



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Mateus Nóbrega Aoki

Polimorfismo dos genes supressor de
tumor p53 e do receptor de quimiocina
CCR5: Implicações no desenvolvimento
do câncer de mama

Londrina
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Polimorfismo dos genes supressor de
tumor p53 e do receptor de quimiocina
CCR5: Implicações no desenvolvimento
do câncer de mama

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A638p Aoki, Mateus Nóbrega

Polimorfismo dos genes supressor de tumor p53 e do receptor de quimiocina
CCR5 : implicações no desenvolvimento do câncer de mama / Mateus Nóbrega
Aoki. - Londrina, 2009.
xii, 70 f. : il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses.
3. Mamas – Câncer – Teses. 4. Quimiocinas – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica
Ehara. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

Comissão Examinadora

Prof^a. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Universidade Estadual de Londrina

Prof^o. Dr. Mário Augusto Ono

Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 08 de setembro de 2009

Agradecimentos

A meus pais José e Jane, por tudo que eles representam em minha vida. Pela educação, lições, ensinamentos por eles passados. Por abrirem mão de tudo pelos filhos, procurando sempre o melhor para mim. Por serem essas pessoas maravilhosas, que estão sempre ao meu lado para tudo. Por poder confiar e contar com eles sempre, em qualquer momento de minha vida. Os meus exemplos de vida!

A minha namorada, companheira e amiga Taty. Por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins, me incentivando, me dando força. Por ser sempre prestativa, atenciosa, amorosa, companheira. Por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos. Obrigado por tudo o que você representa em minha vida!

A minha orientadora, amiga Maria Angelica Watanabe. Pela oportunidade e voto de confiança em mim depositado. Pelos ensinamentos, conhecimentos e experiências passados. Pelo excelente convívio em todos esses anos, sendo muito mais do que uma orientadora, e sim um modelo de profissional, de caráter, de pessoa. Tenho certeza que nos encontrarem em breve!

A minha irmã Bárbara. Pelos momentos de alegria, descontração, de felicidade. Pela ajuda sempre que precisei. Por todos os anos inesquecíveis que passamos juntos, e por todos os que virão.

A minha família de forma geral, especialmente meus avós Paulo e Tita. Por sempre me acolherem tão bem, com carinho e alegria. Pelos momentos, conversas agradáveis que tivemos. Por acreditarem sempre em mim. E também as minhas sempre companheiras cachorras, Dalila, Dolly e mais recentemente Lola! Pois um cachorro esta sempre lá quando você precisa, sempre alegre, pronto pra te dar atenção, ser agradável e deixar os dias mais felizes! Membros essenciais de minha família!

Aos meus amigos do laboratório: Thiago, Juliana, Patrícia, Karen, Julie, Marla e Roberto. Por todos os dias que passamos juntos. Dias de alegria, amizade, companheirismo, atenção, respeito, fazendo com que os dias sejam muito mais agradáveis e produtivos. Por toda ajuda, ensinamentos e

conselhos que vocês me deram nestes e em outros trabalhos. Momentos inesquecíveis, pois vocês não foram simples colegas de laboratório, mas amigos verdadeiros pra vida toda

A todos envolvidos no programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, como os professores e meus colegas de classe, mas principalmente a Vânia D'Arc, por ser sempre prestativa e atenciosa para me ajudar sempre que precisei.

Aos meus antigos amigos do laboratório: Jaqueline, Thiago Nasser, Helen, Sandra, Kadu e Carol. Pelos conhecimentos passados, momentos vividos e ajuda prestada.

Aos meus amigos dos laboratórios vizinhos: Daniel, Marcelo, Juliana, Dani, Carla, Lara, Ligia pela ajuda e companheirismo neste tempo todo.

A meus amigos de fora da Universidade, pelos momentos divertidos, de descontração que passamos juntos. Pela ajuda de qualquer forma neste trabalho.

A Profa. Dr^a. Sueli Borelli, por ceder amostras de doadores normais de Maringá, para que pudesse realizar este estudo.

Resumo

Aoki, M N. Polimorfismo dos genes supressor de tumor p53 e do receptor de quimiocina CCR5: Implicações no desenvolvimento do câncer de mama. Departamento de Ciências Patológicas (CCB) – Universidade Estadual de Londrina

O câncer é caracterizado como uma doença na qual células anormais sofrem divisão descontrolada, podendo se disseminar para sítios distantes de sua origem, processo denominado de metástase. O câncer de mama é a neoplasia com maior incidência no sexo feminino em todo o mundo, e uma série de fatores estão envolvidos em sua etiologia, como hormônios, a exposição à radiação, e características genéticas. O gene p53 tem como principal função a manutenção da integridade do código genético, e pode apresentar um polimorfismo no códon 72, codificando um aminoácido arginina ou prolina. O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon que resulta em alteração estrutural da proteína p53. As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos. Promovem um direcionamento no movimento dos leucócitos em desenvolvimento, e tem papel na homeostasia e na inflamação. O receptor de quimiocina CCR5 está envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação e desempenha um importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T. Foi identificado um polimorfismo no gene CCR5, uma deleção de 32 pares de bases, denominado de CCR5 Δ 32, e esta variante resulta em forma não funcional de receptor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência do polimorfismos no códon 72 do gene p53 e também do CCR5 em pacientes com câncer de mama em relação ao grupo controle, realizando a distribuição em idades, etnias para ambos os grupos, e estadiamento para o grupo de pacientes. Foram utilizadas 72 amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama e 90 de indivíduos saudáveis, por PCR e clonagem e sequenciamento para o p53. No genótipo do p53, observamos uma diferença significativa no genótipo arginina em homozigose nos pacientes com câncer de mama (55,55%) em relação ao controle (33,33%). Apesar de não observarmos diferença significativa, foi vista uma forte tendência ($p=0.0503$) para pacientes com grau III e genótipo homozigoto para arginina. Não observamos diferença no alelo Δ 32 entre os dois grupos, entretanto ele estava em maior frequência no grupo controle. Dos 5 pacientes que apresentaram a deleção Δ 32 em heterozigose, os 2 que apresentaram metástase óssea eram homozigotos para arginina no p53. O genótipo arginina em homozigose no códon 72 do p53 pode representar um fator de risco para o surgimento do câncer de mama e, juntamente com o CCR5 Δ 32, podem estar envolvidos em um pior prognóstico da doença.

Palavras-chave: Câncer de mama, CCR5, p53

Abstract

Aoki, M N. p53 tumor supressor gene and chemokine receptor CCR5 polymorphisms: Implications in the breast cancer development. Pathological Sciences Department (CCB) – Londrina's State University

Cancer is characterized by the abnormal cellular division, and could reach neighbors tissues, and even spread to distant local from the origin, an process named metastasis. The breast cancer is the higher incidence in women worldwide, and many factors are involved on its etiology, like hormones, ionizing radiation exposure, and genetic characteristics. The chemokines are a huge family of inflammatory and immunological mediators, proteins produced and secreted by leukocytes and tissue cells. They modulate leukocytes, in homeostasis and inflammation. Bind to receptors, where CC chemokine family that binds only to CC receptors. The CCR5 receptor has role in leukocyte chemotaxis to inflammatory aims, developing an important role in the macrophages, monocytes and T cells recruitment. It was identified a polymorphism in the CCR5 gene, a 32 base pairs deletion, named CCR5 Δ 32. This variant results in a nonfunctional form of the chemokine receptor that is incapable of binding its ligants. The p53 gene has as main function to maintain the genetic code integrity, and may present a polymorphism in the 72 codon, that codifies an arginin or proline aminoacid. This polymorphism occurs by a single base substitution at the codon, that results in p53 protein structural alteration. The aim of this study was to investigate the CCR5 gene and p53 codon 72 polymorphisms in a Brazilian population with 72 breast cancer compared with 90 healthy control subjects and to associate the clinical stage with these genotypes. Has used PCR for the 2 genes and cloning and sequencing for the p53. In p53 genotype analysis, breast cancer patients presented a significant over-representation of p53 Arg homozygosity (55.5%) compared with the healthy control group (33.3%). Although no statistical difference occurred, a very strong tendency ($p=0.0503$) in breast cancer patients in stage III presenting homozygous genotype for Arg was verified. No differences were detected for the Δ 32 allele between breast cancer patients and the normal healthy donors, although this allele was more often present in blood donors. Five breast cancer patients were D32 deletion carriers and two patients presenting metastasis showed homozygous genotype for Arg. It is possible that p53 Arg homozygosity is associated with breast cancer and may represent a potential risk factor for breast tumorigenesis. The homozygose arginin genotype in the codon 72 of the p53 gene may represent a risk factor for the development of the breast cancer. Also, together with the CCR5 Δ 32 allele may be involved at in worst prognostic of the disease.

Keywords: Breast cancer, CCR5, p53

Sumário

Introdução	1
Câncer	1
Câncer de mama	2
Quimiocinas	5
Receptores de quimiocinas	8
Quimiocinas e câncer de mama	12
O gene p53	14
Objetivos	18
Geral	18
Específicos	18
Materiais e métodos	18
População estudada	18
Obtenção do DNA	19
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	19
CCR5	19
p53	21
Clonagem e seqüenciamento	22
Purificação da amostra	22
Preparo de células competentes	23
Reação de ligação	23
Transformação.....	25
Extração do DNA plasmidial.....	25
Seqüenciamento.....	25
Análise Estatística.....	27
Resultados e discussão	27
Idade e etnia.....	27
Análise Molecular.....	29
Para p53.....	29
Para CCR5.....	36
Relação p53 x CCR5.....	39
Conclusões	43
Referências	44

Lista de Figuras

Figura 1. Papel e ação de quimiocinas em sítio inflamatório	6
Figura 2. Figura esquemático de uma β -quimiocina, CCL5	7
Figura 3. Desenho esquemático do receptor de quimiocina CCR5.....	9
Figura 4. Desenho esquemático do produto do gene p53.....	15
Figura 5. Sequência e características do vetor pCR [®] 4-TOPO [®]	24
Figura 6. Gel com produto de PCR do p53.....	30
Figura 7. Eletroferograma do produto de clonagem do p53.....	30
Figura 8. Comparação do p53 entre grupos.....	31
Figura 9. Associação do gene p53 e estadiamento.....	32
Figura 10. Gel com produto do PCR do CCR5.....	37
Figura 11. Comparação do CCR5 entre grupos.....	37
Figura 12. Distribuição p53 x CCR5 nos indivíduos normais.....	40
Figura 13. Distribuição p53 x CCR5 nos pacientes com câncer.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Classificação do câncer de mama aplicada na prática clínica e na pesquisa.....	4
Tabela 2	Reagentes utilizados na amplificação por PCR do gene CCR5.....	20
Tabela 3.	Reagentes utilizados na reação de amplificação por PCR do códon 72 do gene p53.....	21
Tabela 4.	Reagentes utilizados para a reação de ligação do fragmento amplificado na reação de PCR para o gene p53 com o vetor pCR®4-TOPO®.....	24
Tabela 5.	Reagentes utilizados para reação de sequenciamento do fragmento amplificado por PCR do gene p53 e clonado em vetor pCR®4-TOPO®	26
Tabela 6.	Condições da reação de sequenciamento do fragmento amplificado por PCR do gene p53 e clonado em vetor pCR®4-TOPO®	26
Tabela 7.	Distribuição dos pacientes com câncer de mama quanto a idade, etnia e estadiamento e distribuição das doadoras saudáveis quanto a idade e etnia	29
Tabela 8.	Distribuição genotípica do gene p53 nos pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis.....	31

Lista de siglas e abreviaturas

APC	Adenomatous polyposis coli
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
CCL	Ligante do receptor de quimiocina CC
CCR	Receptor de quimiocinas da família CC
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CCR5 Δ 32	Gene CCR5 com deleção de 32 pares de bases
Cdk	Ciclina dependente de quinase
CNR	Receptor canabinóide
CXCR	Receptor de quimiocinas da família CXC
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EBV1	Vírus Epstein-Barr tipo 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana adquirida
HPV	Papiloma vírus humano
IFN	Interferon
IGF-1	Fator semelhante a Insulina
IL	Interleucina
IP	Proteína induzida por interferon
kDa	Quilo Dalton
MCP-3	Proteína quimioatraente para monócito
MDA	Malondialdeído
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MLH1	MutL homólogo 1
MMTV	<i>Mouse mamariam tumor virus</i>
MSH1	Proteína ligante de DNA mitocondrial
NK	Células Matadoras Naturais
p21	Proteína de 21kDa
p53	Proteína de 53kDa
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRB	Proteína Retino blastoma
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>

rpm	Rotações por minuto
SV40	Vírus Símio 40
Th1	Linfócito T auxiliares CD4+ 1
Th2	Linfócito T auxiliares CD4+ 2
WHO	<i>World Health Organization</i>

Introdução

O câncer é caracterizado pela divisão celular anormal e descontrolada, dependendo de um conjunto de mutações, normalmente fatores que adicionam pequenas diferenças em cada paciente, e que, de modo geral, a introdução de qualquer um desses fatores isoladamente em uma célula normal pode não ser suficiente para torná-la cancerosa. Estas células têm a potencialidade de alcançar tecidos próximos ou disseminarem-se via corrente sanguínea e linfática para locais diferentes de sua origem, processo denominado de metástase (Alberts *et al.*, 2004).

O câncer é dividido em vários tipos, como os carcinomas, que tem origem na pele; os sarcomas, que tem origem em ossos, cartilagens, tecido adiposo, vasos sanguíneos, músculo ou qualquer outro tecido de conexão ou de suporte; as leucemias, que se tem início na medula óssea e afeta toda a produção de células sanguíneas; entre outros (*National Cancer Institute*; 2007).

Com relação a sua etiologia, já foram identificados mais de cem genes cujas alterações se repetem em cânceres humanos, estes denominados de genes críticos do câncer, agrupados em duas classes mais abrangentes, segundo o risco de surgimento decorrer de uma atividade aumentada ou diminuída de seu produto gênico (Alberts *et al.*, 2004). Os genes em que as mutações causam aumento em sua função, no produto gênico, são denominados de proto-oncogenes, e seus mutantes, as formas hiperativas, os oncogenes. Mutações em um único alelo destes podem promover o crescimento tumoral, sendo classificados como genes com mutação dominante. Já os genes em que ocorre diminuição ou perda de função são denominados genes supressores de tumor. Nestes as mutações são geralmente recessivas, isto é, os dois alelos presentes na célula somática diplóide devem ser removidos ou inativados para que algum efeito possa ser observado (Alberts *et al.*, 2004)

Conforme aumenta o entendimento dos mecanismos moleculares da evolução do câncer, descobrimos que alterações que transformam células normais em malignas e potencialmente perigosas estão relacionadas a sinais celulares para prevenir seu crescimento e, em alguns casos,

sinais que direcionam as células à apoptose. A maioria das células que adquirem características de se tornarem malignas em potencial não apresentam um tempo de vida longo, exceto algumas raras exceções na qual o defeito nas vias de sinalização e de apoptose permite a sobrevivência e uma consequente progressão maligna (Vousden *et al.* 2002).

Marcadores moleculares e genéticos têm sido utilizados na tentativa de melhorar a prevenção e o tratamento do câncer. Genes como BRCA, p53, APC, MLH1, MSH2, MSH6, CNR1, entre outros, são associados a um aumento substancial no risco de desenvolvimento de câncer, e mutações nestes genes são indícios de uma possível transformação maligna (Cote, 2009; Bedoya; 2009).

Parkin *et al* (2001) estimaram que no ano de 2000 o número de casos novos de câncer em todo o mundo foi maior que 10 milhões, dentre os quais, 53% ocorreriam nos países em desenvolvimento. Os tumores de pulmão e próstata seriam os mais frequentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino as maiores ocorrências seriam os tumores de mama e colo do útero. Atingiu de uma forma geral, uma média de 470,1 pessoas por 100 000 habitantes nos Estados Unidos entre os anos de 2000 e 2004, e apresentou uma taxa de mortalidade de 197,2/100 000 no mesmo período, com o câncer de pulmão sendo o principal contribuinte para este dado (*National Cancer Institute*; 2007).

No Brasil, no ano de 2008, estimou-se um número total de indivíduos acometidos pelo câncer de 466 730, com maior prevalência de melanoma, seguido pelo de próstata e mama (Instituto Nacional de Câncer; 2008).

Câncer de mama

É a neoplasia com maior incidência no sexo feminino em todo o mundo (McPherson *et al*, 2000). A WHO indica um aumento de sua incidência tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo que nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento em 10 vezes nas taxas

de incidência por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (WHO, 2007).

Estudos populacionais têm demonstrado diferenças na sua epidemiologia entre asiáticos e caucasóides, possivelmente devido a estilos de vida e a características genéticas distintas (John *et al.*, 2007; Fackenthal *et al.*, 2007).

Sua etiologia ainda não está clara, porém como todo câncer há uma grande influência genética envolvida. Inúmeros estudos já foram realizados para se determinarem os fatores genéticos relacionados ao câncer de mama, sendo sugeridos alguns genes candidatos que influenciam o seu surgimento. Para mulheres com um histórico familiar significativo de câncer de mama, utiliza-se diagnóstico genético para mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Metcalf *et al.*, 2009). Porém aproximadamente 25% de pessoas com câncer de mama familiar apresentam mutações nestes genes (Shih *et al.*, 2002; Simard *et al.*, 2007), portanto essas mutações não são detectadas na maioria das famílias que apresentam a característica de câncer de mama hereditário. O gene BRCA1 mutado também pode ser um fator de pior prognóstico para pacientes com câncer de mama (Hagen *et al.*, 2009). Metcalf *et al.* (2009) analisaram a incidência de câncer de mama em mulheres com históricos da doença na família e com resultados negativos para mutações no BRCA1 e BRCA2 e obtiveram uma taxa de incidência 4,3 vezes maior do que o esperado, indicando que apesar da ausência de mutações a incidência de câncer foi maior.

Fatores hormonais podem também estar associados ao aumento de risco do câncer de mama, portanto a prescrição tanto de anticoncepcionais orais, como a terapia de reposição hormonal devem ser cautelosos em relação ao risco e benefício, levando-se em conta o histórico familiar da doença (Cetin *et al.*; 2008; Labrie *et al.*, 2007).

Tem sido recentemente relatado o envolvimento de vírus, como Papilomavirus humano (HPV), vírus Epstein Barr (EBV) e vírus do tumor de mama de camundongos (MMTV) para o câncer de mama em humanos e modelos animais (Amarante & Watanabe, 2009).

do Val Carneiro *et al* (2009) relataram uma relação entre estadiamento no câncer de mama e a peroxidação lipídica através da análise do MDA no plasma, o qual é resultado de uma autooxidação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Foi verificada uma diferença estatisticamente significativa na sua quantificação em pacientes com câncer de mama principalmente nos estadiamentos II e III.

