

FLÁVIA LUDIMILA KAVALEC

**PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE DE FIBROBLASTOS COM MUTAÇÃO NO GENE
TP53 DE PACIENTE COM SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bonald Cavalcante de
Figueiredo

CURITIBA
2006

**Aos meus pais,
João e Olga,
com eterno amor.**

AGRADECIMENTOS

Em certos momentos, a realização de um mestrado na Universidade Federal do Paraná parecia um sonho distante... obrigada Pai e Mãe por não me deixarem desistir;

Em certos momentos, o objetivo de dar continuidade os estudos em Oncologia parecia se desviar... obrigada Dra. Mara Pianovski por me apresentar ao meu orientador e não me deixar me contentar com pouco;

Em certos momentos, a dedicação e o cansaço do estudo diário pareciam mais fortes do que a alegria que estava por chegar...obrigada Angelita Visentin, Grazielle Vendramin, Juliana Sardi, Cláudia Empinotti e Guilherme Andrade por me ajudarem a celebrar a conquista de cada pequena vitória;

Em certos momentos, a rotina me deixava com semblante pesado e distante.... obrigada colegas da Central de Misturas Intravenosas do Hospital Erasto Gaertner por me apoiarem e me ajudarem a trabalhar com mais ânimo e garra.

Em certos momentos, as tarefas mais simples na rotina de um laboratório de pesquisa se mostravam difíceis e penosas... obrigada colegas do Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças a fazerem desses dois anos de trabalho uma convivência harmoniosa e produtiva;

Em certos momentos, as dúvidas e os medos pareciam tomar conta de todo o meu ser... obrigada doutoranda Giovanna Assis Rodrigues por ser meu “anjo da guarda”, que mesmo distante, nunca deixou de demonstrar confiança, estimular e de ser uma verdadeira professora;

Em certos momentos, a angústia do trabalho pesado e solitário me fazia repensar sobre o meu papel como mestrande... obrigada Prof^a. Almeriane Santos por me atender em momentos de tristeza, me escutar e me dar esperança; obrigada Prof. Bonald Cavalcante de Figueiredo por tornar realidade o que parecia impossível,

Em todos os momentos, pude experimentar o amor de um Deus tão grande por um ser tão pequeno e limitado como eu... para sempre hei de proclamar que Jesus é o meu único Senhor e Salvador, digno de todo louvor e adoração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 OBJETIVO GERAL.....	03
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 BASES CLÍNICAS E MOLECULARES DA SÍNDROME DE LI- FRAUMENI.....	04
3.2 A PROTEÍNA p53 E SUA REGULAÇÃO.....	06
3.2.1 O p53 e o ciclo celular.....	10
3.2.2 O p53 e a apoptose.....	12
3.2.3 Métodos de detecção de apoptose.....	16
3.3 AS MUTAÇÕES NO GENE <i>TP53</i>	18
3.3.1 Significado clínico e prognóstico para as mutações do gene <i>TP53</i>	24
3.3.2 Polimorfismos.....	25
3.4 PARTICIPAÇÃO DE OUTROS GENES NA SÍNDROME DE LI- FRAUMENI.....	28
3.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO.....	29
3.6 CULTURA CELULAR.....	33
3.6.1 Características gerais.....	33
3.6.2 Cultura celular e estudo com lesão ao DNA.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CASUÍSTICA.....	39
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	39
4.3 SEQÜENCIAMENTO DO <i>P53</i>	40
4.4 CULTURA CELULAR.....	40
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	41
4.6 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE <i>IN SITU</i>	43

4.7 CONTAGEM DE CÉLULAS.....	44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 HEREDOGRAMA E HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA.....	47
5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>TP53</i>	48
5.2.1 Probanda.....	48
5.2.2 Familiares da probanda.....	48
5.3 ESTUDO <i>IN VITRO</i> COM CULTURAS DE FIBROBLASTOS.....	50
5.3.1 Proliferação celular em resposta ao teste da radiação.....	50
5.3.2 Morte celular em resposta ao teste da radiação.....	50
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	84
APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO DA PROBANDA.....	84
APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARENTES.....	86
APÊNDICE 3: TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	88
APÊNDICE 4: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA DOADORA SADIA.....	90
APÊNDICE 5: TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA DOADORA SADIA.....	92
ANEXO	94
ANEXO 1: CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP.....	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A proteína p53.....	06
FIGURA 2: A proteína p53 e seus domínios.....	07
FIGURA 3: O gene <i>P53</i> e suas interações.....	08
FIGURA 4: Resposta do p53 à lesão celular.....	11
FIGURA 5: Vias de ativação da morte celular.....	13
FIGURA 6: Princípio do teste de Proliferação Celular.....	42
FIGURA 7: Princípio do Teste de TUNEL.....	43
FIGURA 8: Padrão de células positivas e negativas para o teste de proliferação....	45
FIGURA 9: Padrão de células positivas e negativas para o teste de TUNEL.....	45
FIGURA 10: Heredograma.....	48
FIGURA 11: A proteína p53 e a localização da mutação.....	49
FIGURA 12: A proteína p53 truncada.....	49
FIGURA 13: Proliferação de fibroblastos não irradiados e irradiados.....	51
FIGURA 14: Proporções de células (média ± DP) que proliferaram.....	52
FIGURA 15: Apoptose em fibroblastos não irradiados e irradiados.....	53
FIGURA 16: Proporções de células (média ± DP) que sofreram apoptose.....	54
FIGURA 17: Mecanismos propostos para redução da proliferação e apoptose em fibroblastos heterozigóticos para <i>TP53</i>	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Respostas e mecanismos propostos em células heterozigotas para mutação no P53 radiadas <i>in vitro</i>	59
TABELA 2: Os diferentes achados em relação ao papel do polimorfismo 72Arg ou 72Pro.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Bax</i>	- gene <i>Bax</i>
<i>BRCA1</i>	- gene <i>BRCA1</i>
<i>BRCA2</i>	- gene <i>BRCA2</i>
BrdU	- 5-bromo-2'-deoxiuridina
CEGEMPAC	- Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
Cdk	- ciclina dependente de quinase
<i>CHEK2</i>	- gene <i>CHEK2</i>
CO ₂	- dióxido de carbono
DNA	- ácido deoxinucleico
dUTP	- Trifosfato de deoxiuridina
<i>EROS</i>	- espécies de oxigênio reativas
<i>FITC</i>	- tiocianato de fluoresceína
Gy	- gray
<i>Ho342</i>	- Hoechst 33342
JNK	- c-Jun N-terminal quinase
<i>MDM2</i>	- gene <i>MDM2</i>
<i>Noxa</i>	- gene <i>Noxa</i>
PBS	- Tampão fosfato salina
<i>P21</i>	- gene <i>P21</i>
p21	- proteína <i>P21</i>
<i>p53AIP1</i>	- gene <i>p53AIP1</i>
p53	- proteína <i>P53</i>
<i>P53</i>	- gene <i>P53</i>
PI	- iodeto de propídio
<i>PIG3</i>	- gene <i>PIG3</i>
<i>PUMA</i>	- gene <i>PUMA</i>
Rb	- gene <i>Rb</i>
SDS-PAGE	- poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SLF	- Síndrome de Li-Fraumeni
<i>Tp53</i>	- Gene p53 tumoral
TUNEL	- terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
UV	- ultra-violeta

