **28**: 40-43.

PAPADAKIS, E.N.; DOKIANAKIS, D.N.; SPANDIDOS, D.A. (2000). *p53* Codon 72 Polymorphism as a Risk Factor in the Development of Breast Cancer. **Molecular Cell Biology Research Communications**, **3**: 389-392.

PATRIKIDOU, A.; BENNETT, J.; ABOU-SLEIMAN, P.; DELHANTY, J.D.A.; HARRIS, M. (2002). A Novel, de novo Germline *TP53* Mutation in a Rare Presentation of the Li-Fraumeni Syndrome in the Maxilla. **Oral Oncology**, **38**: 383-390.

PEKKOLA-HEINO, K.; SERVOMAA, K.; KIURU, A.; GRENMAN, R. (1996). Increased radiosensitivity is associated with *p53* mutations in cell lines derived from oral cavity carcinoma. **Acta Oto-laryngologica**, **116**: 341-344.

PELLEGRINI, L.; VENKITARAMAN, A. (2004). Emerging Functions of BRCA2 in DNA Recombination. **Trends in Biochemical Science**, **29**: 310-316.

PHAROAH, P.D.P.; DUNNING, A.M.; PONDER, B.A.J.; EASTON, D.F. (2004).

Association studies for finding Cancer-Susceptibility Genetic Variants. **Nature**, **4**: 850-860.

PONDER, B.A. (2001). Cancer genetics. **Nature**, **411**: 336–341.

POREMBA, C.; YANDELL, D.W.; HUANG, Q.; LITTLE, J.B.; MELLIN, W.;

SCHMID, K.W.; BOCKER, W.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B. (1995).

Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer--a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Archiv: an International Journal of Pathology**, **426**: 447-455.

POTOCKI, L.; CHEN, K.S.; PARK, S.S.; OSTERHOLM, D.E.; WITHERS, M.A.;

KIMONIS, V.; SUMMERS, A.M.; MESCHINO, W.S.; ANYANE-YEBOA, K.;

KASHORK C.D.; SHAFFER, L.G.; LUPSKI, J.R. (2000). Molecular mechanism

for duplication 17p11.2 – the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. **Nature Genetics**, **24**: 84-87.

RADFORD, D.M.; ZEHNBauer, B.A. (1996). Inherited breast cancer. **The Surgical**

Clinics of North America, **76**: 205-220.

REISMAN, D.; BALINT, E.; LOGING, W.T.; ROTTER, V.; ALMON, E. (1996). A Novel Transcript Encoded within the 10-kb First Intron of the Human p53 Tumor Suppressor Gene (D17S2179E) Is Induced during Differentiation of Myeloid Leukemia Cells. **Genomics**, **38**: 364-370.

REN, J. (2000). High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, **741**: 115-128.

RU, Q.; JING, H.; LUO, G.A.; HUANG, Q. (2000). Single-strand conformation polymorphism analysis to detect the p53 mutation in colon tumor samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, **894**: 171-177.

RUNNEBAUM, I.B.; TONG, X.W.; KONIG, R.; ZHAO, H.; KORNER, K.; ATKINSON, E.N.; KREIENBERG, R.; KIEBACK, D.G.; (1995). *p53* based blood test for *P53PIN3* and risk for sporadic ovarian cancer. **Lancet**, **345**: 994.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SEABRIGHT, M. (1971). Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. **Lancet**, **2**: 971-972.

SELLERS, T.A.; WALSH, A.J.; GRABRICK, D.M.; ANDRESON, K.E.; CERHAN, J.R.; FOLSOM, A.R. (1999). Family History, Ethnicity, and Relative Risk of Breast Cancer in a Prospective Cohort Study of Older Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, **8**: 421-425.

SENGUPTA, S.; HARRIS, C.C. (2005) p53: Traffic Cop at the Crossroads of DNA Repair and Recombination. **Nature**, **6**: 44-55.

SIMÃO, T.A.; RIBEIRO, F.S.; AMORIM, L.M.F.; ALBANO, R.M.; ANDRADA-SERPA, M.J.; CARDOSO, L.E.B.; MENDONÇA, G.A.S.; DE MOURA-GALLO, C.V. (2002). *TP53* Mutations in Breast Cancer Tumors of Patients from Rio de Janeiro, Brazil: Association with Risk Factors and Tumor Characteristics. **International Journal of Cancer**, **101**: 69-73.

SOONG, R.; IACOPETTA, B.J.; HARVEY, J.M.; STERRETT, G.F.; DAWKINS, H.J.S.; HAHNEL, R.; ROBBINS, P.D. (1997). Detection of p53 Gene Mutation by Rapid PCR-SSCP and its Association with Poor Survival in Breast Cancer. **International Journal of Cancer**, **74**: 642-647.