Fatores de risco, comuns a outros tipos de cânceres, também estão associados ao câncer de mama, como a obesidade pós-menopausa e exposição à radiação ionizante (INCA, 2007), poluentes ambientais, como análogos de estrógeno (Brody *et. al.* 2007), altos níveis plasmáticos de fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) (Chong *et al.*, 2007). Porém a prevenção primária do câncer de mama ainda não é totalmente possível, pois fatores de risco ligados à vida reprodutiva da mulher e características genéticas estão envolvidos em sua etiologia (INCA, 2007).

A classificação do câncer de mama em estágios é importante para o diagnóstico e planejamento adequado do tratamento, o qual é apresentado na tabela abaixo, segundo o *National Cancer Institute*:

Tabela 1: Classificação do câncer de mama aplicada na prática clínica e na pesquisa (*National Cancer Institute*):

Estágio	Tamanho do tumor	Metástase	Observações
0	Células circulam os ductos ou lobúolos da mama.	Não ocorre	Denominado carcinoma <i>in situ</i>
I	Menor do que 2 cm	Não ocorre	É o estágio inicial do câncer de mama invasivo
II	Menor do que 2 cm	Linfonodos axilares	
	Entre 2 e 5 cm	Pode ter ocorrido metástase para os linfonodos axilar	
	Maior do que 5 cm	Nenhuma	
III			
	A Menor do que 5 cm	Linfonodos axilares, que estão unidos entre eles ou a outras estruturas	

	Maior do que 5 cm	Linfonodos axilares	
B	Qualquer tamanho	Linfonodos atrás do esterno	Os tumores podem se fixar na parede torácica e na pele da mama
C	Qualquer tamanho	Linfonodos axilares, atrás do esterno e acima ou abaixo da clavícula.	
IV	Qualquer tamanho	Para órgãos e tecidos distantes	

Quimiocinas

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapeste. Constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam similaridade e diferenças com as citocinas. Ambas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (Baggiolini, 2001).

As quimiocinas promovem um direcionamento no movimento dos leucócitos na homeostasia, na inflamação e em desenvolvimento. A migração de leucócitos do sangue para os tecidos ocorre em múltiplos passos, envolvendo uma série de interações coordenadas entre leucócitos e células endoteliais (Butcher, 1996). Diversas famílias de moléculas regulatórias como integrinas, quimiocinas e selectinas controlam diferentes passos deste processo, como as selectinas facilitando o movimento e adesão dos leucócitos ao longo da superfície das células endoteliais (“rolling”). Enquanto as quimiocinas produzem sinais específicos que convertem as interações de baixa afinidade entre integrinas e selectinas, em interações de alta afinidade, resultando na migração dos leucócitos.

As quimiocinas são secretadas nos sítios inflamatórios e de infecção pelas células teciduais residentes, pelos leucócitos residentes ou recrutados, e pelas células endoteliais ativadas por citocinas (figura 1). São retidas localmente na matriz extracelular e na superfície celular mantendo um gradiente de concentração em torno do estímulo inflamatório e também do restante do endotélio. Da mesma forma que os leucócitos recrutados são ativados pelas citocinas pró-inflamatórias locais, eles podem tornar-se dessensibilizados ao sinal de outras quimiocinas pela alta concentração local das mesmas (Baggiolini, 2001).

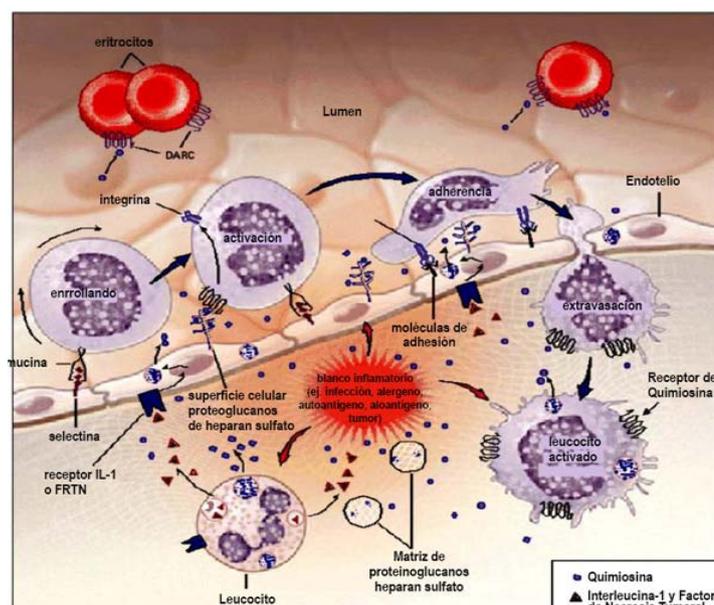


Figura 1: Papel e ação de quimiocinas em sítio inflamatório (Lezama Asencio; 2006)

São constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados, de 8 a 10 kDa com 20 a 70% de homologia entre as suas seqüência de aminoácidos (Baggiolini, 1994, 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma seqüência líder de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. As duas famílias principais de quimiocinas, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas (Figura 2), são diferenciadas baseadas na posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou não (CC). Coletivamente os estudos das relações estruturais com a atividade mostraram que as quimiocinas destas duas famílias têm dois sítios principais de interação com seus receptores,

um situado no domínio amino terminal e o outro no “*loop*” rígido após a segunda cisteína (Baggiolini, 2001).

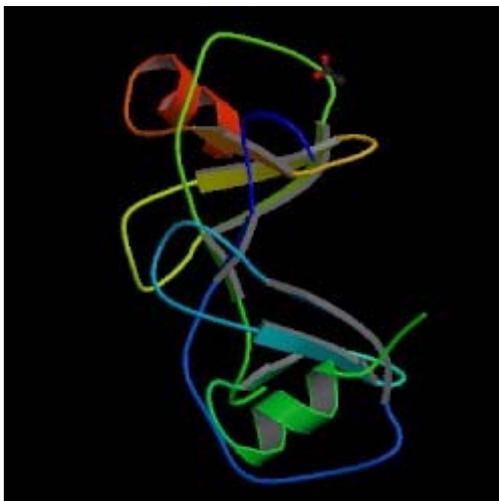


Figura 2: Figura esquemática de uma β -quimiocina, a CCL5 ou Rantes
Fonte: www.cytok.com/structure.php

As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tri-dimensional, sendo que estas pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini, 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas. Esta classificação baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966 (Zlotnik & Yoshie, 2000). Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é conhecida por seus nomes tradicionais (Baggiolini, 2001).

As quimiocinas formam uma complexa rede de mensageiros celulares e sistêmico, atuando para manter a homeostasia, auxiliando no processo de defesa do organismo, porém também

podem estar relacionadas a quadros patológicos, de forma direta ou indireta, quando se encontram desreguladas ou expressas em situações não desejáveis.

Na hepatite aguda e crônica, células do sistema imunológico, como monócitos, macrófagos, células *natural killer* e linfócitos T, são atraídas por quimiocinas produzidas pelas células hepáticas e aumentam as vias ativadas por estas quimiocinas, como a CCL2 e RANTES (Karlmark, 2008). Em problemas renais, as quimiocinas podem estar envolvidas da mesma forma. Leucócitos intersticiais infiltrados no rim são atraídos e ativados por quimiocinas, e são fatores-chaves na patogênese da necrose, regeneração tecidual e fibrose intersticial. Macrófagos infiltrados que expressam CCR2 foram os principais efetores na necrose tubular, e os que expressavam CX3CR1 tiveram papel-chave na fibrose intersticial (Furuichi *et al.*, 2009).

Receptores de Quimiocinas

A maioria dos receptores de quimiocinas reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor (Baggiolini, 2001). Contudo, os receptores CC ligam-se somente às quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente às quimiocinas CXC. Esta restrição ligante-receptor provavelmente está relacionada às diferenças estruturais entre as quimiocinas CC e CXC, as quais têm estruturas primárias, secundárias e terciárias similares, mas quaternárias diferentes (Lodi *et al.*, 1994). A figura 3 mostra a estrutura básica de um receptor de quimiocina 5 (CCR5).

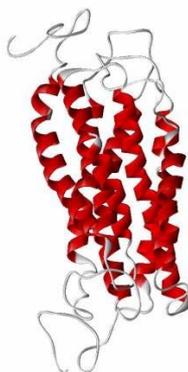


Figura 3 - Figura esquemática da estrutura dos aminoácidos do Receptor de Quimiocina 5 (CCR5) com sete domínios transmembrana hidrofóbicos. Fonte: *Center for Disease Control and Prevention*.

Os receptores para quimiocinas são expressos em diferentes tipos de leucócitos, porém alguns receptores estão restritos a determinados tipos celulares, como o CXCR1, predominantemente presente em neutrófilos, enquanto outros são mais amplamente expressos em outros tipos celulares, como CCR2 em monócitos, células T, células NK, células dendríticas e basófilos. Os receptores de quimiocinas são expressos constitutivamente ou induzidos, dependendo de tipos celulares. Os receptores CCR1 e CCR2 são expressos constitutivamente em monócitos, mas nos linfócitos são expressos somente após a estimulação pela IL-2 (Loetscher *et al.*, 1996).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e doença. Fagócitos sangüíneos expressam diferentes tipos e combinações de receptores de quimiocinas, como CXCR1 e CXCR2, e os receptores de IL-8 são encontrados exclusivamente em neutrófilos, os quais estão envolvidos principalmente da imunidade contra bactérias. Monócitos, eosinófilos e basófilos compartilham alguns receptores e expressam outros com exclusividade (CCR3 em eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos) e, portanto podem ser recrutados seletivamente por quimiocinas apropriadas (Baggiolini, 2001).

Em contraste aos fagócitos, que apresentam receptores de quimiocinas de forma restrita, os linfócitos T podem expressar a maioria deles. A expressão de receptores nas células T é regulada

por citocinas, como IL-2, IL-4 e IFN- γ , e outras moléculas efetoras e refletem o grau de diferenciação funcional (Sallusto *et al.*, 2000; Loetscher *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que em cultura de células T em presença de IL-2 há aumento progressivo da expressão de muitos receptores de quimiocinas, como CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, e a resposta quimiotática a RANTES, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 e outras quimiocinas (Loetscher *et al.*, 1996). O efeito da IL-2 é reversível, o número de receptores e a responsividade decaem rapidamente com a retirada da citocina, e restabelece-se quando a mesma é adicionada novamente. Estas observações geraram muito interesse e muitos grupos estudam a expressão de receptores de quimiocinas no contexto da diferenciação de células T e aquisição de propriedades funcionais. Demonstrou-se que células Th1 e Th2 quando obtidas em cultura com presença de citocinas apropriadas apresentam um repertório diferente de receptores de quimiocinas: CCR5 e CXCR3 para Th1 e CCR3 e CCR4 para células Th2 (Sallusto *et al.*, 1998a, 1998b; Bonecchi *et al.*, 1998).

Os receptores de quimiocinas, assim como outros membros da família de receptores tipo proteína G acoplados, estão funcionalmente ligados às fosfolipases através das proteínas G (Premack *et al.*, 1996; Murphy, 1994; Bokoch, 1995). A ativação do receptor leva a uma cascata de sinalização celular, incluindo a geração de trifosfato de inositol, a liberação de cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C. A sinalização através do receptor de quimiocina também leva a ativação de proteínas ligantes tipo guanosina trifosfato da família de RAS (Laudanna *et al.*, 1996). As proteínas ligantes estão envolvidas na motilidade celular através da regulação de processos actina-dependentes, tais como ondulação da membrana, formação de pseudópodos e também da organização de complexos focais de adesão. Portanto, o que tem sido demonstrado é que os receptores de quimiocinas ativam múltiplas vias sinalizadoras da célula, os quais regulam a maquinaria intracelular necessária para determinadas respostas celulares.

Panse *et al.* (2008) observaram que pacientes com câncer de mama apresentaram um aumento da expressão da quimiocina CXCL13, principalmente nos que apresentaram metástases. A expressão do seu receptor, CXCR5, é baixa, havendo uma forte correlação entre CXCL13 e CXCR5 nas amostras de câncer de mama, indicando um papel relevante biologicamente do CXCR5 *in vivo*.

O CCR5, receptor de quimiocinas da família CC, apresenta sete domínios transmembrana hidrofóbicos e exerce sua atividade via proteína G. Liga-se as quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) e MIP-1 β (CCL4) (Samson *et al.*, 1996) e é codificado pelo locus CMBKR5 localizado no cromossomo 3 (Zimmerman *et al.*, 1997). Ele está envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação (Murphy *et al.*, 1994; Baggiolini, 1998; Proost *et al.*, 1996), desempenhando importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005; Spagnolo *et al.*, 2005), e é normalmente expresso em linfócitos T e células dendríticas, dirigindo a resposta imune preferencialmente para Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Um polimorfismo no gene CCR5 foi identificado, consistindo na deleção de 32 pares de bases, sendo denominado de CCR5 Δ 32 (Liu *et al.*, 1996). Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes (Smith *et al.*, 1997; Sidoti *et al.*, 2005).

O alelo CCR5 Δ 32 é comum entre Europeus caucasóides (frequência alélica 0,05 - 0,15), porém raro ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios (McNicholl *et al.*, 1997; Martinson *et al.*, 1997; Anzala, *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998; Lebouté *et al.*, 1999; Martinson *et al.*, 2000). A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, como populações nativas da Amazônia Brasileira (Lebouté *et al.*, 1999; Chies e Hutz, 2003) e em Asiáticos (O'Brien & Moore, 2000; Wang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

As diferenças na distribuição mundial do alelo CCR5 Δ 32 podem ser explicadas pela hipótese de que esta mutação surgiu na população Caucasóide (Libert *et al.*, 1998) e teve sua frequência rapidamente aumentada devido à forte pressão seletiva, possivelmente originada por

patógenos que infectam macrófagos: *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* ou *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que estes patógenos poderiam provocar apoptose nestas células de uma maneira CCR5-dependente (Lenski *et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1998). Muito provavelmente teve sua origem na Islândia, aparentemente esta deleção disseminou-se nos séculos VIII, IX e X com os ataques Vikings (Martinson *et al.*, 1997).

Diversos estudos sustentam que a deleção CCR5 Δ 32 poderia estar associada à resistência à infecção pelo HIV (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Zuniga *et al.*, 2003), e que confere proteção contra asma, artrite reumatóide, esclerose múltipla, e rejeição de enxerto renal em Caucásios (Zuniga *et al.*, 2003).

Análises *in vitro* de monócitos de portadores do alelo CCR5 Δ 32 demonstraram uma reduzida resposta quimiotática aos ligantes do CCR5 (Panzer *et al.*, 2005). Como o CCR5 é normalmente expresso em macrófagos, linfócitos T e células dendríticas e dirige a resposta imune, preferencialmente, para o padrão Th1 (Loetscher *et al.*, 1998), estando associada com a inflamação, o alelo CCR5 Δ 32 não funcional resulta em uma resposta Th1 menos efetiva, consequentemente levando a um estado inflamatório mais brando (Chies & Hutz, 2003).

Quimiocinas e câncer de mama

O conhecimento que diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado por pesquisadores desta área, mas o grande desafio da oncologia é o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem o câncer.

O câncer de mama ocorre quando as células mamárias começam a crescer descontroladamente, podendo assim invadir tecidos próximos ou promover metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, cuja evolução depende da interação tumor-hospedeiro. É caracterizado por um padrão metastático distinto, envolvendo linfonodos, medula óssea, fígado e

pulmão. A migração das células tumorais e metastáticas tem muita semelhança com o tráfego de leucócitos, que é regulado por quimiocinas e seus receptores (Muller *et al.*, 2001).

Tem sido proposto que a regulação molecular da disseminação metastática de células tumorais para sítios específicos segue alguns critérios (Wang *et al.*, 1998). Primeiramente, as moléculas envolvidas nesta regulação devem ser constitutivamente expressas nos principais sítios de metástase. Segundo, é necessário que ocorra a adesão das células alvo ao endotélio e migração através deste. Posteriormente, essas moléculas precisam ser capazes de mediar a invasão das células para os tecidos que possuem um microambiente propício. Por último, a metástase requer a expressão de um repertório distinto de receptores pelas células alvo, o que depende do seu padrão de metástase (Muller *et al.*, 2001).

No processo de metástase, receptores de quimiocinas podem agir em conjunto com seus ligantes, influenciando-o. As células malignas expressam um ou mais receptor de quimiocinas, e estudos tem apontado o envolvimento do CXCR4 e CXCR7 na metástase do câncer de mama, e mais recentemente outros receptores, como CXCR3, tem sido propostos como biomarcadores na implicação de uma série de doenças e também para futuros alvos terapêuticos (Fulton, 2009).

O ligante do CXCR4, o CXCL12, é altamente expresso pelos fibroblastos presentes no estroma de tecidos tumorais (Allinen *et al.*, 2004). Células de câncer de mama expressam altos níveis de CXCR4 funcionais, que podem direcionar a quimiotaxia e respostas invasivas (Muller *et al.*, 2001). Altos níveis de expressão de CXCR4 em células neoplásicas também estão associados com uma baixa sobrevida em pacientes com câncer de mama (Li *et al.*, 2006; Luker and Luker, 2006).

Há alguns anos tem se tornado claro que as quimiocinas podem influenciar células tumorais, especialmente as células que expressam receptores de quimiocinas de uma maneira não randômica (Zlotnik, 2006). Apesar dos recentes avanços, pouco é conhecido entre a expressão de quimiocinas e sua relação com no surgimento, desenvolvimento e progressão de tumores, com exceção do conjunto CXCR4/CXCL12 (Panse *et al.*, 2008).

Estudos atuais têm sido realizados para um esclarecimento maior do papel das quimiocinas e seus receptores na patogênese do câncer de mama, e o conjunto CCR5/CCL5 tem sido um modelo de estudo. Evidências experimentais sugerem que a quimiocina CCL5 está relacionada com a progressão de uma série de cânceres, induzindo metástase no câncer de mama (Vaday *et al.*, 2006).

Robinson *et al.* (2003) provaram que animais com linhagens tumorais de mama apresentam uma produção de CCL5 elevada e os leucócitos infiltrados apresentam receptores CCR5. A aplicação de antagonista deste receptor a estes animais proporcionou uma regressão significativa no tamanho dos tumores, indicando uma participação direta na ativação do CCR5 com crescimento de tumores de mama.

O gene p53

Os genes supressores de tumores estão envolvidos no controle de pontos estratégicos da cadeia de eventos que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Esses genes precisam ter os dois alelos alterados para induzir o câncer. O indivíduo heterozigoto para um gene supressor de tumor não apresenta necessariamente neoplasia e sim um risco maior de desenvolvimento (Yamagushi *et al.*, 1997).

O gene p53, mapeado no cromossomo 17, locus p13.1, codifica uma proteína (figura 4) que foi descrita pela primeira vez em 1979, em células transformadas pelo vírus SV40 (Lane *et al.*, 1979). A p53 também é alvo de outros vírus, como o EBV1, HPV16 e HPV18 (Sarnow *et al.*, 1982; Strachan & Read, 2002).