RESUMO

Introdução - A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma rara síndrome familiar de câncer herdada dominante caracterizada por um grande espectro de neoplasias acometendo crianças e adultos jovens. A identificação de mutações germinativas no *P53* em raras SLF causou um número de estudos *in vitro* usando cultura de células cancerosas e fibroblastos não tumorais apresentando a mutação *TP53* herdada. Muitos estudos reportaram as mutações germinativas em famílias com SLF em várias partes do mundo. **Objetivos** - No presente estudo, a documentação detalhada de um heredograma de uma família com SLF permitiu uma análise completa da relação genótipo-fenótipo e um entendimento dos tumores que são associados com mutações germinativas no *TP53*. Além disso, os objetivos do presente estudo foram (1) definir a seqüência total do DNA e *P53* para a possibilidade de combinação de uma ou mais mutações ou polimorfismos capazes de aumentar o risco de câncer em uma paciente (probanda) com cinco cânceres, e (2) testar a função do p53 na cultura de fibroblastos da probanda expostos à radiação gama (5 Gy), avaliando a indução de parada do ciclo celular e a apoptose. **Material e métodos** - O DNA foi seqüenciado utilizando um seqüenciador automático. Os métodos usados para estudar a taxa de proliferação de fibroblastos foram baseados na incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) durante a replicação do DNA seguido do reconhecimento de BrdU pela fluoresceína (FITC) conjugada com um anticorpo monoclonal. A morte celular foi analisada usando o protocolo TUNEL (quebras de fita de DNA marcadas com dUTP-FITC). **Resultados** - A proteína p53 demonstrou mediar a parada em G1 seguida do dano ao DNA. De acordo com o heredograma, a probanda é a única membra viva carregando a mutação germinativa no *P53*. A análise do sequenciamento revelou uma mutação germinativa *nonsense* no códon 146 (TGG→TGA, stop códon). Dentre os 5 polimorfismos no gene *P53*, um é particularmente interessante, o Arg72Pro. No entanto, os experimentos em andamento ainda tentam definir se esta 72Pro está localizada no *P53* selvagem e se tal proteína demonstra alguma função diminuída. Em qualquer caso, os fibroblastos heterozigotos da probanda não foram tão eficientes como os fibroblastos de uma voluntária (sem SLF) em causar parada no ciclo celular e morte celular 6 horas após o dano ao DNA com radiação gama. A extensão da parada em G1 foi extremamente reduzida em fibroblastos de SLF comparadas com os normais ($p < 0,05$). Um impacto menos pronunciado foi observado na diferença na indução de morte celular, no entanto foi estatisticamente menor em fibroblastos da probanda depois da irradiação ($p < 0,05$). **Conclusão** - A conclusão do presente estudo *in vitro* indica uma reduzida capacidade para a função do p53 em fibroblastos, que pode contribuir significativamente para a predisposição ao câncer nesta síndrome familiar.

Palavras-chaves: Síndrome de Li-Fraumeni, *TP53*, fibroblastos, proliferação celular, apoptose.

ABSTRACT

Introduction - The Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a rare familial dominantly inherited cancer syndrome characterized by a wide spectrum of neoplasms occurring in children and young adults. The identification of germline *P53* mutations in rare LFS has given rise to a number of *in vitro* studies using cell cultures of cancer cells and non-tumoral fibroblasts presenting the inherited *TP53* mutation. Many studies have reported *TP53* germline mutations in LFS families in various parts of the world. **Objectives** - In the present study, a detailed documentation of the pedigree of a LFS family has allowed a comprehensive analysis of genotype-phenotype correlations and an understanding of the tumors that are associated with germline *TP53* mutations. In addition, the objectives of the present study were (1) to define the full p53 DNA sequence for the possibility of combination of one or more mutations or polymorphisms capable of increasing the risk of cancer in a patient (proband) who had five types of cancer; and (2) test p53 functions in the proband's cultured fibroblasts exposed to gamma irradiation (5 Gy), evaluating induction of cell cycle arrest and apoptosis. **Material and methods** - DNA was sequenced using an automatic sequencer. The methods used to study rate of fibroblasts proliferation was based in the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) during DNA replication followed by recognition of BrdU by an fluorescein (FITC) conjugated monoclonal antibody. Cell death was analyzed using the TUNEL protocol (DNA strand breaks labeled by dUTP-FITC). **Results** - The p53 protein has been shown to mediate G1 arrest following DNA damage. According to the pedigree, the proband is the only alive member carrying a germline p53 mutation. Sequencing analysis has revealed a nonsense germline mutation in codon 146 (TGG→TGA, stop codon). Among the 5 polymorphisms in the *P53* gene, one is particularly intriguing, the Arg72Pro. However, ongoing experiments are still trying to define whether this 72Pro is located in the wild-type *P53* and if such protein displays any diminished function. In any case, the heterozygous fibroblasts from the proband were not as efficient as the fibroblasts of a volunteer (without LFS) in causing cell arrest and cell death 6 hours after DNA damage with gamma irradiation. The extent of G1 arrest was greatly reduced in LFS fibroblasts compared with normals ($p < 0,05$). A less striking impact was observed for the difference in cell death induction, although it was statistically lower in fibroblasts from the proband after irradiation ($p < 0,05$). **Conclusion** - The conclusion from the present *in vitro* studies indicate a reduced capacity for p53 function in fibroblasts, which may contribute significantly to cancer predisposition in this familial syndrome.

Key-words: fibroblast, Li-Fraumeni syndrome, *TP53*, cell proliferation, apoptosis

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, conhece-se uma variedade de tipos de tumores, diferenciados pela etiologia, história natural e formas de tratamento. Apesar da grande evolução do conhecimento na área da oncologia, tal progresso não refletiu de maneira proporcional o desenvolvimento de técnicas eficazes de prevenção, diagnóstico, tratamento e cura do câncer.

A etiologia do câncer é multifatorial, envolvendo vírus, exposição a agentes ambientais, estilo de vida e alterações genéticas. Essas mutações, que levam ao desenvolvimento do câncer, afetam os genes responsáveis pela proliferação e desenvolvimento celulares, além de outras funções essenciais para as células (FEARON,VOGELSTEIN, 1990). Quando a regulação normal é alterada, um crescimento desordenado se inicia e sobrevém um tumor maligno.

O conceito de câncer como doença genética é relativamente recente. Tornou-se evidente que todos os tipos de câncer, mesmo na ausência de qualquer componente hereditário aparente, resultam de mutações em células somáticas e que sua progressão também envolve, de um lado, a expressão de uma série de genes e, de outro, a supressão da expressão de outros (TURNBULL,HODGSON, 2005).

Estudos epidemiológicos levaram à definição de uma síndrome de câncer com uma variedade de formas de câncer, como sarcomas, tumores cerebrais, de mama e outras, com início precoce e com padrão de transmissão autossômico dominante. Este grupo de características ficou conhecido como Síndrome de Li-Fraumeni (LI,FRAUMENI, 1969).