SOONG, R.; POWELL, B.; ELSALEH, H.; GNANASAMPANTHAN, G.; SMITH, D.R.; GOH, H.S.; JOSEP, H.D.; IACOPETTA, B. (2000). Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. **European Journal of Cancer**, **36**: 2053-2060.

SOUSSI, T. (2000). The p53 Tumor Suppressor Gene: From Molecular Biology to Clinical Investigation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **910**: 121-137.

STRAUSS, B.S. (1997). Silent and Multiple Mutations in p53 and the Question of the Hypermutability of Tumors. **Carcinogenesis**, **18**: 1445-1452.

TAVTIGIAN, S.V.; SIMARD, J.; ROMMENS, J.; COUCH, F.; SHATTUCK-EIDENS, D.; NEUHAUSEN, S.; MERAJVER, S.; THORLACIUS, S.; OFFIT, K.; STOPPA-LYONNET, D.; BELANGER, C.; BELL, R.; BERRY, S.; BOGDEN, R.; CHEN, Q.; DAVIS, T.; DUMONT, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; JAMMULAPATI, S.; JANECKI, T.; JIANG, P.; KEHRER, R.; LEBLANC, J.F.; GOLDGAR, D.E.; (1996). The complete *BRCA2* gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nature Genetics**, **12**: 333-337.

THOMAS, M.; KALITA, A.; LABRECQUE, S.; PIM, D.; BANKS, L.; MATLASHEWSKI, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type *p53* differ biochemically and biologically. **Molecular and Cellular Biology**, **19**: 1092-1100.

THULL, D.L.; VOGEL, V.G. (2004). Recognition and Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. **The Oncologist**, **9**: 13-24.

TOKINO, T.; NAKAMURA, Y. (2000). The Role of p53-target Genes in Human Cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, **33**: 1-6.

TWOREK, H.; PENG, R.; FETZER, S.; WERNESS, B.A.; PIVER, M.S.; ALLEN, H.J.; DICIOCCIO, R.A. (1999). Mutation Analysis of *BRCA1*, *TP53*, and *KRAS2* in Ovarian and Related Pelvic Tumors. **Cancer Genetics and Cytogenetics** **112**: 105-118.

VARLEY, J.M.; BRAMMAR W.J.; LANE D.P.; SWALLOW J.E.; DOLAN, C.; WALKER, R.A. (1991). Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. **Oncogene**, **6**: 413-421.

VARLEY, J.M.; ATTWOOLL, C.; WHITE, G.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; KELSEY, A.M.; GREAVES, M.; BOYLE, J.; BIRCH, J.M. (2001). Characterization of Germline TP53 Splicing Mutations and Their Genetic and Functional Analysis. **Oncogene**, **20**: 2647-2654.

VARLEY, J.M. (2003). Germline TP53 Mutations and Li-Fraumeni Syndrome. **Human Mutation**, **21**: 313-320.

VENKITARAMAN, A. (2002). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, **108**: 171-182.

VIDARSSON, H.; MIKAELSDOTTIR, E.K.; RAFNAR, T.; BERTWISTLE, D.;
ASHWORTH, A.; EYFJORD, J.E.; VALGEIRSDOTTIR, S. (2002) BRCA1 and
BRCA2 Bind Stat5a and Suppress its Transcriptional Activity. **FEBS Lett.**, **532**:
247-252.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. (2000). Surfing the p53 Network.
Nature, **408**: 307-310.

WANG-GOHRKE, S.; BECHER, H.; KREIENBERG, R.; RUNNEBAUM, I.B.;
CHANG-CLAUDE, J. (2002). Intron 3 16 bp duplication polymorphism of *p53* is
associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years.
Pharmacogenetics, **12**: 269-272.

WESTON, A.; WOLFF, M.S.; MORABIA, A. (1998). True extended haplotypes of
p53: indicators of breast cancer risk. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **102**:
153-154.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION,
J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G.; BARFOOT, R.;
HAMOUDI, R.; PATEL, S.; RICE, C.; BIGGS, P.; HASHIM, Y.; SMITH, A.;
CONNOR, F.; ARASON, A.; GUDMUNDSSON, J.; FICENEC, D.; KELSELL,
D.; FORD, D.; TONIN, P.; BISHOP, D.T.; SPURR, N.K.; PONDER, B.A.J.;
EELES, R.; PETO, J.; DEVILEE, P.; CORNELISSE, C.; LYNCH, H.; NAROD,
S.; LENOIR, G.; EGILSSON, V.; BARKADOTTIR, R.B.; EASTON, D.F.;
BENTLEY, D.R.; FUTREAL, P.A.; ASHWORTH, A.; STRATTON, M.R.

(1995). Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene *BRCA2*. **Nature**, **378**: 789-792.

WOOSTER, R.; WEBER, B.L. (2003). Breast and Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, **348**: 2339-2347.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)