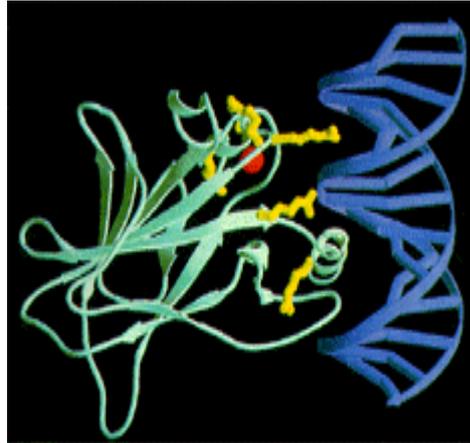


Figura 4: Figura esquemática do produto do gene p53 exercendo sua função no DNA
 Fonte: <http://www.cienciahoje.org.br/4183>

Sua proteína, a p53 (53 kDa) tem como principal função a manutenção da integridade do código genético. Ela funciona como um fator de transcrição, que é responsável por ativar genes de reparo ou de parada do ciclo celular, de acordo com a necessidade, sendo o exemplo clássico de proteína supressora de tumor.

O gene p53 é ativado em resposta a sinais de dano celular e interage com pelo menos 6 genes (Xiong *et al.* 1993). Promove a parada do ciclo celular na fase G1, portanto, antes de ocorrer à duplicação do DNA (fase S), permitindo o reparo do DNA danificado. Uma alternativa de atuação da p53 a danos não reparados é a indução da apoptose. Além disso, a p53 também promove um *check point* de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene.

A linhagem germinativa da p53 tem sido relacionada à hereditariedade para predisposição do câncer (síndrome de Li-Fraumeni). O aumento da quantidade dessa proteína celular tem sido associado à interrupção do ciclo celular e a apoptose. Na célula cujo material genético está danificado, a p53 induz a transcrição do gene p21, que interage com o receptor de ciclina dependente de quinases 2 (cdk2), inibindo-a. Quando a p21 ocorre esta interação a célula é impedida de avançar para o próximo estágio da divisão celular, pois a cdk2 é inativada e representa uma molécula chave para a divisão celular. Quando mutada, a p53 deixa de ativar a produção de p21, tornando a divisão celular um processo descontrolado e podendo facilitar a formação de tumores (Xiong *et al.* 1993).

Portanto, quando o gene p53 sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno (Weinert, 1998; Nakamura *et al.*, 2002).

A genética dos alelos p53 mutantes é intrigante. Os alelos parecem variar funcionando como oncogenes dominantes ou, de um modo recessivo como supressores tumorais, como na grande maioria dos casos. O modo de ação parece depender do tipo específico de mutação e, talvez, da célula ou tecido em questão (Levine, 1997). O tipo de mutação observada em p53 pode dar indícios quanto ao carcinógeno que produziu a mutação, pois algumas substâncias sabidamente carcinogênicas podem induzir mutações específicas em p53. Por exemplo, a ingestão de aflatoxina B1, que pode resultar em câncer de fígado, está associada a uma mutação de G para T que produz uma substituição de arginina por serina na posição 249. A exposição ao tabaco está correlacionada com mutações em três códons do gene que estão associadas ao aparecimento do câncer de pulmão (Jorde *et al.*, 2000).

Como pode ser facilmente observado, um grande número de publicações são encontradas na literatura sobre o papel do gene p53 no funcionamento celular normal e neoplásico, envolvendo todos os tipos de células. Sua alteração em inúmeros tipos de câncer já foi relatada, desde em tumores adrenocorticais, leucemias, linfomas, tumores da mama, carcinomas de pulmão, gastrointestinais, ósseos, até tumores de pele (Hodgson & Maher, 1999; Devereux *et al.*, 1996; de Jong *et al.*, 2002). O trabalho desenvolvido por Saifudeen *et al.* (2002), mostraram que p53 está envolvido na diferenciação bioquímica e morfológica do epitélio renal e que alterações na diferenciação terminal deste epitélio, mediada por esse gene, pode resultar na patogênese da disfunção e disgenesia renais. No rim, a falha da diferenciação epitelial terminal pode causar displasia, cistogênese e câncer. Interessante, também, é que alguns estudos laboratoriais já

mostraram que a inserção de p53 em células tumorais resulta na diminuição da tumorigênese (Jorde *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que polimorfismos no gene p53 têm relação na formação e progressão tumoral, além da responsividade a terapias e que polimorfismos neste gene supressor de tumor, tipicamente de ponto, acarretam defeitos em sua função (Hrstka *et al.* 2009; Whibley *et al.*, 2009).

A atividade da proteína p53 pode ser alterada tanto por mutações em seu gene diretamente, produzindo sequências truncadas ou inativadas, mas também por produção diferenciada de outras proteínas que regulam a atividade da p53, como amplificação e aumento na expressão de Mdm2 ou proteínas virais que inibam ou degradem a p53 (Hrstka *et al.* 2009, Bond *et al.*, 2004).

O polimorfismo do gene supressor de tumor p53 no códon 72 tem sido investigado para associação com vários cânceres em todo o mundo (Kietthubthew *et al.* 2003). O códon 72 codifica um aminoácido arginina (CGC; Arg72) e um prolina (CCC; Pro72), correspondendo a arginina/prolina (Arg/Pro) (Tada *et al.* 2001). O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon que resulta em alteração estrutural da proteína p53 (Thomas *et al.* 1999) . Vários autores têm demonstrado que a presença de Arg/Arg confere maior risco de desenvolvimento de tumores, como em cânceres de bexiga, cérvix uterino (Soulitzis *et al.* 2002), mama (Papadakis *et al.* 2002), pulmão (Papadakis *et al.* 2000). Entretanto, no câncer colorretal não há uma associação clara com este polimorfismo e aumento do risco de câncer (Langerod *et al.* 2002). Estudo recente de Dai *et al.* (2009) concluiu que o alelo prolina no códon 72 do gene p53 esta sujeito a ser um alelo de baixa susceptibilidade para o surgimento de câncer de pulmão.

Objetivos

Objetivo geral

Analisar os polimorfismos do gene supressor de tumor p53 e do receptor de quimiocinas CCR5 em pacientes com câncer de mama

Objetivos específicos

1. Analisar a distribuição dos pacientes quanto a idade, etnia, e estadiamento da doença; analisar a distribuição dos doadores normais quanto a idade e etnia;
2. Analisar comparativamente os genótipos do gene p53 nos doadores normais e pacientes com câncer de mama;
3. Verificar a presença de associação entre os genótipos do codon 72 do gene p53 e estadiamento nos pacientes;
4. Analisar comparativamente os genótipos do gene CCR5 nos doadores normais e pacientes;
5. Analisar a associação dos genótipos CCR5 e do p53 em indivíduos normais e pacientes.

Materiais e métodos

1. População estudada

A população de estudo consistiu de dois grupos do sexo feminino: um grupo de 72 pacientes com câncer de mama provenientes do Hospital do Câncer de Londrina, todos com carcinoma ductal e com o diagnóstico baseado em critério clínico segundo a União Internacional de Controle do Câncer

(UICC, 2002), e um grupo de 90 mulheres saudáveis doadoras de sangue. Este trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual de Londrina, estando de acordo com a resolução 196/96, CNS

2. Obtenção do DNA

Para obtenção do DNA foi coletada uma alíquota de sangue periférico por punção venosa, com tubos de coletas a vácuo, com anticoagulante EDTA. Os tubos foram centrifugados durante 15 minutos numa velocidade de 4.000 rpm, para separação em plasma, leucócitos e hemácias. Os leucócitos foram depositados em tubos tipo coneificados de 15 mL para posterior procedimento de extração de DNA. A técnica utilizada para a extração origina uma molécula de alta massa molecular e consiste basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (Miller *et al.*, 1988).

O DNA obtido foi ressuspendido em 50 µL de água milli-Q autoclavada. A sua concentração foi determinada por espectrofotometria a 260nm (Ultraspec 2000 UV/*Pharmacia Biotech*, Cambridge, England), usando a seguinte fórmula: densidade óptica obtida a 260nm (OD 260) x diluição x 50 = µg de DNA. A concentração do DNA foi ajustada para 0,1µg/µL e as amostras foram mantidas a -20°C até a etapa do PCR para amplificação dos fragmentos em estudo. A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.1. CCR5: Os *primers* para o CCR5 utilizados para a amplificação do fragmento de DNA foram sintetizadas de acordo com a sequência do *GenBank* AF009962.

- *Primer sense*: 5' - tac cag atc tca aaa aga a - 3'

- *Primer anti-sense*: 5' - cat gat ggt gaa gat aag cct ca - 3'

4381 gtgatcactt ggggtggtggc tgtgtttgcg tctcteccag gaatcatctt **taccagatct**
 4441 **caaaaagaa**g gtcttcatta cacctgcagc tctcatttc catacattaa agatagtc
 4501 cttggggctg gtctgcccgc tgettgtcat ggcatctgc tactcgggaa tcttaaaac
 4561 tctgcttcgg tgcgaaatg agaagaagag gcacagggct **tgaggetta tcttcacat**
 4621 **catgattgtt** tattttctct tctgggctcc ctacaacatt gtccttctcc tgaacacctt

A condição da reação de amplificação foi realizada utilizando-se os reagentes da tabela abaixo:

Tabela 2: Reagentes utilizados na reação de amplificação por PCR do gene CCR5

Soluções	Volume
10x PCR Buffer*	2,5µL
MgCl ₂ 50mM*	0,75µL
dNTP 1,25mM**	2,0µL
Primer Sense 2,5µM*	1,5µL
Primer Anti-Sense 2,5µM*	1,5µL
H ₂ O Milli-Q	11,75µL
Taq DNA Polimerase (1,25U/reação)*	2,5µL
DNA Sample (0,1µg/µL)	2,5µL
Total	25,0µL

* INVITROGEN life technologies – Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA.

A PCR foi realizada no termociclador “PCR *Sprint* – *ThermoHybaid*” e consistiram de um ciclo com uma temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 58°C para o anelamento dos *primers*, e um minuto a 72°C para extensão das fitas, e por fim uma temperatura de 72°C durante 10 minutos para uma extensão final.

O produto amplificado desta reação pode originar fragmento de 225pb quando o CCR5 é íntegro ou de 197pb quando este fragmento apresenta deleção de 32 pb ($\Delta 32$).

Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos, e com um controle positivo, no qual utilizou-se DNA de amostra previamente testada e positiva. As amostras foram analisadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 10%, coradas com nitrato de prata.

3.2. p53: Na PCR para o fragmento do p53 os *primers* utilizados foram sintetizados de acordo com a sequência do *GenBank* AY838896.

Arginina:

- *Primer sense*: 5' - TCC CCC TTG CCG TCC CAA – 3'

- *Primer anti-sense*: 5' - CTG GTG CAG GGG CCA CGC – 3'

Prolina:

-*Primer sense*: 5' - GCC AGA GGC TGC TCC CCC – 3'

- *Primer anti-sense*: 5' - CGT GCA AGT CAC AGA CTT – 3'

11948 GGGGACCTGG AGGGCTGGGG GGCTGGGGGG CTGAGGACCT GGTCCTCTGA
 11998 CTGCTCTTTT CACCCATCTA CAG**TCCCCCT TGCCGTCCCA** AGCAATGGAT
 12048 GATTTGATGC TGTCCTCCGA CGATATTGAA CAATGGTTCA CTGAAGACCC
 12098 AGGTCCAGAT GAAGCTCCCA GAAT**GCCAGA GGCTGCTCCC CG/CCGTGGCCC**
 12148 **CTGCACCAGC** AGCTCCTACA CCGGCGGCC CTGCACCAGC CCCCTCCTGG
 12198 CCCCTGTCAT CTTCTGTCCC TTCCCAGAAA ACCTACCAGG GCAGCTACGG
 12248 TTTCCGTCTG GGCTTCTTGC ATTCTGGGAC AGCC**AAGTCT GTGACTTGCA**
 12298 **CGGTCAGTTG** CCCTGAGGGG CTGGCTTCCA TGAGACTTCA ATGCCTGGCC

A condição da reação de amplificação foi realizada utilizando-se os reagentes da tabela

abaixo:

Tabela 3: Reagentes utilizados na reação de amplificação por PCR do códon 72 do gene p53

Soluções	Volume
10x PCR Buffer*	2,5µL
MgCl ₂ 50mM*	0,75µL
dNTP 1,25mM**	2,0µL
Primer Sense 2,5µM*	1,5µL
Primer Anti-Sense 2,5µM*	1,5µL
H ₂ O Milli-Q	12,25µL

Taq DNA Polimerase (1,25U/reacção)*	2,5µL
DNA Sample (0,1µg/µL)	2,0µL
Total	25,0µL

* INVITROGEN life technologies – Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA.

A PCR foi realizada no termociclador “PCR *Sprint – ThermoHybaid*” e sua composição variou de acordo com o conjunto de *primers* utilizados, ou específicos para arginina ou para prolina. O para arginina consistia de um ciclo com uma temperatura inicial 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 58°C para o anelamento dos *primers*, e um minuto a 72°C para extensão das fitas, e por fim uma temperatura de 72°C durante 10 minutos para uma extensão final. O para prolina consistia do mesmo protocolo, variando somente a temperatura de anelamento para 57° C.

Os produtos da amplificação pela PCR de 136 pares de bases para arginina e uma de 178 pares de bases para prolina foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata.

4. Clonagem e sequenciamento

A especificidade dos *primers* utilizados na detecção dos alelos do p53, os produtos de PCR das amostras para os alelos arginina e prolina foram clonados utilizando kit Top isomerase (INVITROGEN *Life Technologies* – Brasil).

4.1. Purificação das amostras

As amostras positivas para arginina e prolina foram purificadas, utilizando 5µL do produto da PCR o qual foi aplicado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo em presença do *ladder* de 100 pb para a identificação da banda correspondente aos alelos arginina (136 pb) e prolina (178 pb), como também de marcadores com concentração previamente conhecidos para se determinar a

concentração das amostras. Os fragmentos correspondente aos alelos arginina e prolina foram recortados e purificados de acordo com o kit de extração e purificação da QIAgen. (*QIAgen - QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*), seguindo as instruções do fabricante.

4.2. Preparo das células competentes:

Foram inoculadas 20 μ L de *Escherichia coli* da linhagem Top-10, em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido, e depois incubados por aproximadamente 20 horas, em agitador horizontal a 180 rpm, à 37°C. Após a incubação, 150 μ L da cultura bacteriana foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido e mantido a 37°C e 180 rpm em agitador horizontal, até atingir uma densidade óptica (DO_{660}) de 0,4-0,6. Em seguida o tubo foi mantido em banho de gelo por 5 minutos e 3 mL dessa cultura foram transferidos para 2 tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados a 5000 rpm, por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 500 μ L de $CaCl_2$ (50mM) foi adicionado. Após homogeneização, juntou-se o conteúdo dos 2 microtubos, que foram mantidos em banho de gelo por 10 min. Foi realizada nova centrifugação a 5000 rpm, por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 300 μ L de $CaCl_2$ (50mM) e mantido em banho de gelo por mais 20 minutos. Ao final do tempo as células competentes foram alicotadas e estocadas a -80°C (50 μ L/tubo).

4.3. Reação de Ligação

Para a reação de ligação foi utilizado o vetor pCR®4-TOPO® (INVITROGEN Life Technologies – Brasil), o qual permite selecionar diretamente os recombinantes através da desativação do gene letal *ccdB* da *E.coli* Top10 (Bernard & Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1994; Bernard *et al.*, 1993). Este vetor contém o gene *ccdB* ligado à porção C-terminal do fragmento LacZ α e a ligação do

produto de PCR interrompe a expressão do gene *LacZα-ccdB*. Deste modo, somente haverá o crescimento de *E. coli* Top10 transformadas.

O vetor pCR®4-TOPO® apresenta a seqüência e característica dada na figura abaixo:

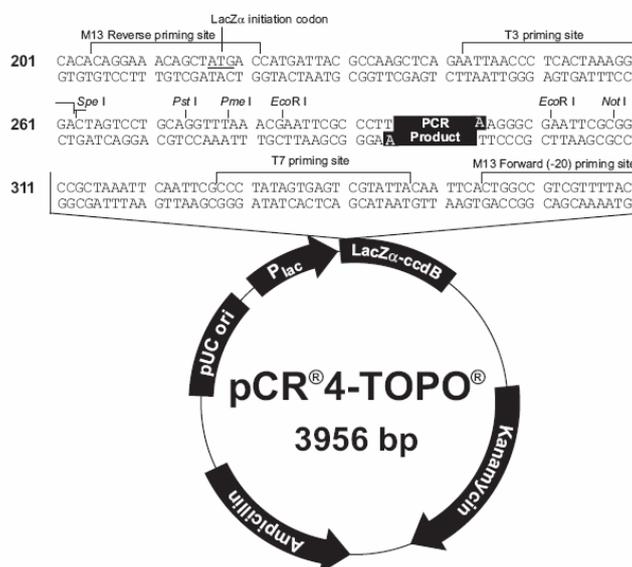


Figura 5: Sequência e características do vetor pCR®4-TOPO® (www.invitrogen.com)

A reação de ligação do produto de PCR purificado com o vetor pCR®4-TOPO® foi realizada segundo o protocolo descrito na tabela 4:

Tabela 4: Reagentes utilizados para a reação de ligação do fragmento amplificado na reação de PCR para o gene p53 com o vetor pCR®4-TOPO®

Soluções	Volume
Produto PCR purificado	1 vetor : 4 fragmento
Solução de sal*	1 µL
Vetor pCR®4-TOPO® *	1 µL
Água esterilizada	Qsp
Volume Final	6 µL

* INVITROGEN *LifeTechnologies*- Brasil.

4.4. Transformação

Foram utilizadas 50 μ L de células competentes as quais foram adicionadas 3 μ L do produto da ligação, mantido em banho de gelo por 20 minutos. Na seqüência, foram incubados em banho-maria à 42°C por 2 minutos e a seguir transferidos imediatamente para banho de gelo. Foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e incubado por 1 hora à 37°C sob agitação (180 rpm). Ao final do tempo a amostra foi centrifugada a 5000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e ao *pellet* foi adicionado 100 μ L de meio LB líquido. As amostras foram inoculadas, com auxílio da alça de *Drigalsk*, em placas de *petri* contendo meio LB sólido acrescido de gentamicina (50-100 μ g/mL) e depois incubadas em estufa à 37°C por 24 horas. Após incubação fez-se a extração do DNA plasmidial das colônias que cresceram mais isoladas.

4.5. Extração do DNA plasmidial (Mini-Prep)

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Incorporation, USA)*, seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante.

4.6. Sequenciamento

O DNA plasmidial foi quantificado e submetido à reação de sequenciamento no termociclador *Eppendorf mastercycler gradient* com *DYEnamicTM ET dye terminator cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Ohio, USA) seguindo os protocolos descritos nas tabelas 5 e 6 e instruções do fabricante.