A Síndrome de Li-Fraumeni Clássica se caracteriza pela ocorrência de sarcoma em um indivíduo antes dos 45 anos de idade; um parente de primeiro grau com qualquer câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade e outro parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma em qualquer idade (LI et al., 1988).

Já as famílias que não preenchem exatamente os critérios da Síndrome de Li-Fraumeni são denominadas de Li-Fraumeni símile, definida como um sujeito com qualquer tumor na infância, ou um sarcoma, tumor cerebral ou tumor adrenocortical antes dos 45 anos de idade, mais um parente de primeiro ou segundo grau com um

dos tumores típicos da Síndrome de Li-Fraumeni em qualquer idade e, além disso, um parente de primeiro ou segundo grau com câncer antes dos 60 anos de idade (BIRCH et al., 1994).

A maior parte dessas famílias apresenta uma mutação germinativa no gene *TP53* (MALKIN et al., 1990). Este gene de supressão tumoral (*P53*) é responsável pela parada no ciclo celular, ou apoptose no caso de um dano irreparável do DNA. As alterações somáticas neste gene também são bastante comuns em tumores humanos, como por exemplo câncer de pulmão e bexiga (SLEE et al., 2004).

Diversos testes laboratoriais estão disponíveis para a análise do gene *TP53* e suas mutações. No entanto, como em diversas desordens genéticas, muito pouco se pode oferecer aos portadores e familiares, em se tratando de tratamento e prevenção de novos tumores, isto devido à raridade desta Síndrome, complexidade do fenótipo e escassez de estudos básicos e clínicos.

Buscando contribuir para os avanços das pesquisas na Síndrome de Li-Fraumeni Clássica, no presente estudo serão discutidas as principais características do gene *P53*, suas funções e as mutações germinativas relacionadas com a Síndrome de Li-Fraumeni, assim como o comportamento proliferativo e de morte programada de fibroblastos *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Relatar um caso de Síndrome de Li-Fraumeni Clássica, avaliando respostas de fibroblastos à radiação *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar um caso de Síndrome de Li-Fraumeni Clássica a partir da história familiar e heredograma;
- 2) Identificar polimorfismos e/ou mutações no gene *TP53*;
- 3) Em caso de mutação no *TP53*, verificar se existe uma resposta atenuada da proteína p53 em fibroblastos da probanda antes e após a exposição à radiação, avaliando quantitativamente a proliferação e a apoptose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BASES CLÍNICAS E MOLECULARES DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

A Síndrome de Li-Fraumeni foi relatada inicialmente em 1969 a partir de uma revisão retrospectiva epidemiológica com mais de 600 pacientes pediátricos portadores de sarcomas. Um exame mais detalhado do histórico de quatro famílias permitiu que F.P. Li e J.F. Fraumeni notassem uma alta incidência de câncer de mama ocorrendo em algumas mães antes da menopausa. Também foi observada em parentes a ocorrência de outros tumores com início precoce, como sarcomas e leucemias. A partir disso, F.P. Li e J.F. Fraumeni propuseram que o desenvolvimento de câncer nessas famílias estava associado a uma predisposição hereditária (LI,FRAUMENI, 1969).

Estudos posteriores consagraram a nomenclatura desta rara síndrome familiar de câncer como Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), caracterizada por um amplo espectro de neoplasias ocorrendo em crianças e adultos jovens. É transmitida de forma autossômica dominante, o que predispõe aos indivíduos afetados o surgimento de múltiplas neoplasias com início precoce e afetando diversos membros da mesma família (LI et al., 1988).

Diferente de outras síndromes predominantemente caracterizadas por locais específicos de câncer, como por exemplo, o câncer de mama e o colorretal, a SLF apresenta-se com uma variedade de tipos de tumores. Os mais comuns são: sarcomas de partes moles, osteossarcoma, câncer de mama, tumores cerebrais, leucemia e carcinomas adreno-corticais (LI,FRAUMENI, 1969; LI et al., 1988).

A Síndrome de Li-Fraumeni Clássica é definida como um probando¹ que apresenta um sarcoma antes dos 45 anos de idade com um parente de primeiro grau apresentando qualquer tipo de câncer antes de 45 anos e, ainda, um outro membro da família de primeiro ou segundo grau, com qualquer câncer antes dos 45 anos ou um sarcoma em qualquer idade (LI et al., 1988).

Famílias que não preenchem todos os critérios são enquadradas como Síndrome de Li-Fraumeni-símile (SLF-símile). Segundo Birch e colegas (1994), os

¹ Probando: denominação empregada para todo indivíduo que se submete a um teste genético.

critérios para a Li-Fraumeni-símile são: um probando com qualquer câncer infantil ou sarcoma, ou um tumor adrenocortical diagnosticado antes dos 45 anos de idade, um parente de primeiro ou segundo grau com um típico câncer de SLF (sarcoma, câncer de mama, tumor cerebral, tumor adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade e um parente, de primeiro ou segundo grau, com qualquer câncer antes dos 60 anos. De acordo com Eeles (1995) os critérios para a Li-Fraumeni-símile incluem: dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumores relacionados à SLF em qualquer idade.

Mulheres adultas com a SLF apresentam um risco maior de câncer que os homens devido à alta frequência de câncer de mama nessa população (LUSTBADER et al., 1992; CHOMPRET, 2002). Estima-se que 25% das mulheres com idade inferior a 30 anos com a SLF sejam diagnosticadas com câncer de mama, sendo que este número se eleva para 89% na população abaixo de 50 anos (LI et al., 1988; MALKIN et al., 1990). Os mecanismos moleculares que explicam esta alta incidência de câncer de mama comparado com outros tumores presentes nas famílias com a SLF ainda não são conhecidos (HERBERT et al., 2001).

A descrição da SLF mudou de parâmetros clínicos e familiares para critérios moleculares depois da publicação dos estudos de Malkin e seus colaboradores (1990) e Srivastava e seus colaboradores (1990) que descreveram o envolvimento de mutações germinativas do *TP53*. Na maior parte dos casos, a SLF resulta de mutação envolvendo um alelo do *P53*, seguida da perda somática do outro alelo, sendo este o primeiro evento para o desenvolvimento do câncer (MALKIN et al., 1990; SRIVASTAVA et al., 1990; SANTIBANEZ-KOREF et al., 1991; VARLEY;MCGOWN et al., 1997).

Aproximadamente 70% dos casos de Síndrome de Li-Fraumeni Clássica contêm mutações germinativas no gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13.1 (SIDDIQUI et al., 2005), 22% dos pacientes com SLF-símile segundo Birch (BIRCH et al., 1994) e 8% dos pacientes com SLF-símile segundo Eeles (EELES, 1995). A observação de que o *TP53* não apresenta mutação em todos os pacientes, tanto da Síndrome de Li-Fraumeni Clássica como a Síndrome de Li-Fraumeni-símile, sugere que mutações germinativas em outros genes na via do *TP53* podem conferir o mesmo fenótipo de câncer (SIDDIQUI et al., 2005).

Já foram relatados, em alguns casos raros, mutações em outros genes que podem desencadear a SLF, como por exemplo, no gene *CHEK2* presente no cromossomo 22q11 (LEE et al., 2001), responsável pela ativação e modulação do *TP53* (VAHTERISTO et al., 2001) e, mais recentemente um gene desconhecido no cromossomo 1q23 (BACHINSKI et al., 2005).

Muitos destes ensaios de genética molecular estão disponíveis para uso clínico, servindo para a confirmação do diagnóstico, definição de prognóstico, avaliação de predisposição familiar (ENG et al., 2001) e para diagnóstico pré-natal e pré-implantação (KANAVAKIS, TRAEGER-SYNODINOS, 2002). Uma variedade de painéis de análise da seqüência do *TP53*, cobrindo diversos subgrupos de regiões codificadoras e não-codificadoras do gene, é oferecida para o estudo clínico básico.

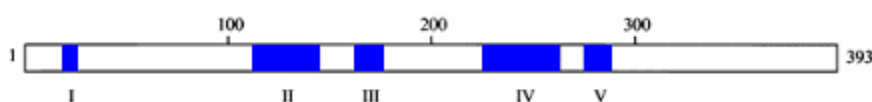
Na literatura são relatados diversos estudos sobre o comportamento celular *in vitro*, avaliando as linhagens celulares de diversas patologias, oncológicas ou não, englobando o modo como essas células reagem a determinados estímulos, lesões ou drogas. Acredita-se que este tipo de estudo com culturas de células de indivíduos portadores da SLF contribua de modo singular para o avanço no conhecimento do papel da mutação do *TP53* na carcinogênese desta doença hereditária.

3.2 A PROTEÍNA p53 E SUA REGULAÇÃO

A fosfoproteína nuclear p53 foi identificada em 1979 como uma proteína que se complexava com oncogenes virais, como o adenovírus E1 B e o papilomavirus E6 (LEVINE, 1990). Desde então diversos estudos descreveram a função do p53 como regulador dos pontos de verificação do ciclo celular (KASTAN et al., 1991; LIN et al., 1992; MERCER, 1992) e da apoptose (FISHER, 2001; HICKMAN et al., 2002; VOUSDEN, 2002), sendo por isso designado de “guardião do genoma” (LANE, 1992).

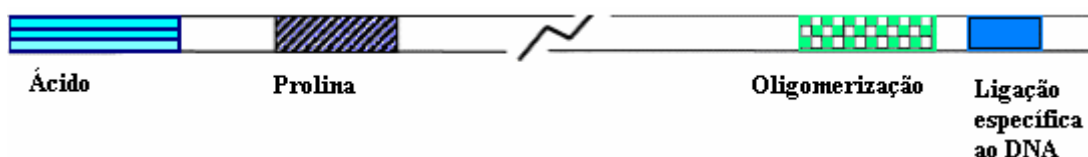
A proteína p53 contém 393 aminoácidos com cinco domínios conservados ao longo da evolução (Figura 1):

FIGURA 1: A proteína p53



O supressor tumoral p53 realiza seu papel como um fator de transcrição (RYAN et al., 2001), induzindo a expressão de vários genes de regulação negativa em resposta a fatores de estresse genotóxico (EL-DEIRY, 1998). Testes realizados com a tecnologia de microarranjo e bioinformática identificaram mais de 4800 genes contendo regiões regulatórias responsivas ao p53 (WANG et al., 2001).

FIGURA 2: A proteína p53 e seus domínios



Como esquematizado na Figura 2, a porção N-terminal do p53 contém um domínio ácido (aminoácidos 1-42) que interage com outros componentes da maquinaria transcricional, sendo necessário para a regulação da transcrição do p53 (SETO et al., 1992; THUT et al., 1995). Além desse domínio, há a região rica em prolina (aminoácidos 64-92), necessária para a apoptose (SAKAMURO et al., 1997) (VENOT et al., 1998) e está relacionada com a regulação negativa do p53 (MULLER-TIEMANN et al., 1998; PRIVES, HALL, 1999).

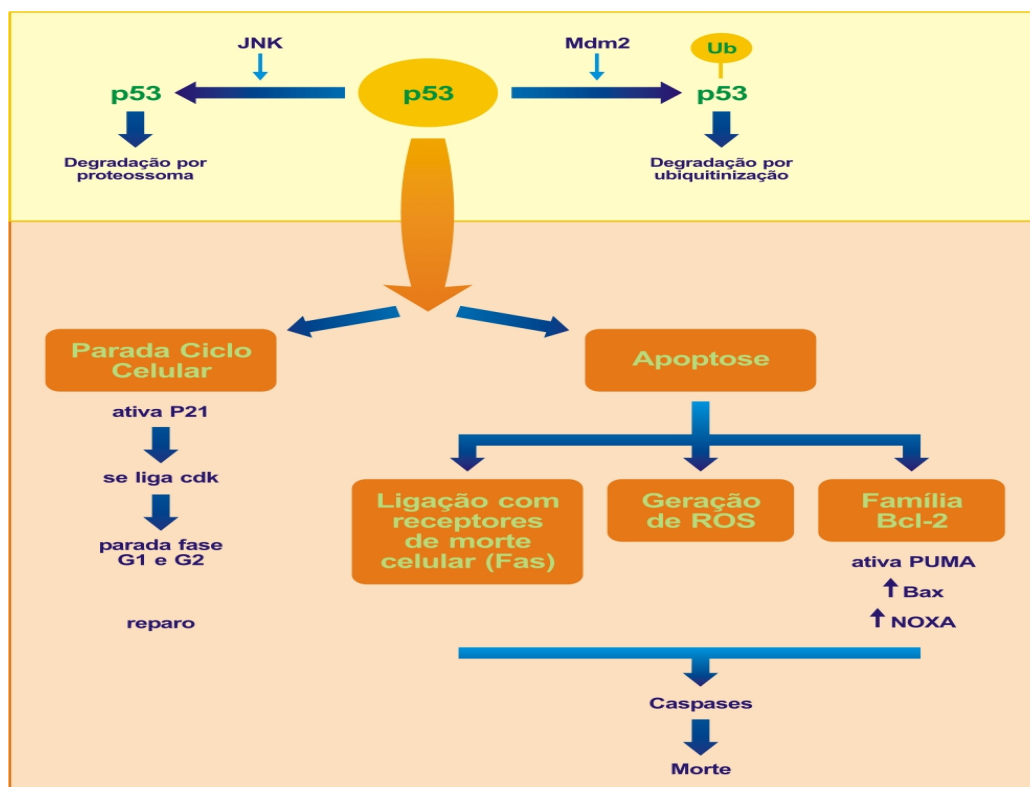
O domínio central (aminoácidos 102-292) é necessário para a ligação específica com o DNA e reconhece pelo menos duas repetições de sequência de DNA (EL-DEIRY et al., 1992; LEVINE, 1997). O domínio de oligomerização (324-355) participa na formação de tetrâmeros de p53 (dímeros de dímeros), já que esta forma é a que faz a ligação com o DNA de uma forma seqüência-específica (FRIEDMAN et al., 1993; WANG et al., 1993).