Tabela 5: Reagentes utilizados para reação de sequenciamento do fragmento amplificado por PCR do gene p53 e clonado em vetor pCR®4-TOPO®

Reagentes	Volume
DYEnamic ET reagent premix	4µL
<i>Primer M13 foward e M13 reverse</i> (10pmoles)	2µL
Fragmento produto de clonagem (300 ng/µL)	4µL
Total	10µL

Primer sense (M13 Foward): GTA AAA CGA CGG CCA G

Primer anti-sense (M13 reverse): CAG GAA ACA GCT ATG AC

Tabela 6: Condições da reação de seqüenciamento do fragmento amplificado por PCR do gene p53 e clonado em vetor pCR®4-TOPO®

1. Temperaturas	2. Tempo	3. Ciclos
95°C	30 seg.	30
53°C	15 seg.	
60°C	1 mim.	

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com 10µL de água milli-Q autoclavada, 2 µL de acetato de amônio 7,5M estéril e 60µL de etanol 96%. Centrifugados por 15 segundos a 3000rpm e mantidos em repouso por 15 minutos a 25°C. Novamente centrifugados a 4000rpm a 25°C por 45 minutos, o sobrenadante foi vertido e adicionou-se 140µL de etanol 70% e posterior centrifugação a 4000rpm por 14 minutos. O sobrenadante foi vertido, o *pellet* secado a 37°C por 15 minutos e ressuspendido em 10µL de tampão (*Loading buffer for Mega Bace*) e submetidos ao sequenciador automático Mega Bace 1000™ (Amershan Pharmacia Biotech – USA).

5. Análise estatística

A frequência do alelo $\Delta 32$ e dos genótipos do p53 foi calculada como: $[1 \times (h + 2H)] / 2N$, onde h representa o genótipo heterozigoto, H o genótipo homozigoto e N o tamanho da amostra para cada população. O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado através do teste de χ^2 . Para todos os dados o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para as características demográficas utilizou-se o programa Microcal Origin™ 4.1.

Resultados e discussão

1. Idade e etnia

O perfil etário dos indivíduos envolvidos no estudo constituiu-se de média de 56,47 anos para os pacientes com câncer de mama e de 36,08 anos para o grupo controle. Os valores de mediana foram similares a média, sendo 59 anos em pacientes com câncer e 36 anos nos indivíduos normais.

O câncer de mama é a neoplasia mais comum que acomete o sexo feminino, representando aproximadamente 18% do total, atingindo mais de 1 milhão de mulheres por ano em todo o mundo (McPherson *et al.*, 2000). No Brasil foi estimado, para o ano de 2008, o diagnóstico de 49.400 novos casos (Instituto Nacional de Câncer, 2008), sendo responsável por 370 mil mortes no ano de 2000 em todo o mundo (Sasco *et al.*, 2003).

Sabe-se que sua incidência é maior em mulheres de idade avançada, sendo que mais da metade dos pacientes nos Estados Unidos e na Europa apresentam uma idade superior a 65 anos (Fentiman, 2002; Crivellari *et al.* 2007). Em nosso estudo, a incidência foi significativamente maior em pacientes acima dos 40 anos de idade ($\chi^2 = 13,889$, 3 graus de liberdade, $p=0,0031$), estando de acordo com os dados de Garicochea *et al.* (2009), no qual 80,7% das pacientes tinham idade superior a 40 anos, e de Moraes *et al.* (2006), estudando 252 pacientes com câncer de mama, verificando que a idade com maior incidência foi de 54,0 anos.

A idade é considerada o maior fator de risco demográfico para o desenvolvimento da maioria das neoplasias (Edwards *et al.* 2002; Thun *et al.*, 2006), e o risco de desenvolvimento de câncer de mama aumenta 1% ao ano na faixa etária entre 50 e 70 anos e 0,4% entre pacientes com 30 e 50 anos (Metcalf *et al.*, 2009).

Esse fator pode estar relacionado com a inabilidade de manutenção e reparo das células somáticas (Kirkwood *et al.*, 2000), pelo acúmulo de danos celulares e moleculares que ocorrem nas células com o passar dos anos (Hasty *et al.*, 2003), aumento na instabilidade genômica (Geigl, 2004; Ly 2000), mudanças epigenéticas globais e promotores específicas (Issa, 1999; Richardson, 2003), e também pela alteração de expressão gênica com envolvimento na divisão celular e remodelamento da matriz extracelular (Geigl, 2004, Ly 2000).

O perfil étnico em nosso grupo de pacientes com câncer de mama foi 67 caucasóides e 5 negros. Já no grupo de indivíduos normais foram representados por 81 caucasóides, 2 negros, 5 pardos e 2 não informados. (Tabela 10).

Segundo o *National Cancer Institute* (2007), a incidência de câncer de mama em mulheres americanas é ligeiramente maior em pacientes de etnia caucasóide, com 132,5/100.000, enquanto negros apresentam uma incidência de 118,3/100.000. Porém a taxa de mortalidade é maior nos negros, alcançando 33,8/100.000 em comparação de 25,5/100.000 nos caucasóides, além de desenvolverem a doença em idade mais precoce, apresentar um pior prognóstico, envolvendo tumores significativamente maiores e de grau mais alto e taxas elevadas de receptores de estrógeno e progesterona negativo (Bowen *et al.* 2006).

A distribuição do câncer de mama em estadiamentos é uma variável importante para determinação de diagnóstico, tipo de tratamento, acompanhamento e prognóstico da doença.

No presente trabalho a maioria dos pacientes com câncer de mama se encontravam nos estágios II e III (30 e 29 pacientes, respectivamente), seguido pelo estágio I (10 pacientes) e pelo estágio IV (3 pacientes).

Como pode ser observado na tabela 7, foi verificado maior incidência de pacientes com câncer de mama entre 40 e 59 anos, de etnia caucasóide e também um número maior de pacientes com estadiamentos em grau II e III.

Tabela 7: Distribuição dos pacientes com câncer de mama quanto a idade, etnia e estadiamento e distribuição das doadoras saudáveis quanto a idade e etnia

	Controle (90)	Câncer de mama (72)				Total
		Estagio I (10)	Estagio II (30)	Estagio III (29)	Estágio IV (3)	
Idade (anos)						
20-39	59 (65,55%)	0	1 (1,38%)	4 (5,55%)	0	5
40-49	19 (21,11%)	2 (2,77)	9 (12,5%)	7 (9,72%)	1 (1,38%)	19
50-59	10 (11,11%)	4 (5,55%)	8 (11,11%)	9 (12,5%)	1 (1,38%)	22
≥60	2 (2,22%)	4 (5,55%)	12 (16,66%)	9 (12,5%)	1 (1,38%)	26
Grupo Étnico						
Caucasóide	81 (90%)	10 (13,9%)	29 (40,27%)	25 (34,7%)	3 (4,16%)	67
Negro	2 (2,22%)	0	1 (1,38%)	4 (5,55%)	0	5
Mulato	5 (5,55%)	0	0	0	0	0
Não informado	2 (2,22%)	0	0	0	0	0

Análise Molecular

1. Para o p53

O códon 72 pode codificar um aminoácido arginina (CGC; Arg72) e um prolina (CCC; Pro72), podendo originar uma célula heterozigota, apresentando um alelo arginina e outro prolina (Arg/Pro). O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon que resulta em alteração estrutural da proteína p53.

O fragmento amplificado com *primer* para o alelo arginina observado no gel de acrilamida representa a presença desse aminoácido no códon 72 do cromossomo 17, da mesma maneira para o fragmento amplificado com o *primer* do alelo prolina. A amostra que amplificou para os dois alelos é considerada heterozigota arginina/prolina. A amostra que amplificou apenas para o

alelo arginina (136pb) é considerada homozigota arginina e a que amplificou apenas para prolina (178pb) é considerada homozigota prolina (Figura 6).

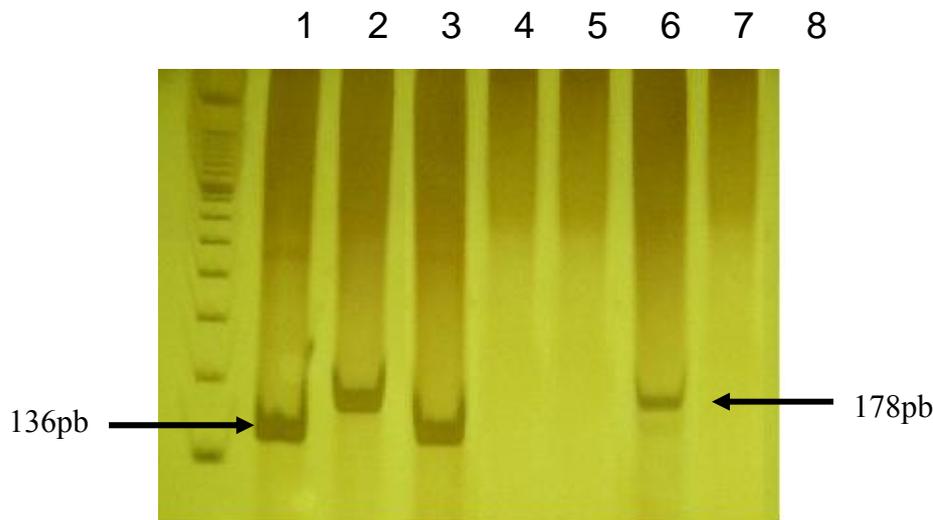


Figura 6: Análise do genótipo para o códon 72 do p53. Eletroforese dos produtos de PCR. 1 – Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Promega), 2 e 3 – Amostra positiva para o alelo arginina (136pb) e prolina (178pb), respectivamente; 4 e 5 – Amostra positiva para o alelo arginina e negativa para o alelo prolina, respectivamente; 6 e 7 – amostra negativa para o alelo arginina e positiva para o alelo prolina, respectivamente; 8 – Controle negativo

A fim de verificar a especificidade dos *primers* utilizados para detecção do alelo Arginina e Prolina, as amostras do produto de PCR foram clonadas e os plasmídeos extraídos foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências disponíveis no *GenBank* da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde estas seqüências apresentaram identidade significativa com as seqüências Arg ou Pro do códon 72-p53 cadastradas neste banco de dados. O número de acesso é *GenBank* AY838896 e a seqüência está localizada na região ORF1, entre as posições 61-301. O eletroferograma da seqüência obtida está representado na Figura 7.

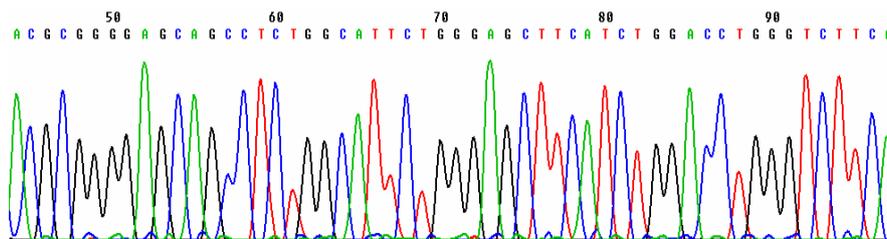


Figura 7: Eletroferograma dos produtos de clonagem do p53
.A seqüência obtida é referente a 136 e 178 bases compatível com o *GenBank* Acession AY838896

A PCR alelo específica foi realizada para todas as 72 amostras dos pacientes com câncer de mama e para as 90 amostras de indivíduos saudáveis, na ausência da clínica para câncer de mama. Nos pacientes com câncer obtivemos a maior frequência de alelos homozigotos para arginina (40/72), seguido dos heterozigotos (29/72) e dos homozigotos para prolina (3/72). Na distribuição genotípica (figura 8) dos indivíduos normais foi encontrada uma maior ocorrência do genótipo em heterozigose (53/90), seguidos pelos homozigotos para arginina (30/90) e dos homozigotos para prolina (7/90).

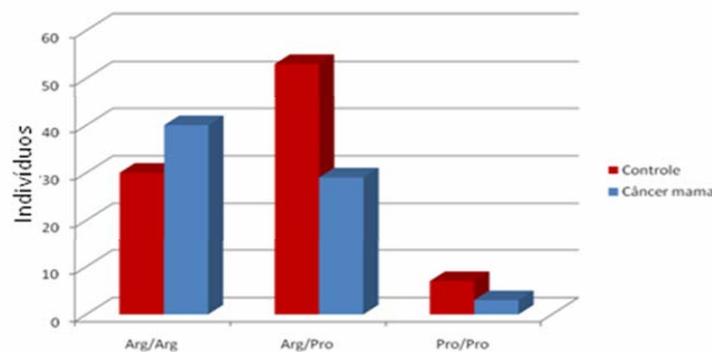


Figura 8: Análise comparativa dos genótipos do gene p53 nos doadores normais e doadores saudáveis. No grupo dos pacientes com câncer de mama, 55,56% apresentaram o genótipo Arg/Arg, 40,28% apresentaram o genótipo Arg/Pro e 4,17% apresentaram o genótipo Pro/Pro. No grupo dos doadores saudáveis 33,33% apresentaram o genótipo Arg/Arg, 58,89% apresentaram o genótipo Arg/Pro e 7,78% apresentaram o genótipo Pro/Pro.

No presente estudo, foi observada diferença significativa em relação ao genótipo da arginina em homozigose nos pacientes com câncer de mama quando comparado ao grupo controle (55,55% e 33,3%, respectivamente; $p < 0,05$), como demonstra a Tabela 8:

Tabela 8. Distribuição genotípica do gene p53 nos pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis.

	Número de amostras	Genótipo		
		Arg/Arg ^c	Arg/Pro	Pro/Pro
Câncer de mama ^a	72	40 (55,5%)	29 (40,3%)	3 (4,2%)
Grupo Controle ^b	90	30 (33,3%)	53 (58,9%)	7 (7,8%)

^a: χ^2 em HWE=0,664, 2 graus de liberdade, $p > 0,05$; ^b: χ^2 em HWE=6,0867, 2 graus de liberdade, $p > 0,05$; ^c: Pacientes com cancer de mama x grupo controle: $\chi^2=8,153$, $p=0,0170$ (2 graus de liberdade, $p < 0,05$)

Outro aspecto observado foi a relação do genótipo do códon 72 do p53 com o estadiamento em câncer de mama (Figura 9). Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos, uma tendência foi verificada nos pacientes no estágio III associadas com genótipo Arg/Arg ($p=0,0503$).

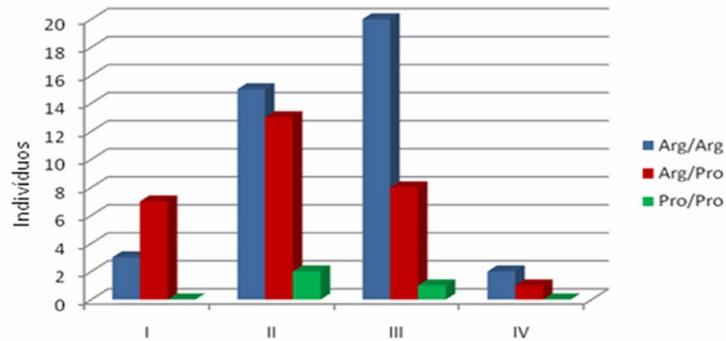


Figura 9: Associação entre os genótipos do codon 72 do gene p53 e estadiamento nos pacientes com câncer de mama. Uma tendência a associação entre o genótipo homocigoto para arginina e estadiamento III foi encontrada ($p=0,0503$)

A presença de Arg/Arg pode conferir maior risco de desenvolvimento de tumores, porém a ocorrência da mutação do gene p53 para o códon 72 ainda é controversa, variando entre estudos, populações e quadros patológicos. Em um estudo recente com 113 pacientes com câncer de mama no Brasil, Vieira *et al.* (2008) observaram uma frequência genotípica de 57% Arg/Arg e 39% de pacientes heterocigotos no códon 72 com câncer de mama, dados que encontram-se em acordo com este estudo. Akkiprik *et al.* (2008), estudando pacientes com câncer de mama oriundos da Turquia, observaram que estes apresentaram uma maior frequência dos genótipos não homocigotos para arginina. Esses dados ilustram a diferença na frequência alélica de polimorfismos genéticos é variante com a etnia da população estudada.

Em alguns estudos não foram observadas relações entre o polimorfismo Arginina/Prolina em pacientes com câncer de mama. No estudo de Tommiska *et al.* (2005) foi relatado que os genes arginina e prolina foram observados em frequências semelhantes em pacientes com câncer de mama, porém houveram diferenças significativas nos genótipos quando foi realizada análise histopatológica.

Pacientes homozigotos para prolina apresentaram carcinoma lobular e tumores de grau 1 numa frequência significativamente maior. Já pacientes portadores do alelo arginina apresentaram uma frequência significativamente maior de carcinomas ductais e tumores de grau 3. Os autores também demonstraram que pacientes homozigotos para prolina apresentam menor sobrevida do que os outros genótipos. Papadakis *et al.* (2000), verificaram que pacientes com câncer de mama apresentaram um aumento significativo no genótipo Arginina em homozigose em relação ao Prolina em homozigose.

Pacientes caucasóides tendem a apresentar uma maior proporção de indivíduos homozigotos para arginina, enquanto os asiáticos uma maior proporção de indivíduos homozigotos para prolina (Siddique *et al.* 2005; Beckman *et al.* 1994). Siddique *et al.* (2005) observaram que acima de 75% dos pacientes chineses com câncer de mama em heterozigose no códon 72 expressam preferencialmente o alelo arginina. Tem sido sugerido que a expressão dos diferentes polimorfismos para p53 é seletivamente regulada nos diferentes grupos étnicos e que o alelo arginina é ativado durante o desenvolvimento do câncer em asiáticos. Portanto, nos heterozigotos, o estado de expressão do polimorfismo p53, melhor do que o seu estado genotípico, pode ser um indicador para a susceptibilidade ao câncer.

Estudos moleculares realizados nos dão pistas de como esse polimorfismo genético pode influenciar no processo de tumorigênese. Sansone *et al.* em 2007 verificaram que células com o alelo prolina no códon 72 do gene p53 expostas à hipóxia induzem uma maior taxa de morte celular quando comparado com o alelo arginina. É proposto, que o alelo prolina induz a expressão de níveis mais baixos de genes de sobrevida na hipóxia, como CA-IX, c-MET, entre outros. Com isso ele sugere que linhagens tumorais portadoras do alelo prolina proporcionam uma desvantagem na sobrevivência das células. Transfecção *in vitro* do alelo arginina induz uma maior taxa de morte celular sob normoxia, enquanto a morte celular foi maior em células transfectadas com prolina em situação de hipóxia (Vannini *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que este alelo prolina é benéfico,

uma vez que um ambiente de hipóxia pode ser menos permissivo ao crescimento de células cancerosas.