A porção C-terminal (aminoácidos 311-393) contém uma seqüência de localização terminal com capacidade de ligar-se tanto ao DNA, como ao RNA ou, ainda com uma fita simples de ácido nucléico (WU et al., 1997); (CADWELL, ZAMBETTI, 1998). O significado dessas interações ainda não é totalmente compreendido, mas acredita-se que colaborem para detectar diretamente o dano ao DNA. A porção C terminal age também como um domínio regulatório negativo, talvez com a participação dos domínios central e o de prolinas, para manter o p53 numa forma inativa até que as reações de fosforilação e acetilação modifiquem a proteína (CADWELL, ZAMBETTI, 2001).

Também são encontrados um sinal principal de localização nuclear e dois secundários na região do domínio de tetramerização, respectivamente nas posições dos aminoácidos 316-324, 369-375 e 379-385 e, na última parte do domínio (aminoácidos 340-351), está o sinal único de exportação nuclear (SHAULSKY et al., 1990).

A proteína p53 humana pode ser detectada em muitas atividades proliferativas de células saudáveis, mas é praticamente indetectável em células na fase de descanso, ou G0, do ciclo celular. Possui um tempo de meia-vida curto (em torno de 10-20 minutos) (GRONOSTAJSKI et al., 1984), mas diante de um estado estressante, como radiação ionizante ou ultravioleta, drogas que lesam o DNA ou hipóxia, ocorre a estabilização e o acúmulo de proteínas p53 recém sintetizadas. O p53 ativado rapidamente é transportado para o núcleo, funcionando como um fator de transcrição específico de seqüência de DNA (EL-DEIRY et al., 1992; FUNK et al., 1992). A partir daí, há a indução de vários genes envolvidos na parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (YU et al., 1999; ZHAO et al., 2000), conforme esquematizado na Figura 3.

FIGURA 3: O gene *P53* e suas interações



Reproduzido e adaptado de PLUQUET e HAINAUT, 2001, com permissão.

Inicialmente acreditava-se que o dano ao DNA era o único sinal de ativação da proteína p53. Outros estudos demonstraram que sinais não genotóxicos, como processos fisiológicos (como hipóxia, anóxia e hipertermia) e agentes farmacológicos (como agentes anti-microtúbulos como os taxanos), poderiam ativar o p53 (PLUQUET, HAINAUT, 2001).

Um dos responsáveis pela estabilização da proteína p53 é o protooncogene Mdm2 (SHIEH et al., 1997), o qual atua tanto como um alvo transcricional como um supressor da função do p53, formando como uma alça autoreguladora negativa de *feedback* (MOMAND et al., 1992; WU et al., 1993).

O Mdm2 se liga com o terminal amina (N) do p53 (nos resíduos 17-22) e, conseqüentemente, bloqueia sua interação com a maquinaria transcricional da célula (KUSSIE et al., 1996). Além disso, faz a mediação da exportação nuclear do p53 e direciona a sua destruição via proteólise mediada por ubiquitinação (HONDA et al., 1997; FREEDMAN, LEVINE, 1998).

O gene *MDM2* está amplificado em fração significativa nos mais comuns sarcomas humanos e, conseqüentemente, a super expressão do *MDM2* ocorre para interferir com a atividade do p53 (OLINER et al., 1992).

Shieh e colaboradores (1997) demonstraram que, uma vez ocorrido o dano ao DNA, o p53 é fosforilado na serina 15 e este evento faz com que o p53 reduza a sua interação com o Mdm2, seu regulador negativo. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação das serinas 15 e 37 por uma proteína quinase dependente de DNA impede a habilidade do Mdm2 em inibir a transativação dependente de p53. Estes efeitos são mais comuns através da mudança conformacional induzida pela fosforilação do p53.

Os mesmos autores propuseram o seguinte mecanismo para o envolvimento do p53 na lesão do DNA: sob condições normais de estresse, o p53 associa-se com seus inibidores e a transativação dependente de p53 é reprimida. Se houver um dano ao DNA, o p53 é fosforilado na serina 15, a qual induz uma mudança conformacional que torna o Mdm2 incapaz de se ligar ao p53, resultando na inibição do efeito do Mdm2 sobre o p53.

Além do Mdm2, a proteína c-Jun N-terminal quinase (JNK) é responsável pela estabilidade constitutiva do p53, participando de duas maneiras no controle de sua ativação. Quando a JNK está inativa, ela se liga nos resíduos 97-116 do p53,

conduzindo à degradação realizada por proteossoma. Mas, quando a JNK é ativada por sinais como ultra-violeta, raios X e estresse oxidativo, ocorre o bloqueio da ligação JNK-p53 por um peptídeo, culminando na ativação do p53 com alta afinidade por seu alvo: o DNA (FUCHS et al., 1998).

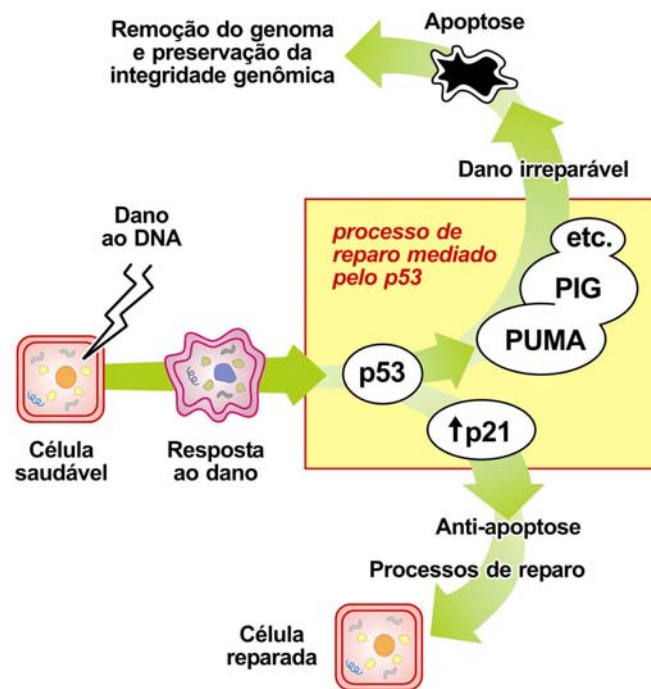
A conversão do p53 da forma latente para ativa, capaz de se ligar à seqüência específica do DNA e a transativação, é ainda pouco entendida. Um modelo da forma latente seria através da interação do C-terminal com o domínio central da proteína, desta forma fechando o tetrâmero numa conformação que não se liga ao DNA. Modificações pós-translacionais ou a interação de outras proteínas com o p53 promoveriam a ativação. Outros fatores de ativação seriam a fosforilação, glicosilação, acetilação, interação proteína-proteína, truncação C e N-terminal, ligação com o DNA e *splicing* alternativos (HANSEN et al., 1998; LUO et al., 2004).

3.2.1 O p53 e o ciclo celular

A ativação do p53 quase sempre resulta na parada do ciclo celular, presumidamente para que o DNA seja reparado antes da replicação ou da mitose. Foi demonstrado que a inibição da progressão do ciclo celular pelo p53 é, em grande parte, devido a sua habilidade de ativar genes transcricionais que diretamente controlam a atividade de quinases dependentes de ciclina (EL-DEIRY, 1998).

Um desses mecanismos pelo qual o p53 controla negativamente o ciclo celular é através da ativação transcricional do *P21* (WAF1, Cip-1) (PRIVES, HALL, 1999). O produto da expressão do *P21* é a proteína p21 que, em células normais, se liga a vários complexos ciclinas dependentes de quinases (cdk), prevenindo a fosforilação (inativação) do Rb e tendo, como consequência, a parada das células na fase G1 e G2 (AMUNDSON et al., 1998).

FIGURA 4: Resposta do p53 à lesão celular



NOTA: a partir de um dano ao DNA, a via do p53 é ativada, podendo ocorrer a apoptose (com ativação de genes como o *PUMA* e o *FIG3*) e a morte celular, ou podendo ocorrer a via antiapoptótica (com ativação do *P21*) e reparo celular.

Reproduzido e adaptado de Weiss, 2003, com permissão.

Conforme demonstrado na Figura 4, a via do p53 é ativada a partir de um dano ao DNA, cabendo a decisão de ativação de genes apoptóticos, como *PUMA* e *FIG3*, que culminarão com a morte celular; ou a decisão pela via antiapoptótica, através da ativação transcricional do p21. Assim, este aumento do p21 permite a sobrevivência da célula até a finalização do processo de reparo do DNA.

Além de funcionar como um supressor negativo do p53, o p21 participa como um inibidor da ciclina quinase G1 (XIONG et al., 1993), na diferenciação celular (SHERR,ROBERTS, 1999) e na progressão da fase G1 para a fase S do ciclo proliferativo em alguns tipos celulares, podendo ser reconhecida como uma proteína anti-apoptótica e promotora do crescimento (WEISS, 2003).

3.2.2 O p53 e a apoptose

Numerosos fatores afetam a decisão da célula em realizar a parada do ciclo celular ou induzir a apoptose, ambos mediados pelo p53. Danos causados por estresse não genotóxicos (como a hipóxia) induziriam um acúmulo moderado de p53, com ativação preferencial de genes envolvidos no ciclo celular (GRAEBER et al., 1994; KOUMENIS et al., 2001). Em contraste, a opção pela apoptose prevalece diante de danos severos ao DNA, quando há limitações dos fatores de sobrevivência ou quando um oncogene é ativado (LEVINE, 1997; SIONOV,HAUPT, 1999).

Essas duas respostas têm, fundamentalmente, o mesmo objetivo de manutenção da integridade genética: enquanto as células gravemente danificadas são extintas, as células sujeitas a estresse não genotóxico são removidas do grupo de células que entrarão em replicação do DNA (PLUQUET,HAINAUT, 2001).

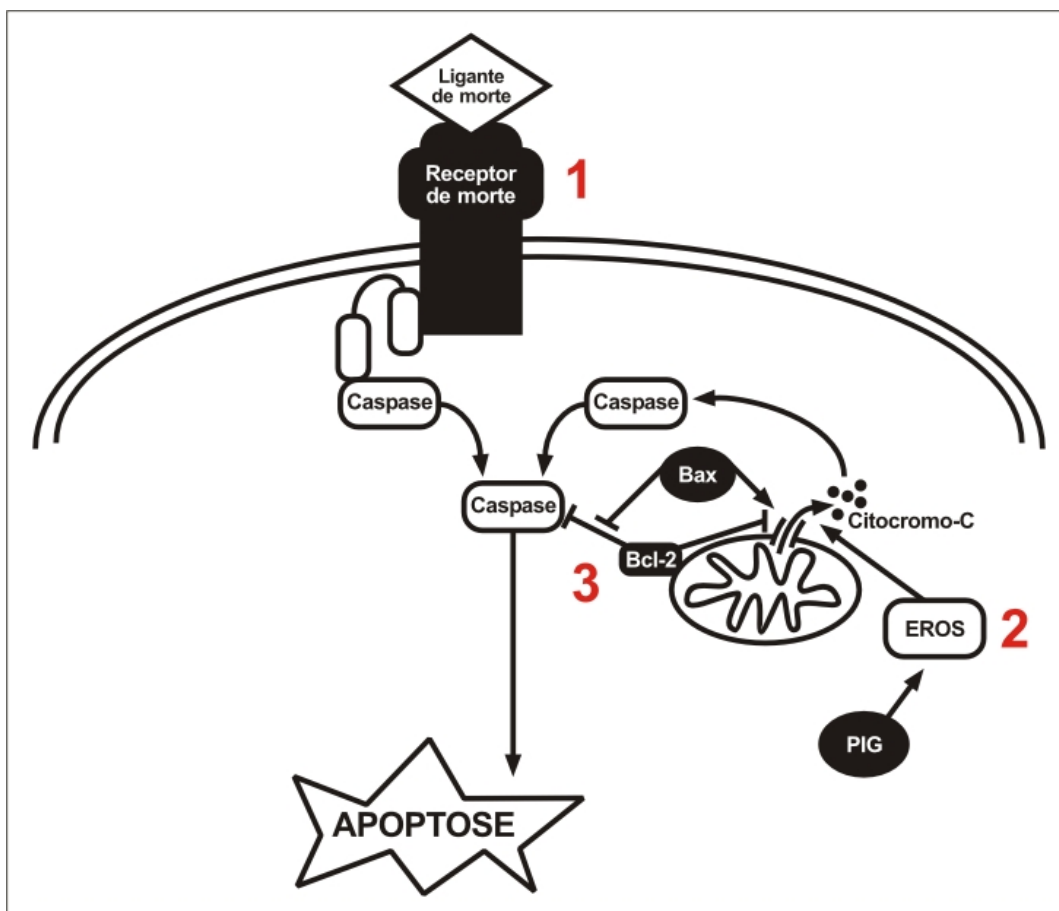
Apoptose, ou morte celular programada, é a ablação controlada das células durante o desenvolvimento normal. Difere da necrose tanto pelas mudanças bioquímicas quanto pelas alterações morfológicas que sofrem. Em contraste com a necrose, que é um processo passivo e descontrolado, afetando grandes campos celulares, as células apoptóticas sofrem alterações caracterizadas morfológicamente pela compactação da cromatina nuclear, contração do citoplasma e produção de corpúsculos apoptóticos nos limites da membrana (SARASTE,PULKKI, 2000) que são, então, rapidamente fagocitados por células vizinhas, incluindo macrófagos e células parenquimatosas (KERR et al., 1994).

Bioquimicamente, a apoptose é diferenciada pela fragmentação do genoma e degradação de diversas proteínas celulares sem desencadear resposta inflamatória *in vivo* (FAIRBAIRN et al., 1996). Estima-se que a duração de uma apoptose *in vivo* seja entre 6 e 24 horas, dependendo do tipo celular (GAVRIELI et al., 1992).

A função do p53 na apoptose é essencial para o seu papel como agente supressor tumoral e previne o acúmulo de mutações que poderiam levar ao desenvolvimento de células cancerígenas (PIETENPOL et al., 1994; CHAO et al., 2000). Esta afirmação é fortemente sustentada pelo fato de que mutações no *TP53* estão presentes nas alterações genéticas mais comuns, presentes em tumores humanos, e, também, no estudo com camundongos com genes *P53* nocauteados que desenvolvem múltiplos tumores ainda muito jovens (DONEHOWER et al., 1992).

Embora os mecanismos de morte celular programada não sejam completamente entendidos, são propostas três vias, conforme esquematizado na Figura 5.