É sugerido que o alelo arginina em homozigose pode responder de forma mais favorável a rádio e quimioterapia (Dumont *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que a presença do alelo arginina é um potente indutor de apoptose em comparação com a prolina (Banafé *et al.*, 2004; Dumont *et al.* 2003; Pim *et al.* 2004), podendo este ser menos permissivo para o crescimento tumoral, refletindo resultados mais favoráveis em pacientes com carcinoma avançado de cabeça e pescoço (Sullivan *et al.*, 2004).

Os alelos arginina e prolina no códon 72 do gene p53 podem ter influência também na evolução do câncer de mama. No estudo de Wegman *et al.* (2008), foi observado que a perda do alelo prolina durante a carcinogênese pode conferir uma vantagem no crescimento para as células tumorais, porém a perda do alelo arginina pode ser mais nocivo, visto que com isso o prognóstico se torna pior. Em outro estudo, pacientes com câncer de mama com prolina em homozigose no códon 72 do gene p53 apresentaram uma pior DFS (*Disease free survival*) quando o p53 encontrava-se sem mutações (Xu *et al.*, 2008; Toyama *et al.*; 2007). A associação do genótipo Pro/Pro com pior DFS foi especialmente significativa quando os pacientes receberam quimioterapia, de forma diferente dos que receberam terapia hormonal ou sem terapia (Toyama *et al.*; 2007). Pacientes com câncer de mama metastático homozigoto para arginina tiveram um tempo de progressão e sobrevida menor do que pacientes com tumores heterozigotos (Vannini *et al.*, 2008).

Pacientes com tumor de mama homozigotos para o alelo prolina apresentam menor frequência de mutações somáticas no p53 do que os pacientes portadores do alelo arginina (Langerød *et al.* 2002; Noma *et al.* 2004). Em estudo realizado para determinação do polimorfismo genético do códon 72 do gene p53 em pacientes com câncer de mama, Langerød *et al.* (2002) obtiveram uma frequência alélica de 0,76 para a arginina e de 0,24 para a prolina. Neste estudo os autores determinaram mutações no gene p53 e as relacionaram com o polimorfismo genético do códon 72.

Foi possível observar que pacientes homocigotos para arginina apresentavam uma taxa de mutação no p53 de 28,5%, enquanto que nos pacientes homocigotos para prolina foram apenas 3,8%, sendo que estas mutações ocorreram preferencialmente nos exons 5-8. Nos pacientes com genótipo em heterocigose Arg/Pro para p53, foi determinado que 64,28% destes apresentavam a mutação no alelo arginina. Estes resultados sugerem que o polimorfismo genético do códon 72 preferencialmente tendendo para arginina pode estar de alguma forma relacionado a alterações funcionais do gene supressor de tumor p53, e com isso pode haver um favorecimento no crescimento de células epiteliais das mamas, aumentando o risco de ocorrência de uma transformação maligna e o desenvolvimento de câncer.

O polimorfismo genético no códon 72 do gene p53 origina a proteína p53 com conformações distintas e alterações funcionais (Dumont, 2003). Pode interferir tanto na capacidade desta de conseguir se ligar a sequências específicas do DNA ou na interação e recrutamento de maquinaria de transcrição, podendo causar uma transcrição defeituosa (Campomenosi, 2001). Existe também a possibilidade de o alelo arginina estar envolvido de forma direta na capacidade da proteína p53 de se ligar e interagir com outras proteínas, como a p73 (Di Como, 1999).

A proteína originada a partir do alelo arginina foi observada como sendo mais susceptível à degradação pela proteína 18 E6 do HPV (Storey, 1998). Mas apesar de alguns estudos relacionarem um aumento no risco do câncer causado pelo HPV ao polimorfismo genético do códon 72, ainda não existe um consenso entre polimorfismo p53 e câncer causado por HPV (Dumont, 2003). Alguns autores como Govan (2007) não encontraram relação entre o polimorfismo genético do códon 72 e a incidência de câncer causado por HPV. Já outros autores como Min-min (2006) e Ciotti (2006) verificaram que a presença do alelo arginina em homocigose aumenta o fator de risco do HPV na indução câncer. Haws *et al* (2005) demonstraram que pacientes com anormalidades cervicais e infecção pelo HPV16 e HPV18 apresentaram menor frequência genotípica em homocigose para arginina.

Populações que vivem ao norte do globo, como finlandeses e suecos, apresentam uma proporção do alelo prolina no códon 72 do gene p53 significativamente mais baixa do que populações que vivem próximos à linha do equador, como nigerianos (Sjalander, 1995; Beckman 1994). Essa diferença sugere que este polimorfismo genético pode estar relacionado com fatores de seleção natural para ambientes com altas taxas de incidência de luz ultra-violeta, sugerindo que a incidência da radiação ultra-violeta pode alterar a conformação da proteína p53 com consequente indução de câncer de pele nestas populações (Beckman, 1994).

2. Para o CCR5

O polimorfismo no gene do receptor CCR5, o qual consiste na deleção de 32 pares de bases, denominado de CCR5 Δ 32, resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes.

Na figura 10 é possível observar os diferentes genótipos para o CCR5. O CCR5/CCR5 representa o genótipo na ausência de deleção, apresenta uma única banda eletroforética com 225pb, CCR5/ Δ 32 representa o genótipo em heterozigose, o qual apresenta duas bandas eletroforéticas: 225pb e 193 pb, Δ 32/ Δ 32 representa o genótipo em homozigose para a deleção, com uma única banda de 193 pb. O polimorfismo genético do CCR5 tem sido estudado por nosso Laboratório em sistema HIV (Reiche *et al* , 2008), esclerose múltipla (Kaimen-Maciel *et al*, 2007) e caucasóides (Muxel *et al.*, 2008).

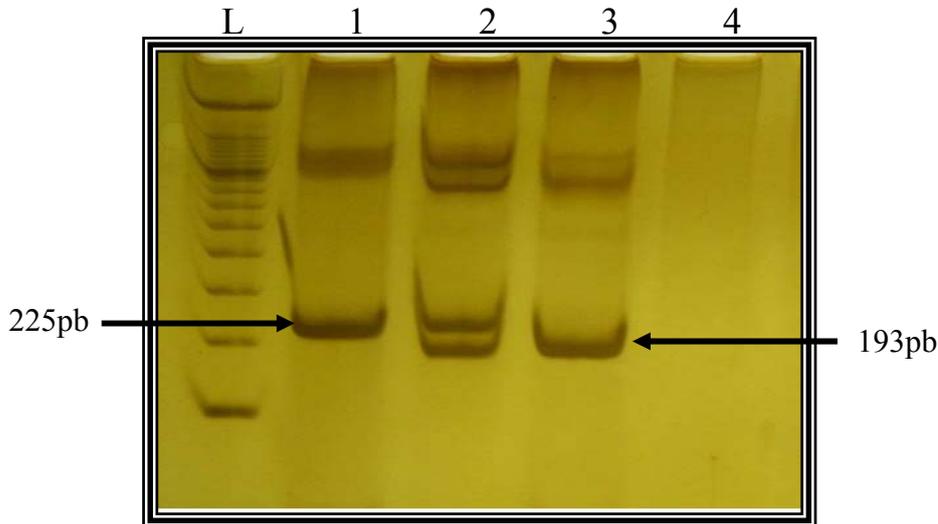


Figura 10: Análise do polimorfismo genético do receptor de quimiocina CCR5. Representação de diferentes genótipos do receptor de quimiocina 5. Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com prata. Onde L representa o Ladder 100pb, (Promega), 1 o genótipo selvagem para o CCR5 (225pb); 2 o genótipo heterozigoto (225 e 193pb); 3 o genótipo homozigoto (193pb) para o alelo variante; e o 4 o controle negativo.

Da mesma forma que para o p53, a PCR do CCR5 foi realizada para as 72 amostras de câncer de mama e para as 90 de indivíduos normais. Nos pacientes com câncer de mama obtivemos uma maior incidência de alelos homozigotos CCR5/CCR5 (67/72), e o restante representado por alelos heterozigotos (5/72). Não observamos a ocorrência de nenhum homozigoto $\Delta 32/\Delta 32$ (Figura 11). A frequência do alelo $\Delta 32$ foi de 3,47% nessa população.

Já nos indivíduos saudáveis a maioria é representada por indivíduos homozigotos CCR5/CCR5 (77/90), seguido do genótipo heterozigoto (12/90) e com uma amostra apresentando o genótipo $\Delta 32/\Delta 32$ (Figura 11). A frequência alélica do $\Delta 32$ nessa população foi de 15,55%.

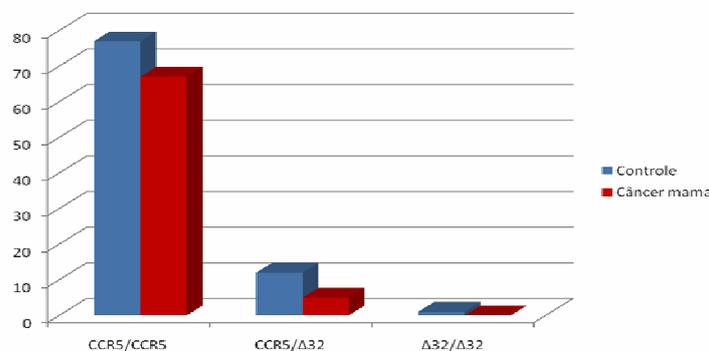


Figura 11: Análise comparativa dos genótipos do gene CCR5 nos indivíduos normais e pacientes com câncer de mama. No grupo dos pacientes com câncer, 67 apresentaram o genótipo CCR5/CCR5, 5 apresentaram o genótipo CCR5/ $\Delta 32$ e nenhum apresentou o genótipo $\Delta 32/\Delta 32$. No grupo controle, 77 apresentaram o genótipo CCR5/CCR5, 12 apresentaram o genótipo CCR5/ $\Delta 32$ e 1 apresentou o genótipo $\Delta 32/\Delta 32$.

Não observamos nenhuma relação significativa entre a frequência alélica do CCR5 e $\Delta 32$ entre o grupo de pacientes com câncer de mama e os indivíduos saudáveis após correção de Yates ($p=0,270$) e as populações estudadas não apresentaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

É conhecido que as quimiocinas possuem a propriedade de ativarem linfócitos T, entretanto o padrão de ativação pode diferenciar de acordo com as diferentes interações quimiocinas-receptores (Nanki *et al.*, 2001). O CCR5 tem um papel chave no recrutamento de monócitos, macrófagos e células T para local de inflamação (Panzer *et al.*, 2005), dirigindo o resposta imunológica para a padrão Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Já é conhecido o papel das quimiocinas como importantes determinantes na resposta inflamatória inicial e imunológica. Porém a relação entre estas moléculas e outras do sistema imunológico e de reparo, além de seus polimorfismos, ainda precisam ser mais bem elucidadas para se estabelecer qual o seu envolvimento, influencia na resistência e susceptibilidade a doenças (Muxel *et al.*, 2008).

Quando analisados em conjunto a deleção $\Delta 32$ do CCR5 e a frequência do haplótipo HLA entre populações, por exemplo, temos evidências de que a distribuição de diversas moléculas imunológicas podem agir em conjunto para formar uma resposta imune diferente no hospedeiro (Poland *et al.*, 2008; Carrington *et al.*, 2008).

van Deventer *et al.* (2006) demonstraram que camundongos expressando CCR5 apresentaram um aumento no crescimento tumoral e uma resposta ineficiente à terapia com vacinas em comparação a camundongos *knockout* para CCR5. Estes mesmo autores demonstraram também que a expressão do CCR5 em células de estroma, e não em células hematopoiéticas, contribui para o processo de metástase.

CCR5 e RANTES, seu ligante, foram mais expressos em câncer de mama, além das amostras com estadiamento mais avançado conterem RNAm de CCL5 em maior quantidade. Subpopulações de linhagem de câncer de mama MCF7 CD44+/CD24- tiveram expressão de CCR5 e

também capacidade de invasão mais alta do que a CD44+/CD24+. Quando se ativa as células dessas 2 subpopulações com rhCCL5 aumenta a habilidade de invasão celular, que pode ser parcialmente antagonizada por Anticorpo anti CCR5 (Zhang *et al.*, 2009). Chuang *et al.* (2009) obtiveram o mesmo resultado de aumento do RNAm de CCL5 em amostras de câncer oral, especialmente nas com maior grau de invasividade. A estimulação dessas células com CCL5 ocasionou aumento na invasão celular.

É possível sugerir que o desenvolvimento tumoral nos pacientes portadores do alelo CCR5 Δ 32 seja mais acentuado devido ao funcionamento ineficaz da resposta Th1 via CCR5 e seus ligantes. Portanto, este trabalho abre perspectivas para maiores estudos envolvendo a análise do curso clínico da doença que poderão relacionar a deleção do gene CCR5 com a patogênese do câncer de mama.

3. Relação p53 x CCR5

Já foi verificado que sinais gerados pela ativação do receptor CCR5 podem regular a transcrição de vários genes alvos de p53 em diversos tipos de linhagens celulares (Jordan-Sciutto *et al.* 2001).

Santos Mañes *et al* (2003) realizaram um estudo no qual relacionam a proteína de membrana CCR5 com o gene supressor de tumor p53. Neste estudo foi verificado que linhagens celulares com CCR5 íntegro e p53 normal, quando estimuladas com RANTES, apresentam um nível aumentado de genes regulados pelo p53, como o mdm2 e o p21. Também foi verificado que quando houve estimulação pelo CCL5 em linhagens celulares com o CCR5 íntegro, porém com o p53 mutado e linhagens com o CCR5 Δ 32 e p53 normal, não foi verificado aumento na expressão dos genes regulados pelo p53. Os autores propuseram que as vias de sinalização que participam da conexão entre CCR5 e p53 envolvem ativação das etapas enzimáticas de JAK-2, Gi e p38 MAPK. Quanto ao índice de crescimento tumoral, estes mesmos autores propõem que linhagens de células tumorais com genótipo p53 normal e CCR5 mutado apresentam uma maior taxa de crescimento *in vivo*. Já em relação à apoptose, não houve diferença entre as células CCR5 normais e CCR5 Δ 32.

A diminuição no CCR5 funcional pode acelerar o crescimento tumoral quando o p53 se apresenta normal, provavelmente devido à diminuição do p21, que age como inibidor da Cdk. No estudo realizado por Santos Mañes, foi observado frequência alélica de 7,86% para o gene CCR5 Δ 32. Os autores sugerem que o CCR5 não está relacionado à susceptibilidade ao câncer de mama. Porém, quando a análise foi realizada em relação à classificação dos tumores com relação a tamanho e grau, houve uma diferença estatisticamente significativa nos de grau 4, com uma frequência alélica do Δ 32 de 14,3%. Na progressão da doença, geralmente quando os tumores não apresentaram o p53 mutado houve um melhor prognóstico. Já na sobrevida livre de doença (*Disease Free Survive*), pacientes que tinham o gene CCR5 Δ 32, tanto em homozigose quanto em heterozigose, apresentavam uma sobrevida significativamente menor do que os que possuíam o gene CCR5/CCR5, quando ambos apresentam o p53 normal. O CCR5 e p53 ausentes de mutações apresentaram um prognóstico significativamente melhor do que o CCR5 íntegro e p53 mutado. Esses dados analisados em conjunto podem sugerir que a atividade do CCR5 pode influenciar a progressão do câncer de mama de uma maneira dependente do p53.

Com base no artigo de Santos Mañes, investigamos os genótipos do CCR5 e p53 em pacientes com câncer de mama e comparamos com os doadores normais, apresentadas nas figuras 12 e 13:

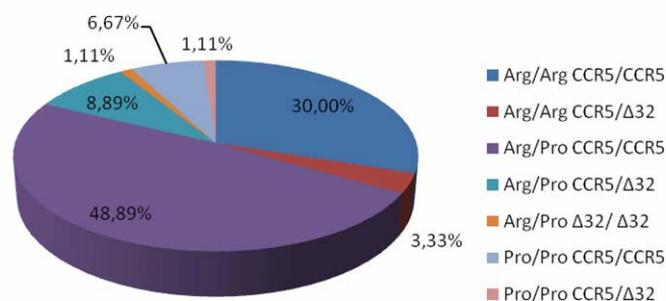


Figura 12: Relação entre a genotipagem do CCR5 e do p53 em indivíduos normais. Foi observado indivíduos com deleção CCR5 em homozigose. Entre os indivíduos normais, 30,0% apresentaram genótipo arginina em homozigose com CCR5 íntegro, enquanto 48,89% forma heterozigotos para o p53 e com CCR5 íntegro

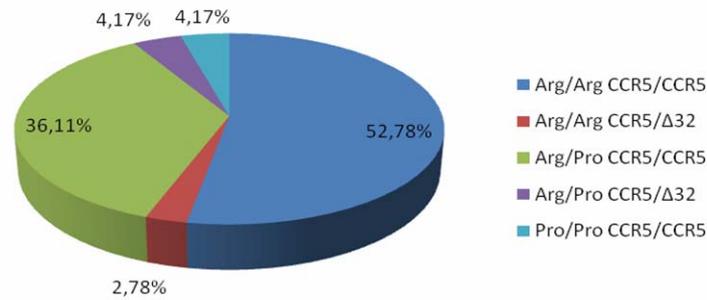


Figura 13. Relação entre a genotipagem do CCR5 e do p53 em indivíduos com câncer de mama. Não foi observado pacientes com deleção CCR5 em homozigose. Entre os pacientes, 52,78% apresentaram genótipo arginina em homozigose com CCR5 intergo.

Nos indivíduos com câncer de mama, dos 5 que apresentaram o alelo $\Delta 32$, 3 apresentaram o genótipo em heterozigose para o códon 72 do gene p53 porém sem metástase, e os outros 2 pacientes apresentaram o genótipo homozigoto para arginina, ambos apresentaram metástase óssea. O genótipo CCR5 $\Delta 32$ pode apresentar uma relação com o gene p53 no processo de progressão da doença.

Nos estudos *in vitro* e em animais experimentais realizados por Santos Mañes (2003) e a relação CCR5 x p53 proposta pelos autores indicam que CCR5 e p53 normal proporcionam uma maior tradução dos genes regulados pelo p53. Porém estudando mulheres com câncer de mama foi observado distribuição similar dos genótipos não havendo relação de genótipos CCR5 com a incidência de câncer de mama.

Os resultados obtidos *in vitro* por Santos Mañes demonstram que indivíduos com o CCR5 deletado para 32 pb, podem interferir negativamente na via de ativação do p53 e com isso tendenciar a uma maior susceptibilidade ao aparecimento de tumores. Com relação ao estudo genotípico do p53 nossos resultados demonstraram que o número de portadores do alelo $\Delta 32$ teve maior ocorrência nos indivíduos normais (15,55%) do que nos pacientes com câncer de mama (3,47%).

Em pacientes com câncer de mama do presente estudo, não foi verificado genótipo CCR5 $\Delta 32$ em homozigose, sendo que os indivíduos normais apresentaram maior número de

portadores do alelo CCR5 deletado. Estes resultados demonstram que não houve correlação do genótipo CCR5 em pacientes com câncer de mama, estando de acordo com o que propõe Santos Mañes, sobre a ausência da influência do alelo $\Delta 32$ na susceptibilidade a câncer de mama.

Em outros estudos (Luboshit *et al.* 1999; Niwa *et al.* 2001), foram observados, em contraste ao resultado obtido por Santos Mañes (2003), altos níveis de RANTES (CCL5) em pacientes com câncer de mama avançado, chegando a atingir até 27% nestes pacientes. Isto demonstra que o CCL5 pode induzir a progressão de tumores de mama em alguns pacientes.

A relação entre CCR5 e p53 precisa ser melhor estudada, para que seu envolvimento no processo de evolução, no prognóstico do câncer, na metástase, possa ser mais bem avaliado, visto que mecanismos celulares e moleculares são criticamente importantes para o desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento do câncer.

Conclusões

- A idade média nos pacientes com câncer de mama no estudo foi de 56,47 anos, e do grupo controle foi de 36,08 anos;
- O grupo étnico tanto dos pacientes quanto do grupo controle foi em sua grande maioria de caucasóides;
- O grupo de pacientes encontravam-se a maioria no estágio II e III, seguidos pelo estágio I e IV;
- Houve uma tendência a significância entre os pacientes com câncer de mama no estágio III e genótipo Arginina em homozigose;
- O genótipo em homozigose para Arginina foi observado em 33,33% dos indivíduos normais e 55,55% dos pacientes com câncer de mama. Encontramos uma diferença estatisticamente significativa para o genótipo arginina em homozigose nesses dois grupos;
- Dentre os indivíduos normais, 15,55% foram portadores da deleção $\Delta 32\text{pb}$, enquanto apenas 3,47% foram portadores deste alelo em pacientes com câncer de mama;
- O alelo com deleção de 32bp para CCR5 ocorreu em 5 pacientes com câncer de mama, sendo que 3 apresentaram genótipo para o p53 em heterozigose porém sem metástase, e os outros 2 apresentaram genótipo em homozigose para arginina, apresentando metástase óssea;
- No presente trabalho foi possível observar que houve diferença quanto ao alelo Arginina entre pacientes com câncer de mama e indivíduos normais, porém não houve associação entre a mutação do códon 72 do p53 com o polimorfismo do CCR5;

Referências

- Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM, Caglar HB, Kaya H, Demirkalem P, Abacioglu U, Sengoz M, Sav A, Ozer A. *Analysis of p53 Gene Polymorphisms and Protein Over-expression in Patients with Breast Cancer*. **Pathol Oncol Res**. 2008 Dec 2.
- Alberts B, Johnson A, Walter P; *Biologia Molecular da Célula - 4ª Ed.*, Editora Artmed, 2004. 1549p
- Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers W, Polyak K; *Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer*. **Cancer Cell**. 2004 6(1):17-32.
- Amarante MK, Watanabe MA.; *The possible involvement of virus in breast cancer*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2009 Mar;135(3):329-37.
- Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL; *CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women*. **University of Nairobi Collaboration for HIV Research. Lancet**, 1998 3051(9116):1632-3.
- Baggiolini M.; *Chemokines and leukocyte traffic*. **Nature**. 1998 392(6676):565-8.
- Baggiolini M; *Chemokines in pathology and medicine*. **J Intern Med**. 2001 250(2):91-104
- Baggiolini M, Dahinden CA. *CC chemokines in allergic inflammation*. **Immunol Today**. 1994 15(3):127-33.
- Baggiolini M, Moser B. *Blocking chemokine receptors*. **J Exp Med**. 1997 20;186(8):1189-91.
- Beckman G, Birgander R, Sjalander A; *Is p53 polymorphism maintained by natural selection?* **Hum Hered** 1994 44:266 – 70.
- Bedoya F, Meneu JC, Macías MI, Moreno A, Enríquez-De-Salamanca R, Gonzalez EM, Vegh I.; *Mutation in CNR1 gene and VEGF expression in esophageal cancer*. **Tumori**. 2009 95(1):68-75.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. *A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans*. **Cell**. 2004 24;119(5):591-602.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. **J Exp Med**. 1998 5;187(1):129-34.
- Bowen RL, Stebbing J, Jones LJ; *A review of the ethnic differences in breast cancer*. **Pharmacogenomics**. 2006 7(6):935-42.
- Brody JG, Moysich KB, Humblet O, Attfield KR, Beehler GP, Rudel RA; *Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies*. **Cancer**. 2007 15;109(12 Suppl):2667-711.
- Butcher EC, Picker LJ. *Lymphocyte homing and homeostasis*. **Science**. 1996 Apr 5;272(5258):60-6

- Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R., and Fronza, G. *p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements.* **Oncogene**, 2001, 20: 3573–3579.
- Carrington M, Martin MP, van Bergen J; *KIR-HLA intercourse in HIV disease.* **Trends Microbiol.** 2008 16(12):620-7.
- Cetin I, Cozzi V, Antonazzo P.; *Infertility as a cancer risk factor - a review;* **Placenta.** 2008 29 169-77.
- Chang HY, Ahn SH, Kim DY, Shin JS, Kim YS, Hong SP, Chung HJ, Kim SO, Yoo WD, Han KH. *Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection;* **Korean J Hepatol.** 2005 Jun;11(2):116-24
- Chies, JA, Hutz, MH. *High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia.* **Braz J Med Biol Res.** 2003 36(1):71-5.
- Chong YM, Subramanian A, Sharma AK, Mokbel K; *The potential clinical applications of insulin-like growth factor-1 ligand in human breast cancer.* **Anticancer Res.** 2007 27(3B):1617-24.
- Chuang JY, Yang WH, Chen HT, Huang CY, Tan TW, Lin YT, Hsu CJ, Fong YC, Tang CH.; *CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells;* **J Cell Physiol.** 2009
- Ciotti M, Coletti A, Giuliani L, Cappiello G, Syrjanen K, Favalli C. *The p53 codon 72 arg/arg homozygous women in central Italy are at increased risk for HPV infections.* **Anticancer Res.** 2006 Sep-Oct;26(5B):3745-8.
- Cote ML. *Study designs in genetic epidemiology.* **Methods Mol Biol.** 2009;520:247-57.
- Crivellari D, Aapro M, Leonard R, von Minckwitz G, Brain E, Goldhirsch A, Veronesi A, Muss H.; *Breast cancer in the elderly.* **J Clin Oncol.** 2007 May 10;25(14):1882-90
- Dai S, Mao C, Jiang L, Wang G, Cheng H. *P53 polymorphism and lung cancer susceptibility: a pooled analysis of 32 case-control studies.* **Hum Genet.** 2009 Apr 9.
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, et al. *Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility.* **J Med Genet,** 2002. 39:225-242.
- de Moraes AB, Zanini RR, Turchiello MS, Riboldi J, Medeiros LR; *Estudo da sobrevivência de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil;* **Cad. Saúde Pública** 2006 vol.22 no.10 Rio de Janeiro Oct.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttey GA, Smith MS, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion of the CCR5 structural gene: Hemophilia Growth and Development Study Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study.* **Science** 1996 273:1856-1862.
- Devereux TR, Taylor JA, Barret JC. *Molecular mechanisms of lung cancer.* **Chest,** 1996. 109:14s-19s.

- Di Como CJ, Gaiddon C, and Prives, C. *p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells*. **Mol. Cell. Biol.**, 1999 19: 1438–1449.
- do Val Carneiro JL, Nixdorf SL, Mantovani MS, da Silva do Amaral Herrera AC, Aoki MN, Amarante MK, Fabris BA, Pelegrinelli Fungaro MH, Ehara Watanabe MA. *Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2009
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. *The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential*. **Nat Genet**. 2003;33:357–365.
- Edwards B. *Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden*. **Cancer** 2002 94,2766–2792.
- Fackenthal JD, Olopade OI; *Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations*. **Nat Rev Cancer** 2007, 7(12):937–948.
- Fentiman IS; *Breast cancer in older women*; **Breast Cancer Online**. August 2002. 5(8)
- Fulton AM; *The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer*. **Curr Oncol Rep**. 2009 Mar;11(2):125-31.
- Furuichi K, Kaneko S, Wada T; *Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease*; **Clin Exp Nephrol** 2009 13:9–14
- Garicochea B, Morelle A, Andrighetti AE, Cancellà A, Bós A, Werutsky G., *Age as a prognostic factor in early breast cancer*. **Rev Saude Publica**. 2009 Apr;43(2):311-7.
- Geigl, JB *et al*. *Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging*. **Cancer Res**. 2004 64, 8550–8557.
- Govan VA, Loubser S, Saleh D, Hoffman M, Williamson AL. *No relationship observed between human p53 codon-72 genotype and HPV-associated cervical cancer in a population group with a low arginine-72 allele frequency*. **Int J Immunogenet**. 2007 Jun;34(3):213-7
- Hagen AI, Tretli S, Maehle L, Apold J, Veda N, Moller P.; *Survival in Norwegian BRCA1 mutation carriers with breast cancer*. **Hered Cancer Clin Pract**. 2009 Apr 14;7(1):7
- Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J; *Ageing and genome maintenance: lessons from the mouse?* **Science** 2003, 299: 1355-1359.
- Haws AL, Woeber S, Gomez M, Garza N, Gomez Y, Rady P, He Q, Zhang L, Grady JJ, McCormick JB, Fisher-Hoch SP, Tying SK. *Human papillomavirus infection and P53 codon 72 genotypes in a Hispanic population at high-risk for cervical cancer*. **J Med Virol**. 2005 Oct;77(2):265-72.
- Hodgson SV, Maher ER. *Human cancer genetics*. 2 ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 1999. 336p.

- Hrstka R, Coates PJ, Vojtesek B. *Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment.* **J Cell Mol Med.** 2009 Mar;13(3):440-53.
- Instituto Nacional de Câncer. Câncer de mama. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf> (Acessado 20/04/2009)
- Issa, JP. *Aging, DNA methylation and cancer.* **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 1999 32, 31–43.
- John EM; 2007 *Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups.* **JAMA** 2007, 298(24):2869–2876.
- Jordan-Sciutto K, Murray-Fenner C, Achim C. *Response of cell cycle proteins to neurotrophic factor and chemokine stimulation in human neuroglia.* **Exp. Neurol.** 2001,167:205–214.
- Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, et al. *Genética Médica.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 297p.
- Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Brum Souza DG, Frota Comini ER, Bobroff F, Morimoto HK, Ehara Watanabe MA, Carvalho De Oliveira J, Matsuo T, Lopes J, Donadi EA. *CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis.* **Int J Mol Med.** 2007 Sep;20(3):337-44
- Karlmarm KR, Wasmuth HE, Trautwein C, Tacke F. *Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease.* **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.** 2008 Apr;2(2):233-42.
- Kietthubthew S, Sriplung H, Au W, Ishida T; *The p53 codon 72 polymorphism and risk of oral cancer in southern Thailand.* **Asian Pac J Cancer Prev.** 2003;4:209-14.
- Kirkwood TB, Austad SN; *Why do we age?* **Nature** 2000, 408: 233-238.
- Labrie F; *Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy.* **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.** 2007 Aug;3(8):584-93.
- Lane DP, Crawford LV. *T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells.* **Nature,** 1979. 278: 261-263.
- Langerød A, Bukholm IRK, Bregård A, Lønning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA, Børresen-Dale A; *The TP53 Codon 72 Polymorphism May Affect the Function of TP53 Mutations in Breast Carcinomas but not in Colorectal Carcinomas.* **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention** 2002 Vol. 11, 1684–1688.
- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. *Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins.* **Science.** 1996 Feb 16;271(5251):981-3.
- Leboute AP, De Carvalho, MW, Simoes AL. *Absence of the delatccr5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon.* **Hum Genet.** 1999 105(5):442-3.
- Lenski RE. *Evolutiuon of plague virulence.* **Nature,** 1988, 334, 473.
- Levine AJ. *P53, the cellular gatekeeper for growth and division.* **Cell,** 1997, 88: 323-331.

Lezama Asencio P; *Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación*; **Rev. Med. Vallejana** 2006 v.3 n.2 Lima

Libert F, Cochaux P, Bechman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, De La Rua C, Ferrari M. *The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe*. **Human Molecular Genetics**, 1998, 7, 399.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, Macdonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. **Cell**. 1996, 86:367-377.

Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM. *High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR*. **Science**. 1994, 25;263(5154):1762-7.

Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. **Nature**. 1998, 22;391(6665):344-5.

Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. *Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes*. **J Exp Med**. 1996 Aug 1;184(2):569-77.

Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. *Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection*. **Adv Immunol**. 2000;74:127-80.

Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A; *Elevated Expression of the CC Chemokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) in Advanced Breast Carcinoma*; **Cancer Research** 59, 4681–4687, September 15, 1999

Luker KE, Luker GD; *Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer*. **Cancer letters**, 238:30-41, 2006

Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. *Mitotic misregulation and human aging*. **Science** 287, 2486–2492, 2000.

Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real L.M, Gómez-Moutón CS, Jiménez-Baranda, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, Ruiz A, Martínez C. *CCR5 Expression Influences the Progression of Human Breast Cancer in a p53-dependent Manner*. **J Exp Med**. 2003 Nov 3;198(9):1381-9.

Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion*. **Nat. Genet** 16(1):100-03, 1997.

Martinson JJ, Hong L, Karanickolas R, Moore JP, Kostrikis LG. *Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype*. **AIDS**.14(5):483-9, 2000.

McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T. *Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele*. **Emerg Infect Dis**. 3(3):261-71, 1997.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. McPherson K, Steel CM, Dixon JM.; *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*; **BMJ**. 2000 Sep 9;321(7261):624-8.

Metcalf KA, Finch A, Poll A, Horsman D, Kim-Sing C, Scott J, Royer R, Sun P, Narod SA; *Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation*. **British Journal of Cancer**, 2009, 100, 421 – 425

- Min-min H, Ming-Rong X, Ze-yi C, Kai-xuan Y, Zhi-lin S. *Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions.* **Int J Gynecol Cancer.** 2006 Nov-Dec;16(6):2004-8
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A; *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.* **Nature,** 410:50-56, 2001.
- Murphy PM. *The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors.* **Annu. Rev. Immunol.** 12:593-633, 1994.
- Muxel SM, Borelli SD, Amarante M.K., Voltarelli J.C., Aoki M.N., Oliveira C.E.C., Watanabe M.A.E.; *Association study of CCR5 delta 32 polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian population in Northern Paraná, Brazil,* **J Clin Lab Anal.** 2008 22: 229-233.
- Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA. *C-terminus of p53 is required for G(2) arrest.* **Oncogene.** 2002. 27:2102-2107.
- Nanki T., Lipsky P.E.; *Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-protein mediated signaling pathway.* **Cell Immunol.** 2001 214: 145-154.
- National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov> (acessado no dia 24/07/07)
- Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A; *Correlation of Tissue and Plasma RANTES Levels with Disease Course in Patients with Breast or Cervical Cancer.* **Clinical Cancer Research Vol. 7,** 285–289, February 2001
- Noma C., Miyoshi Y., Taguchi T., Tamaki Y., Noguchi S.; *Association of p53 genetic polymorphism with estrogen receptor positive breast cancer risk in japanese women.* **Cancer Lett;** 2004; 23:3328-37
- O'Brien SJ, Moore JP; *The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS.* **Immunol Rev.** 2000 Oct;177:99-111.
- Panse J., Friedrichs K., Marx A., Hildebrandt H., Luetkens T., Bartels K., Horn C., Stahl T., Cao Y., Milde-Langosch K., Niendorf .A., Krouger K., Wenzel S., Leuwer R., Bokemeyer C, Hegewisch-Becker S, Atanackovic D. *Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients.* **Br J Cancer.** 2008 Sep 16;99(6):930-8.
- Panzer, U.; Schneider, A.; Steinmetz, O.M.; Wenzel, U.; Barth, P.; Reinking R.; Becker, J.U.; Harendza, S.; Zahner, G.; Fischereder, M.; Kramer, B.K.; Schlondorff, D.; Ostendorf, T.; Floege, J.; Helmchen, U.; Stahl, R.A. *The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy.* **Kidney Int.** 67(1):75-81, 2005.
- Papadakis E.D., Soultzis N., Spandidos D.A.; *Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes.* **Br J Cancer.** 2002;87:1013-8.
- Papadakis E.N., Dokianakis D.N., Spandidos D.A.; *p53 codon 72 polymorphism as risk factor in the development of breast cancer.* **Mol Cell Biol.** 2000;3:389-92.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. *Cancer burden in the year 2000: The global picture.* **Eur J Cancer.** 2001 Oct.

- Pim D, Banks L.; *p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression.* **Int J Cancer.** 2004;108:196–199.
- Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. *Immunogenetics of seasonal influenza vaccine response.* **Vaccine.** 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D35-40.
- Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. **Nat Med.** 1996 Nov;2(11):1174-8.
- Proost P., Wuyts, A., Van Damme J.; *The role of chemokines in inflammation.* **Int J Clin Lab Res.** 26(4):211-23, 1996.
- Reiche EM, Ehara Watanabe MA, Bonametti AM, Morimoto HK, Akira Morimoto A, Wiechmann SL, Matsuo T, Carvalho De Oliveira J, Vissoci Reiche F. *Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population.* **Int J Mol Med.** 2008 Nov;22(5):669-75.
- Richardson, B. *Impact of aging on DNA methylation.* **Ageing Res. Rev.** 2, 245–261 2003
- Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AE, Balkwill FR.; *A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth.* **Cancer Res.** 2003 Dec 1;63(23):8360-5.
- Saifudeen ZX, Dipp S, El-Dahr SS. *A role for p53 in terminal epithelial cell differentiation.* **J Clin Invest,** 2002. 109:1021-1030.
- Sallusto F, Lanzavecchia A.; *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression.* **Immunol Rev.** 2000 Oct;177:134-40.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. *Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses.* **Immunol Today.** 1998 Dec;19(12):568-74.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.* **J Exp Med.** 1998 Mar 16;187(6):875-83.
- Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapomeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G., Parmentier M.; *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.* **Nature** 332:722-725, 1996.
- Sansone, P., Storci G., Pandolfi S., Montanaro L., Chieco P., Bonafé M.; *The p53 codon 72 proline allele is endowed with enhanced cell-death inducing potential in cancer cells exposed to hypoxia;* **Br J Cancer.** 2007 Apr 23;96(8):1302-8.
- Sarnow P, Ho YS, Williams JM, et al. *Adenovirus El B-58KD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 KD cellular protein in transformed cells.* **Cell,** 1982. 28: 387-394.

Sasco AJ. *Breast cancer and environment*. **Horm Res** 2003; 60 Suppl 3:50.

Shih HA, Couch FJ, Nathanson KL, Blackwood MA, Rebbeck TR, Armstrong KA, Calzone K, Stopfer J, Seal S, Stratton MR, Weber BL. *BRCA1 and BRCA2 mutation frequency in women evaluated in a breast cancer risk evaluation clinic*. **J Clin Oncol** 2002 20: 994–999

Sidoti A., D'Angelo R., Rinaldi C., De Luca G., Pino F., Salpietro C., Giunta D.E., Saltalamacchia F., Amato A.; *Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population*. **Int J Immunogenet.** 2005 Jun;32(3):193-8.