FIGURA 5: Vias de ativação da morte celular



NOTA: 1: via de receptores de morte celular, 2: via das espécies de oxigênio reativas, 3: via da família Bcl-2.

Reproduzido e adaptado de [http: www.portfolio.mvm.ed.ac.uk](http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk). Acesso em 10/03/2005.

→A primeira via envolve os receptores de membrana:

Esta via é iniciada pela ligação do Fas (CD95), receptor presente na membrana celular, com seu ligante FasL, resultando na ativação de caspases e morte celular. A super expressão de Fas pode causar apoptose mediada pela super regulação do p53, embora sem mecanismos conhecidos. Outros exemplos de membros de ligantes indutores de morte celular são o TNF e o TRAIL (OWEN-SCHAUB et al., 1995).

→A segunda via é através da formação de espécies de oxigênio reativas (EROS):

Uma rota pela qual o p53 sinalizaria a mitocôndria e induziria a apoptose seria pelo aumento dos níveis de espécies de oxigênio reativas (EROS). O p53 induziria os genes que codificam proteínas que catalisam reações óxido-redutoras e, conseqüentemente, gerariam EROS, os quais promoveriam a liberação do citocromo-C pela mitocôndria e, então, a morte celular (LOTTEM et al., 1996; SIONOV,HAUPT, 1999).

Um desses genes induzidos pelo p53 que desencadeia a geração de EROS e a apoptose é a prolina oxidase ou PIG6 (DONALD et al., 2001). Interessante notar que as EROS por si só são reguladoras do p53 e possuem um papel importante na regulação da mitocôndria durante a destruição dos componentes celulares mediados pela ativação das caspases (VOGELSTEIN et al., 2000; RAHA,ROBINSON, 2001). A interrupção deste controle exercido pelas EROS está envolvida na patofisiologia do câncer (LIU et al., 2005).

→A terceira via envolve a família Bcl-2:

A família Bcl-2 contém membros tanto pró quanto anti-apoptóticos. Há, pelo menos, 16 proteínas da família Bcl-2, que são divididas em três grupos: o primeiro grupo é formado pelas proteínas anti-apoptóticas (exemplos Bcl-xl e Diva), já os grupos dois e três são membros pró-apoptóticos (exemplos: Bax e Bik) (REED, 1997).

Estas proteínas permanecem em harmonia, já que uma proteína anti-apoptótica é capaz de se heterodimerizar com sua respectiva proteína pró-apoptótica, indicando que a concentração de cada uma é importante na determinação do sinal predominante que a célula deve receber. Com isso, uma célula com maiores níveis de proteínas anti-apoptóticas exibe maior resistência a apoptose, mas se houver predomínio de proteínas Bax, por exemplo, a célula morrerá rapidamente (MIYASHITA et al., 1994).

Todas as proteínas da família Bcl-2 formam canais iônicos na membrana mitocondrial. As proteínas anti-apoptóticas formam canais pequenos e estão

usualmente fechadas, mas as pró-apoptóticas tendem a formar grandes canais nesses locais. Com o aumento de proteínas pró-apoptóticas, ocorre a formação de grandes canais, perda do potencial de membrana da mitocôndria e a liberação do conteúdo de citocromo-C ao citosol. O citocromo-C associa-se a APAF-1 e à pró-caspase 9 para formar a caspase 9 ativada. O complexo enzimático formado é chamado de apoptossoma e, uma vez formado, torna-se inevitável a morte celular (SCHENDEL et al., 1998; ANTONSSON et al., 2001; MIKHAILOV et al., 2001).

O gene *TP53* funciona como um indutor pró-apoptótico do gene *Bax* (MIYASHITA, REED, 1995), embora a expressão do *Bax* não seja necessária para a via de apoptose dependente do p53 em todas as linhagens celulares (KNUDSON et al., 1995).

Novos membros da família pró-apoptótica, como o *Noxa* e o *p53AIP1* (ODA et al., 2000), localizados na mitocôndria, também foram propostos como representantes de mediadores da apoptose induzida pelo p53.

Recente interesse de como a morte celular é desencadeada pelo p53 foi focada no *p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)* (NAKANO, VOUSDEN, 2001; YU et al., 2001). A expressão do gene *PUMA* é uma proteína mitocondrial com domínio BH3 que induz apoptose dependente de BAX, fazendo a translocação funcional do complexo BAX para a parte externa mitocondrial e também sendo responsável pela multimerização da BAX, sendo este um evento crítico na apoptose mediado pela via intrínseca (LIU et al., 2005). Outros estudos utilizando modelos de ratos sem o gene *PUMA* confirmaram que *PUMA* é necessário para a apoptose dependente de p53 (YU et al., 2001; VILLUNGER et al., 2003).

Uma das características do *PUMA* que o permite separar de outros genes alvos do p53 é que sua expressão é regulada não somente pelos elementos responsivos do p53, mas também como, por exemplo, por glicocorticóides (JEFFERS et al., 2003). Este gene possui esta denominação devido à rápida indução pelo p53 e por seu potente efeito pró-apoptótico (YU et al., 2001).

Finalizando a proposta de mecanismos da apoptose sugerida na Figura 5, encontra-se a participação das caspases, responsáveis pela quebra proteolítica de uma série de proteínas-chaves que resulta nas alterações morfológicas das células em processo de apoptose (MARTIN, GREEN, 1995).

Estas caspases participam em uma cascata que é ativada em resposta a

sinais pró-apoptóticos (THORNBERRY, LAZEBNIK, 1998). Elas são tipicamente sintetizadas como precursores inativos. Inibidores ou a ligação de cofatores ativam as caspases através da quebra de aspartatos internos através de autocatálise ou pela ação de outra protease (THORNBERRY et al., 1997).

As caspases compartilham similaridades em aminoácidos, estrutura e substratos. Até o momento, catorze caspases foram identificadas e são agrupadas, de acordo com a seqüência de homologia, em três subclasses: a subfamília da caspase 1 (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 13); a subfamília da caspase 3 (caspases 3, 6, 7, 8 e 10) e a subfamília da caspase 2 (caspases 2 e 9). Funcionalmente, algumas caspases (como as 2, 8 e 9) atuam como proteínas iniciadoras ou sinalizadoras, enquanto outras, como as 3, 6 e 7, atuam como proteínas executoras (NUNEZ et al., 1998).

Levando-se em consideração a variedade de genes envolvidos, é razoável especular que a apoptose mediada pelo p53 é a consequência da combinação da expressão de vários genes e que esta resposta é influenciada pelo tipo celular e/ou pela maneira específica de lesão celular (CADWELL, ZAMBETTI, 2001; PLUQUET, HAINAUT, 2001).

3.2.3 Métodos de detecção de apoptose

Assim como a viabilidade celular, nenhum parâmetro único define fielmente a morte celular em todos os aspectos. Neste contexto, são necessários vários testes diferentes para o estudo da apoptose.

Diversos métodos são empregados para caracterizar e diferenciar células apoptóticas, necróticas e viáveis. Baseado nas alterações morfológicas, a microscopia eletrônica pode ser usada na diferenciação de células necróticas e apoptóticas. A adição de técnicas de imagens digitalizadas quantitativas permite detectar mudanças até na densidade nuclear. A formação de corpos apoptóticos pode ser visualizada de maneira simples por microscopia ótica de contraste de fase (PAYNE, CROMEY, 1992).