Siddique M.M., Balram C., Fiszer-Maliszewska L., Aggarwal A., Tan A., Tan P., Soo K.C., Sabapathy K.; *Evidence for Selective Expression of the p53 Codon 72 polymorphs: implications in cancer development*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2005 Sep;14(9):2245-52.

Simard J, Dumont M, Moisan AM, Gaborieau V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessette P, Brousseau C, Dorval M, Godard B, Houde L, Joly Y, Lajoie MA, Leblanc G, Lepine J, Lesperance B, Vezina H, Parboosingh J, Pichette R, Provencher L, Rheume J, Sinnett D, Samson C, Simard JC, Tranchant M, Voyer P, Easton D, Tavtigian SV, Knoppers BM, Laframboise R, Bridge P, Goldgar D. *Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer*. **J Med Genet** 2007 44: 107– 121

Själänder A, Birgander R, Kivelä A, Beckman G. *p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups*. **Hum Hered.** 1995 May-Jun;45(3):144-9.

Smith, M.W.; Dean, M.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G.A.; Lomb, D.A.; Goedert, J.J.; O'Brien, T.R. *Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression*. **Science** 277:959-965, 1997.

Soulitzis N., Sourvinos G., Dokianakis D.N., Spandidos D.A.; *p53 codon 72 polymorphisms and its association with bladder cancer*. **Cancer Lett.** 2002;179:175-83.

Spagnolo P.; Renzoni E.A.; Wells A.U.; Copley S.J.; Desai S.R.; Sato H.; Grutters J.C.; Abdallah A.; Taegtmeier A.; Du Bois R.M.; Welsh K.I. *C-C Chemokine Receptor 5 Gene Variants in Relation to Lung Disease in Sarcoidosis*. **Am J Respir Crit Care Med.** Jun 23. 2005.

Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 576p.

Stephens, J.C.; Reich, D.E.; Goldstein, D.B.; Shin, H.D.; Smith, M.W.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G.A.; Allikmets, R.; Schriml, L.; Gerrard, B.; Malasky, M.; Ramos, M.D.; Morlot, S.; Tzetis, M.; Oddoux, C.; Di Giovine, F.S.; Nasioulas, G.; Chandler, D.; Aseev, M.; Hanson, M.; Kalaydjieva, L.; Glavac, D.; Gasparini, P.; Kanavakis, E.; Claustres, M.; Kambouris, M.; Ostrer, H.; Duff, G.; Baranov, V.; Sibul, H.; Metspalu, A.; Goldman, D.; Martin, N.; Duffy, D.; Schmidtke, J.; Estivill, X.; O'Brien, S.J.; Dean, M. *Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes*. **Am J Hum Genet.** 62(6):1507-15, 1998.

Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiant G, Attard M, Hiller L, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. *Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo*. **Oncogene.** 2004;23:3328–3337

Tada M., Furuuchi K., Kaneda M., Matsumoto J., Takahashi M., Hirai A., Mitsumoto Y., Iggo R.D., Moriuchi T.; *Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection on the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants*. **Carcinogenesis.** 2001;22:515-7.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1092–1100.

Thun, M. & Jemal, A. *Cancer Epidemiology* (BC Decker, Hamilton, 2006).

Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, Iwase H, Iwata H, Takahashi S, Yamashita H, Fujii Y.; *Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients*. **Breast Cancer Res**. 2007;9(3):R34

Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallila J, Ristimäki A, von Smitten K, Aittomäki K, Heikkilä P, *et al*. *Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival*. **Clin Cancer Res**. 2005;11:5098–5103.

Zimmerman, P.A.; Buckler-White, A.; Alkhatib, G.; Spalding, T.; Kubofcik, J.; Combadiere, C.; Weissman, D.; Cohen, O.; Rubbert, A.; Lam, G.; Vaccarezza, M.; Kennedy, P.E.; Kumaraswami, V.; Giorgi, J.V.; Detels, R.; Huner, J.; Chopek, M.; Berger, E.A.; Fauci, A.S.; Nutman, T.B.; Murphy, P.M. *Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5; Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk*. **Mol. Med** 3:23-36, 1997.

Vaday G.G., Peehl D.M., Kadam P.A., Lawrence D.M.; *Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer*; **Prostate**. 2006 Feb 1;66(2):124-34.

van Deventer H.W., O'Connor W. Jr, Brickey W.J., Aris R.M., Ting J.P.Y., Serody J.S.; *C-C Chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis*. **Cancer Res**. 2006 65: 3374-3379.

Vannini I, Zoli W, Tesei A, Rosetti M, Sansone P, Storci G, Passardi A, Massa I, Ricci M, Gusolfino D, Fabbri F, Ulivi P, Briigliadori G, Amadori D, Bonafe M., *Role of p53 codon 72 arginine allele in cell survival in vitro and in the clinical outcome of patients with advanced breast cancer*. **Tumour Biol**. 2008;29(3):145-51. Epub 2008 Jul 9.

Vieira JO, da Silva ID, Higo PE, Nogueira-de-Souza NC, Gebrim LH., *Study of p53 codon 72 polymorphism in patients with breast cancer*. **Eur J Gynaecol Oncol**. 2008;29(4):364-7.

Vousden K.H., Lu X.; *Live or let die: the cell's response to p53*. **Nat Rev Cancer**. 2002 Aug;2(8):594-604.

Wang, F.S.; Hong, W.G.; Cao, Y.; Liu, M.X.; Jin, L.; Hu, L.P.; Wang, Z.; Feng, T.J.; Hou, J.; Zhang, B.; Shi, M.; Xu, D.P.; Lei, Z.Y.; Wang, B.; Liu, Z.D.; Ye, J.J.; Peng, L.; Qiu, Y.; Winkler, C. *Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups*. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 32(2):124-30, 2003.

Wang J.M., Deng X., Gong W., Su S.; *Chemokines and their role in tumor growth and metastasis*. **J Immunol Methods**, 220:1-17, 1998.

Wegman PP, Marcus NJ, Malakkaran BP, Wingren S., *Biological significance of allele specific loss of the p53 gene in breast carcinomas*. **Breast Cancer Res Treat**. 2008 Oct 14.

Weinert T. *DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair.* **Cell**, 1998. 94: 555-558.

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. *p53 polymorphisms: cancer implications.* **Nat Rev Cancer**. 2009 Feb;9(2):95-107
World Health Organization, <http://www.who.int> (Acessado dia 28/08/2007)

Xiong Y.; *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.* **Nature**. 1993;366:701-4.

Xu Y, Yao L, Zhao A, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Lu Y, Xie Y. *Effect of p53 codon 72 genotype on breast cancer survival depends on p53 gene status.* **Int J Cancer**. 2008 Jun 15;122(12):2761-6.

Yamaguchi M.D., Sugano K., Fukayama N., Nakashima Y., Saotome K., Yokoayama T., Yokota T., Ohkura H.; *Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms,* **Am J Gastroenterol**, 92:307-12 . 1997

Zhang Y, Yao F, Yao X, Yi C, Tan C, Wei L, Sun S.; *Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44+/CD24- phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression;* **Oncol Rep**. 2009 Apr;21(4):1113-21.

Zlotnik A.; *Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis.* **Contrib Microbiol**. 2006;13:191-9.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**. 2000 Feb;12(2):121-7.

Zuniga, J.A.; Villarreal-Garza, C.; Quiroz-Morales, V.; Flores, E.; Vargas-Alarcón, G.; Granados, J.; Reyes-Terán, G. *Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in diseased and healthy Mexican individuals.* **Clin Exp Rheumatol**. 21(3):351-4, 2003.

**CCR5 AND P53 CODON 72 GENE POLYMORPHISMS:
IMPLICATIONS IN BREAST CANCER DEVELOPMENT**

Mateus Nóbrega Aoki, Maria Angelica Ehara Watanabe

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the CCR5 gene and p53 codon 72 polymorphisms in a Brazilian population with breast cancer compared with healthy control subjects and to associate the clinical stage with these genotypes. No differences were detected for the D32 allele between breast cancer patients and the normal healthy donors ($p=0.270$), although this allele was more often present in blood donors. For p53 genotype analysis, breast cancer patients presented a significant ($p<0.05$) over-representation of p53 Arg homozygosity (55.5%) compared with the healthy control group (33.3%). Although no statistical difference occurred, a very strong tendency in breast cancer patients in stage III ($p=0.0503$) presenting homozygous genotype for Arg was verified. Five breast cancer patients were D32 deletion carriers and two patients presenting metastasis showed homozygous genotype for Arg. It is possible that p53 Arg homozygosity is associated with breast cancer and may represent a potential risk factor for breast tumorigenesis. In the present work, a higher percentage of breast cancer patients presented homozygous genotype for Arg and wild type for CCR5 than the control subjects.

Keywords: CCR5, p53, breast cancer

INTRODUCTION

Mammalian cells that sustain oncogenic insults can invoke defensive programs that either arrest cell division or trigger apoptosis, but these countermeasures must be finely tuned to discriminate between physiological and potentially harmful growth promoting states (1).

It is known that p53 effectively limits the proliferation of damaged cells and thus protects against malignancy. Specific stress signals result in posttranslational modifications of p53 and this induces activation of distinct transcriptional programs and outcomes in the cell. p53 activation can effectively inhibit cellular proliferation by inducing cell cycle arrest, apoptosis or senescence. In addition, a variety of negative and positive feedback loops are activated that communicate with signal transduction pathways, modulating the p53 response. Thus, a network of pathways converges upon p53 to tightly regulate its activity (2).

Several studies have reported epidemiological differences in the prevalence or prognostic significance of p53 mutants with arginine or proline at codon 72 polymorphism in certain cancer types, but the biological significance of these variants remains unclear.

Mutations in the p53 gene are considered to represent the most common genetic alterations in human cancers (3). Several reports have focused on p53 polymorphisms as risk factors for malignant disease. A polymorphic site at codon 72 in exon 4 encodes either an arginine amino acid (Arg) or a proline (Pro) residue (4).

Analysis of data from Siddique et al. (5) showed that selective pressure occurs against the expression of the codon 72 p53 Arg allele in the healthy Asian germ line arg/pro heterozygotes and provides insights into the uniqueness of population-based expression of the p53 tumor suppressor gene. It also showed a strong correlation between the expression of the p53 arg allele and susceptibility to breast cancer development.

It is known that chemokines are implicated in tumor pathogenesis, although it is unclear whether they affect human cancer progression positively or negatively. These findings suggest that CC chemokine receptor 5 (CCR5) activity influences human breast cancer progression in a p53-dependent manner. CCR5 may also have an indirect effect on cancer progression by controlling the antitumor immune response. Results obtained by Mañes et al (6) suggest a negative correlation between CCR5 expression and the growth of human breast tumors expressing wild-type p53.

CCR5 participates in chemotaxis of memory and activated naive T cells and is required for T cell activation (7). Physiologically, chemokine receptors mediate the chemotaxis of T cells and phagocytes to areas of inflammation. The CCR5 gene product is a member of the seven transmembrane G-protein-coupled receptor family, which responds to normal beta-chemokine ligands, and is involved in the chemotaxis of leukocytes toward inflammation sites. Martinson et al. (8) characterized a mutant allele of the beta-chemokine receptor gene CCR5 bearing a 32-bp deletion in the region corresponding to the second extracellular loop of CCR5 (denoted as delta CCR5 or CCR5D32), which prevents cell invasion by the primary transmitting strain of HIV-1. CCR5 is present only in certain cell types, specifically, lymphocytes, dendritic cells and macrophages. The CCR5D32 variant results in a nonfunctional form of the chemokine receptor that is incapable of binding beta chemokines (RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta). CCR5D32 causes significant defects in the chemotaxis mediated by these ligands and has been implicated in a variety of immune-mediated diseases (9,10,11).

In the present study, CCR5 and p53 codon 72 genotype of peripheral blood cells from breast cancer patients and healthy control samples were investigated using a PCR based assay.

METHODS

Study population:

The protocol was approved by the institutional Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil. The individuals were invited to participate, informed in detail regarding the research and voluntary written consent term was obtained from all of the patients enrolled. In this work, 5mL of peripheral blood was collected with ethylenediaminetetraacetic (EDTA) from 72 breast cancer patients who were attended at the Cancer Institute of Londrina (Instituto de Câncer de Londrina, ICL) and 90 healthy women subjects provided by the Clinical Analyses Laboratory of the State University of Maringá, Paraná, Brazil. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria. The tumor-node-metastasis (TNM) system was initially developed by Pierre Denoix in 1942 and represented an attempt to classify cancer based on the major morphological attributes of malignant tumors that were thought to influence disease prognosis: size of the primary tumor (T), presence and extent of regional lymph node involvement (N) and presence of distant metastases (M).

DNA extraction:

Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the Kirby (12) technique. DNA was extracted from whole blood in the presence of 0.2 M of NaCl and 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS), for 4 h at 37°C. After precipitation with absolute ethanol, the pellet was dried and resuspended in 50µL of milli-Q water.

DNA amplification of p53 codon 72 by polymerase chain reaction:

DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers, described in previously studies (13, 14) for p53 codon 72 polymorphism, following the GenBank Accession: AY838896. Arg sense 5' TCC CCC TTG CCG TCC CAA 3' and Arg antisense 5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC 3'; Pro sense 5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC 3' and Pro antisense 5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT 3' which amplified amplicons of 136 bp and 178 bp, respectively. Reaction conditions for the two PCR were the same: 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM

MgCl₂, 200 μM dNTP, 1.25 units of Taq polymerase and 50 ng of genomic DNA. All amplification was performed with appropriate negative controls in parallel to detect contamination. PCR procedure for the arginine amplification was 3 min for initial denaturation at 94°C, 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C and 5 min elongation at 72°C, realized in a thermocycler (PCR Sprint, ThermoHybaid, Ashford Middlesex, UK). For proline PCR, the same protocol was used, with exception of the annealing temperature, which was 57°C.

All the DNA samples were amplified twice, with arginine and proline primers. PCR products were analyzed by electrophoresis on acrylamide gel (10%) and detected by a nonradioisotopic technique using a commercially available silver staining method.

DNA Amplification of CCR5 by PCR

DNA was amplified by PCR using specific primers for CCR5: CCR5.1 (sense, 5' -ACC AGA TCT CAA AAA GAA- 3') and CCR5.2 (antisense, 5'-CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA- 3') (GenBank accession number: AF009962). Samples were amplified using the kit buffer plus 1.5 mmol/L Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA). PCR conditions were denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, and 10 min elongation at 72°C in a thermocycler (PCR-Sprint Hybaid, Guelph, Ontario, Canada). All assays included a positive control for 225-bp and 193-bp ladder controls and a commercially available 100-bp ladder (Invitrogen Life Technologies). PCR products of 225 and 193 bp were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel and visualized using UV fluorescence after staining with ethidium bromide. A negative control amplification containing no DNA was included in each experimental reaction and no PCR product was detected in this reaction.

Cloning and Sequencing.

The PCR products were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). After purification, PCR[®]4-TOPO[®] Vector plasmid (Carlsbad, California, USA)

was used for linked reaction and transformation into *Escherichia coli* DH5 α , in accordance with the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was obtained using the GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA).

The specificity of the PCR products from CCR5 was analyzed by direct sequencing. DNA was sequenced using the DYEnamicTM ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc) in a MegaBaceTM sequencer (Amersham Pharmacia Biotech Inc). Sequence analysis of p53 products was performed and compared with data in the NCBI-NIH database (Blastn), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

Statistical analyses

Genotype data were analyzed by the chi-square (χ^2) test with the level of significance set at $p < 0.05$. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using a chi-square goodness of fit test. Demographic characteristics were evaluated by the t test, Microcal OriginTM 4.1 (Northampton, MA).

RESULTS

In the present study, 72 patients aged 20 to 89 years-old presenting breast cancer, diagnosed at the ICL, Paraná, Brazil, were investigated. Diagnosis of the disease was based on clinical criteria and histopathological analysis, as described in Material and Methods. All patients presented ductal carcinoma and diagnosis of the disease was based on clinical criteria, in accordance with the Union of International Control of Cancer (UICC, 2002). Patient mean age was 56.47 ± 10.03 years-old and 36.08 ± 13.18 years-old for the 90 healthy individuals.

Women aged 40 years or over were formed the greater part of the breast cancer individuals (* χ^2 age of breast cancer patients: 13.889 3 degrees of freedom $p=0.0031$).

Table I shows age and ethnic distribution for all clinical stages. A larger number of patients included in this work presented stages II and III, while the number of patients who presented stages I and IV was relatively small.

Table1. Demographic characteristics of patients and healthy blood donors.

	Control (90)	Breast Cancer* (72)			
		Stage I (10)	Stage II (30)	Stage III (29)	Stage IV (3)
Age* (years)					
20-39	59 (65.55%)	-	1 (1.38%)	4 (5.55%)	-
40-49	19 (21.11%)	2 (2.77%)	9 (12.5%)	7 (9.72%)	1 (1.38%)
50-59	10 (11.11%)	4 (5.55%)	8 (11.11%)	9 (12.5%)	1 (1.38%)
>60	2 (2.22%)	4 (5.55%)	12 (16.66%)	9 (12.5%)	1 (1.38%)
Ethnic group					
White	81 (90%)	10 (13.88%)	29 (40.27%)	25 (34.72%)	3 (4.16%)
Black	2 (2.22%)	-	1 (1.38%)	4 (5.55%)	0
Pardo	5 (5.55%)	0	0	0	0
Not informed	2 (2.22%)	0	0	0	0

* χ^2 in age of breast cancer patients: 22,667 5 degree of freedom $p=0,0004$

To analyze the CCR5 genotype in human breast cancer, the allelic frequency and genotypes of Delta 32 polymorphism was determined in 72 patients presenting breast cancer (Figures 1 and 2, Table II). None of the patients presented D32/D32, though 5 presented heterozygotes for D32/Wt. The allelic frequency of D32 in the cohort was 3.47%. No differences were detected in allelic frequencies between breast cancer patients and the normal healthy donors ($P= 0.270$) after Yates' correction.

For the CCR5 genotype, the population examined showed no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.

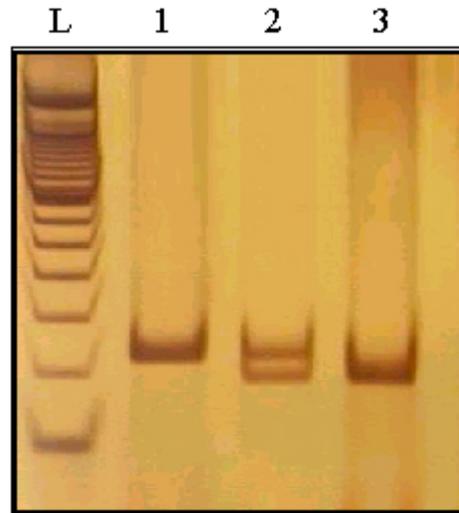


Figure 1. . CCR5 genotyping. PCR products were submitted to electrophoresis in 10% acrilamide gel. Wild-type homozygous genotype (CCR5/CCR5) yield 225 bp and heterozygous genotype 225 bp and 193 bp products, while D3/D32 alleles yielded a 193 bp product. L – ladder;

Table II. Genotype distribution in patients and controls

	Number of samples	Genotype ^ξ		
		CCR5/CCR5	CCR5/D32	D32/ D32
Breast Cancer patients	72 *	67 (93,05%)	5 (6,95%)	-
Healthy control subjects	90 **	77 (85,56%)	12 (13,33%)	1 (1,11%)

* χ^2 in HWE = 0,093 2 degree of freedom p>0.05

** χ^2 in HWE = 0,448 2 degree of freedom p>0.05

ξ: Breast cancer patients x healthy subjects; $\chi^2 = 2,6009$, p=0,270 (2 degree of freedom, p < 0,05)

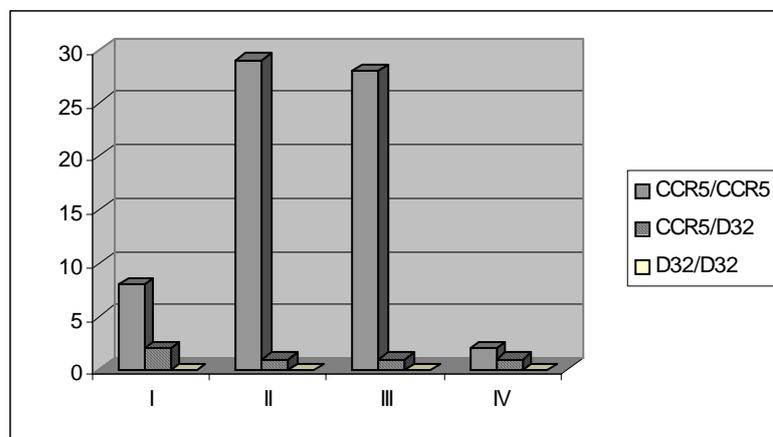


Fig2: Distribution of genotype for CCR5 polymorphism in the clinical stage.

A possible association between p53 arginine/proline codon 72 polymorphism and susceptibility to breast cancer was also investigated in this study. To detect the p53 codon 72 polymorphism, two primer sets in separate tubes were used, one to amplify the Arg allele and the other to amplify the Pro allele, which amplified 136 bp and 178 bp, respectively (Figure 3).

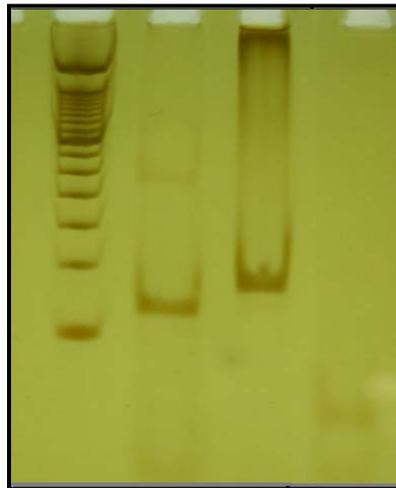


Figure3. **Electrophoretic profile for Arg and Pro genotype for codon 72.** PCR amplification of the p53 codon 72 Arg allele (136bp) and Pro allele (178bp). The result of amplification for Arg homozygote (lane1), Pro homozygote (lane 2) genotypes are indicate. L is 100bp Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, USA) and Bl indicate Blank reaction or negative control.

The mutational status of the p53 gene in peripheral blood samples from breast cancer and blood healthy donors was evaluated. The homozygous genotype Arg/Arg was significantly increased in breast cancer patients compared with blood healthy donors (Table III). In this work, breast cancer blood samples presented a significant genotype for p53 Arg homozygosity (55.5%, 40/72) compared to control group homozygosity (33.3%, 30/90). A significant difference between breast cancer patients and controls was obtained for codon 72 polymorphism ($p < 0.05$). Homozygous genotype for Pro was 7.8% and 4.2% for normal individuals and patients, respectively.

Table III. Genotype distribution in patients and controls

	Number of samples	Genotype		
		Arg/Arg ^ξ	Arg/Pro	Pro/Pro
Breast Cancer patients *	72	40 (55,5%)	29 (40,3%)	3 (4,2%)
Healthy control subjects **	90	30 (33,3%)	53 (58,9%)	7 (7,8%)

* χ^2 in HWE = 0,644 2 degree of freedom $p > 0,05$

** χ^2 in HWE = 6,087 2 degree of freedom $p > 0,05$

ξ : Breast cancer patients x healthy subjects; $\chi^2 = 8,153$, $p = 0,0170$ (2 degree of freedom, $p < 0,05$)

Another clinical aspect investigated in this work was the relation between disease stage and Arg and Pro genotypes. Although no significant difference was observed among the groups, an increase in the homozygous genotype for Arg in clinical stage III was observed ($p = 0,0503$), a very strong tendency, in comparison with the other stages (Figure 4).

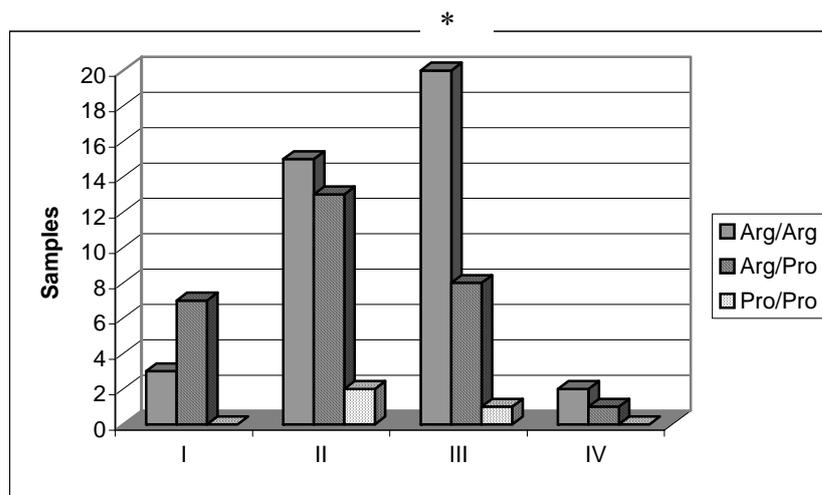


Figure 4. Distribution of genotype for p53 codon 72 polymorphism in the clinical stage.

* Breast cancer patients with homozygous genotype for Arg in the stage III ($p = 0,0503$).

To analyze primer specificity, three randomly chosen samples were sequenced and compared with data in the NCBI-NIH database. The analysis demonstrated that the amplified fragment was compatible with a sequence in the GenBank register sequences, under accession AF009962 for CCR5 and AY838896 for p53 gene.

In Tables IV and V, the genotype distribution for p53 and CCR5 polymorphism in the control subjects and breast cancer patients is shown. In breast cancer patients, homozygous genotype for Arg and wild type for CCR5 was higher (52.7%) than in control subjects (30.0%).

Table IV: Genotype distribution of p53 and CCR5 for breast cancer patients

		p53		
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
CCR5	CCR5/CCR5	38 (52,7%)	26 (36,1%)	3 (4,2%)
	CCR5/D32	2 (2,8%)	3 (4,2%)	-
	D32/D32	-	-	-

Table V: Genotype distribution of p53 and CCR5 for healthy control subjects

		p53		
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
CCR5	CCR5/CCR5	27 (30%)	44 (48,9%)	6 (6,7%)
	CCR5/D32	3 (3,3%)	8 (8,9%)	1 (1,1%)
	D32/D32	-	1 (1,1%)	-

In this study, only five breast cancer patients presented heterozygous genotype for CCR5, three patients presented heterozygous genotype Arg/Pro without metastasis and two patients presented homozygous genotype for Arg and progression to bone metastasis.

DISCUSSION

The Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (15) classifies the Brazilian population into five categories: white, black, brown (*pardo*), yellow and Indigenous, based on skin color. White (49.9% of the population) usually describes a Brazilian of full or predominantly European ancestry or other ancestry, such as Arab Brazilian; Brown (*pardo*; 43.2%), usually describes a Brazilian of brown skin color and mixed race; Black (6.3%) usually describes a dark-skinned Brazilian of Black African ancestry; and yellow (0.5%) usually describes a Brazilian of East

Asian descent, mostly Japanese. Although genetic studies reveal a high degree of racial admixture in all ethnic groups in Brazil, the majority population of this study was White (90%).

Ageing is associated with the inability to maintain and repair somatic cells (16). It has been proposed that age-associated tissue dysfunction is caused by the accumulation of molecular and cellular damage (17). In this study, the age range in breast cancer patients and healthy women was 25-76 years. Women aged over 40 years were formed the greater part of the breast cancer population.

It is known that chemokines are important determinants of early inflammatory response. Further studies are required for a clearer understanding of Caucasian gene mixing in the Brazilian population, its relation to immunological molecules and to establish how these polymorphisms could influence susceptibility or resistance to certain diseases (18). The interpopulational differences in delta 32bp deletion of CCR5 (D32) and HLA haplotype frequency provide evidence regarding the distribution of numerous immunological molecules that could develop different responses in the host.

Analysis of data obtained in a primary breast cancer clinical series showed that disease-free survival was shorter in individuals presenting the CCR5D32 allele than in CCR5 wild-type patients, but only for those whose tumors expressing wild-type p53. These findings suggest that CCR5 activity influences human breast cancer progression in a p53-dependent manner (6).

This study investigated the CCR5 gene in a Brazilian breast cancer population and compared the findings with healthy control subjects. In this work, the examination of 72 breast cancer patients for CCR5D32 deletion showed that 93.05% (67/72) presented homozygotes for the wild allele, 6.94% (5/72) carried the D32 allele in the heterozygous state and none presented homozygotes for the variant allele. Despite the small number of samples for D32 allele, analysis of the present results suggests that the D32 allele might not be associated with susceptibility to breast cancer.

It is known that p53 is a classic tumour suppressor that is mutated in the majority of human cancers. p53 functions by arresting cellular proliferation in response to a variety of cellular stresses, including DNA damage, hypoxia and activated oncogenes. It has been postulated that the frequencies

of p53 codon-72 genotypes vary according to ethnic group; however, in this work 90% of the patients were from the Caucasian ethnic group.

Analysis of the data from Siddique et al. (5) suggests that the expression of different p53 polymorphisms is selectively regulated in different ethnic populations and that the ARG allele is activated during cancer development in Asians. Thus, the expression status of the p53 polymorphs, rather than the genotypic status, might be a useful indicator for cancer susceptibility.

It has been verified that breast cancer lesions present a significant over-representation of p53 Arg homozygosity (62%) compared to p53 Pro homozygosity (21%) (19).

A subset of molecular alterations have been associated with the development of the disease. p53 is polymorphic at amino acid 72 of the protein that it encodes, thus p53 may contain either a proline or an arginine residue at this position. In the reading frame used, G or C at the nucleotide residue 347 resulted in an arginine (CGC) or proline codon (CCC) for the amino acid residue (4).

The current study examined whether p53 Arg at polymorphic position 72 could represent a risk factor for patients with malignant breast lesions in comparison with a normal control group. A significant difference occurred between breast cancer patients and controls for codon 72 polymorphism ($p < 0.05$).

Although no significant difference was observed when analyzing the different clinical stages, an increase in the homozygous genotype for Arg was verified for clinical stage III ($p = 0.0503$) when compared with other stages.

It is possible that the differences between reports reflect the populations under analysis, as inherent differences occur in the relative prevalence of the polymorphic alleles in various populations. Although biochemically different, the significance of p53 codon 72 polymorphism remains controversial in terms of cancer epidemiology. A significant association between codon 72 polymorphism and the risk of cancer had been reported, although the results with regard to most cancer diseases, including breast cancer, remain inconclusive (20, 19).

Pezeshki et al. (21) demonstrated that the frequency of the Arg allele was significantly higher in sun-exposed patients compared to controls, suggesting that Arg allele at codon 72 of the p53 gene might affect the risk of UV-induced basal cell carcinoma.

Siddique et al (5) verified that Asians were found to preferentially express the Pro allele, whereas Caucasians preferentially express the Arg allele; however, about 75% of heterozygote Chinese breast cancer patients preferentially expressed the Arg allele.

Diminished functional CCR5 can accelerate tumor growth when p53 remains normal, probably due to diminished p21, which acts as a Cdk inhibitor. In studies involving breast cancer patients that provided analyses between tumor classification and CCR5, significant differences were observed between stage IV and CCR5D32, although a low frequency of stage IV patients was observed. Regarding disease-free survival, patients that present CCR5D32 show a significantly lower survival period (6).

It is known that chemokines possess the potential to stimulate T-cell activation, although the pattern of activation may differ for different chemokine–chemokine receptor interactions (22). CCR5 plays an important role in the recruitment of macrophages, monocytes and T cells at inflammation sites (23), driving an immune response involving a Th1 cytokine pattern (24). CCR5D32 deletion may alter the expression or function of the protein product (25).

Van Deventer et al. (26) showed that mice expressing CCR5 present enhanced local tumor growth and an impaired response to vaccine therapy compared to CCR5 knockout mice. The authors showed that CCR5 expression in stromal cells, but not hematopoietic cells, contributed to tumor metastasis.

The study verified five breast cancer patients who presented delta32 deletion and two patients who presented metastasis also presented homozygous genotype for Arg; the number of breast cancer patients presenting homozygous genotype for Arg and wild type for CCR5 was higher (52.7%) than among control subjects (30.0%).

Understanding cellular and molecular mechanisms of tumor metastasis is critically important for the development of new approaches to cancer treatment. Given the size of the present casuistic, strong conclusions are not possible; however, future works involving much larger casuistics may determine potential clinical implications for Arg and CCR5D32 alleles in relation to breast cancer pathogenesis.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Coordenadoria de Pós-Graduação, Londrina State University, PPG-UEL. Mateus Nóbrega Aoki received a fellowship from CAPES, Brazil. The entire article was revised by a British-born scientific text editor.

REFERENCES

- 1 C.J. Sherr, Divorcing ARF and p53: an unsettled case, *Nature Reviews- Cancer*, 6: 663-673, 2006.
- 2 S.L. Harris, A.J. Levine, The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene* 24: 2899–2908, 2005.
- 3 K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer* 2: 594–604, 2002.
- 4 G.J. Matlashewski, S. Tuck, D. Pim, P. Lamb, J. Schneider, L.V. Crawford, Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53, *Mol. Cell. Biol.* 7: 961–963, 1987.
- 5 M.M. Siddique, C. Balram, L. Fiszer-Maliszewska, A. Aggarwal, A. Tan, P. Tan, K.C. Soo, K. Sabapathy, Evidence for Selective Expression of the p53 Codon 72 Polymorphs: Implications in Cancer Development, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2245–2252, 2005.
- 6 S. Mañes, E. Mira, R. Colomer, S. Montero, L.M. Real, C. Gómez-Moutón, S. Jiménez-Baranda, A. Garzón, R.A. Lacalle, K. Harshman, A. Ruíz, C. Martinez, CCR5 Expression Influences the Progression of Human Breast Cancer in a p53-dependent Manner, *J. Exp. Med.* 198: 1381–1389, 2003.

- 7 D. Taub, S. Turcovski, M. Key, D. Longo, W. Murphy, Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation *in vitro*, *J. Immunol.* 156: 2095–2103, 1996.
- 8 J.J. Martinson, N.H. Chapman, D.C. Rees, Y.T. Liu, J.B. Clegg, Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion, *Nat. Genet.* 16: 100-103, 1997.
- 9 X. Yang, T. Ahmad, F. Gogus, Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease, *Eur. J. Immunogenet.* 31: 11-14, 2004.
- 10 K.B. Oliveira, E.M.V. Reiche, H.K. Morimoto, M.H.P. Fungaro, D. Estevão, R. Pontello, T.F. Nasser, M.A.E. Watanabe, Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis, *J. Cutan. Pathol.* 34: 27–32, 2007.
- 11 D.R. Kaimen-Maciel, E.V. Reiche, D.G.B. Souza, E.R.F. Comini, F. Bobroff,; H.K. Morimoto, M.A.E. Watanabe, J.C. Oliveira, T. Matsuo, J. Lopes, E.A. Donadi, CCR5-Δ32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis, *Int. J. Mol. Med.* 20: 337-344, 2007.
- 12 L.T. Kirby, DNA fingerprinting: an introduction, New York: Stocton. Press, 1990.
- 13 E.D. Papadakis, N. Soultzis, D.A. Spandidos, Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes, *Br. J. Cancer.* 87: 1013-1018, 2002..
- 14 J.M. Lima; P.V.P. Serafim; I.D.C.G. Silva; N.M. Forones, Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer, *Arq. Gastroenterol.* 43: 8-13, 2006.
- 15 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE . Síntese de Indicadores Sociais, 2006.
- 16 T.B. Kirkwood, S.N. Austad, Why do we age?, *Nature* 408: 233–238, 2000.
- 17 P. Hasty, J. Campisi, J. Hoeijmakers, H. van Steeg, J. Vijg, Ageing and genome maintenance: lessons from the mouse?, *Science* 299: 1355–1359, 2003.
- 18 S.M. Muxel, S.D. Borelli, M.K. Amarante, J.C. Voltarelli, M.N. Aoki, C.E.C. Oliveira, M.A.E. Watanabe, Association study of CCR5 delta 32 polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian population in Northern Paraná, Brazil, *J. Clin. Lab. Anal.* 22: 229-233, 2008.
- 19 E.N. Papadakis, D.N. Dokianakis, D.A Spandidos, p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer, *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.*, 3: 389–392, 2000.
- 20 A. Weston, J.H. Godbold, Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis, *Environ. Health. Perspect.* 105 919–926, 1997.
- 21 A. Pezeshki, F. Sari-Aslani, A.Ghaderi, M. Doroudchi, p53 codon 72 polymorphism in basal cell carcinoma of the skin. *Pathol Oncol Res.* 12: 29-33, 2006.
- 22 T. Nanki, P.E. Lipsky, Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-protein mediated signaling pathway, *Cell Immunol.* 214: 145-154, 2001.

- 23 U. Panzer, A. Schneider, O.M. Steinmetz, et al, The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy, *Kidney Int.* 67: 75-81, 2005.
- 24 P. Loetscher, M. Ugucioni, L. Bordoli, et al, CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature* 391-344, 1998.
- 25 A. Sidoti, R. D'Angelo, C. Rinaldi, et al, Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population, *Int. J. Immunogenet.* 32: 193-198, 2005.
- 26 H.W. van Deventer, W. O'Connor Jr. W.J. Brickey, R.M. Aris, J.P.Y. Ting, J.S. Serody, C-C Chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis, *Cancer Res.* 65: 3374-3379, 2005.

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](#)