O uso de microscopia confocal a laser, associado a corantes nucleares como iodeto de propídio (PI) e Hoechst 33342 (Ho342), é utilizado para técnicas qualitativas de detecção de apoptose (SMITH et al., 1991).

O evento bioquímico mais marcante da apoptose é a múltipla fragmentação do DNA, com tamanhos entre 180-200 pares de base, realizado por endonucleases atuando na região de ligação entre os nucleossomos (OLIVE, BANATH, 1995). Este fenômeno pode ser visualizado por eletroforese em gel de agarose, sendo que o emprego do brometo de etídio aumenta a sensibilidade.

Outro método para a detecção da degradação do DNA é a marcação de hidroxilas 3' do DNA com compostos radioativos, como P³²-dATP ou P³²-dCTP, seguido de eletroforese em gel de agarose e autoradiografia (FUJITA et al., 2000).

Um método mais comum e seguro de marcação das hidroxilas 3' terminais do DNA está na aplicação da técnica TUNEL, ou *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling* (KOCKX et al., 1998). Neste método, as hidroxilas 3' terminais dos fragmentos de DNA são marcadas com biotina-dUTP, mediada pela enzima terminal deoxinucleotidil transferase, seguidos de marcação com compostos fluorescentes e, por último, analisadas por citometria de fluxo ou microscopia fluorescente (GORCZYCA et al., 1993).

As vantagens na utilização deste tipo de marcação estão na habilidade de marcar quebras de DNA recentes, quantificar a porcentagem de células, se for utilizada a citometria de fluxo, e a facilidade na utilização em populações celulares heterogêneas (SGONC, GRUBER, 1998).

Outro método é a eletroforese em gel de célula única (SCG) ou “teste do cometa”, um método de microscopia fluorescente rápido e muito sensível para examinar danos ao DNA e reparo em nível individual de células (SINGH et al., 1988). Neste teste, as células são imobilizadas em uma matriz de agarose em lâmina e lisadas suavemente. Quando submetidas à eletroforese, o DNA relaxado migra para fora das células. Depois de corar o ácido nucléico, as células que têm o dano do DNA acumulado aparecem como cometas fluorescentes, com caudas da fragmentação do DNA. Em contraste, células normais ou sem danos ao DNA aparecem como pontos redondos, já que o DNA intacto não migra para fora da célula (COLLINS, 2004). A intensidade da fluorescência e o comprimento da cauda são correlacionados com o número de quebras do DNA (WADA et al., 2003).

Embora o “teste do cometa” tenha uma metodologia simples, há dificuldade em se distinguir células apoptóticas de necróticas, além de que a análise quantitativa exige um sistema de análise informatizado de imagens (TICE et al., 2000).

Para os testes quantitativos, a técnica mais empregada é a citometria de fluxo, que se baseia nas mudanças morfológicas das células, fragmentação e perda de DNA. (CARBONARI et al., 1994). A utilização de diversos corantes de forma intercalada pode ser utilizada. A combinação de corante Hoechst 33342, que se difunde em membranas celulares intactas, e a solução de iodeto de propídio, que não se difunde em membranas intactas, permite a identificação e a quantificação de células viáveis, apoptóticas e necróticas (SGONC,GRUBER, 1998).

Para a detecção de apoptose recente, a recomendação é que se utilize a Anexina V conjugada ao tiocianato de fluoresceína (FITC), que se liga preferencialmente a uma fosfatidilserina que faz a translocação para fora da membrana plasmática no momento da apoptose, combinado com iodeto de propídio. A célula que é positiva para o Anexina V e para o iodeto de propídio é uma célula necrótica, enquanto que uma célula que é somente positiva para Anexina V e negativa para iodeto de propídio é uma célula apoptótica (WADA et al., 2003).

Uma outra linha de estudo para a detecção de apoptose envolve a demonstração da ativação de caspases. Estas proteínas podem ser detectadas pela técnica de *Western Blotting* ou utilizando testes enzimáticos ou com anticorpos específicos que demonstrem a ativação das proteínas. Desta forma, pode-se determinar se a apoptose foi dependente ou não de caspases (SARASTE,PULKKI, 2000).

Estudos que se propõem a avaliar os mediadores de morte e proliferação celular em conjunto são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos medicamentos e para o esclarecimento do seu modo de ação (YAMAMOTO,NISHIOKA, 2005).

3.3 AS MUTAÇÕES NO GENE *TP53*

O estudo genético de desordens monogênicas e poligênicas vem avançando nos últimos anos, favorecendo o entendimento de doenças complexas como o câncer. Para cada gene, numerosas alterações são relatadas, de mutações de ponto até extensas deleções. O aumento do número de detecção de mutações é alcançado graças ao desenvolvimento e aplicação de diversas metodologias. Vários bancos de dados de genes e mutações são viabilizados com o intuito de

organização, confiabilidade dos dados armazenados e ferramenta para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e cuidado dos pacientes.

De acordo com recente revisão realizada por Soussi e colegas (2006), as primeiras coleções de variações e mutações de genes humanos começaram na década de 80 do século passado, como por exemplo o Genome DataBase (GDB), o GenBank e Swiss-Prot. Atualmente as bases de dados são organizadas por locus específico e disponibilizadas na internet. Entretanto, o mesmo autor aponta algumas considerações sobre o funcionamento dessas bases de dados. O primeiro ponto é a falta de atualização dos dados, talvez relacionado com a falta de financiamento dos projetos. O segundo ponto é que, muitas vezes, há falta de padronização de termos e classificações, como, por exemplo, sobre polimorfismo. Outras discrepâncias estão presentes nas metodologias e programas informatizados empregados.

As alterações no DNA podem ser somáticas ou germinativas. As mutações somáticas são adquiridas ao longo da vida pelo tecido somático e predominantemente desenvolve a neoplasia com a mutação restrita ao tumor. Já as mutações germinativas, também denominadas hereditárias ou constitutivas, são encontradas em todas as células do organismo e podem passar de geração em geração (INSTITUTE, 2006). Este tipo de mutação é a causa de diversas doenças hereditárias, como fibrose cística ou hemoglobinopatias, e também podem estar relacionadas com síndromes hereditárias de câncer, como o câncer de mama familiar (com mutação no *BRCA1* e *BRCA2*) (THULL,VOGEL, 2004).

As mutações no gene *TP53* são observadas em diversos tumores adquiridos (CARON DE FROMENTEL,SOUSSI, 1992). Mutações somáticas do *TP53* são encontradas em aproximadamente 50% dos tumores, sendo um dos genes mais freqüentemente alterados em cânceres humanos (HARRIS,HOLLSTEIN, 1993; LEVINE, 1997; VOUSDEN, 2002).

De acordo com a revisão realizada por Vogelstein e Kinzler (1992), existem cinco mecanismos para a inativação do p53:

- Acredita-se que o p53 liga-se como um tetrâmero a um local de ligação do p53 e assim, ativa a expressão de genes adjacentes que inibem o crescimento e/ou apoptose.
- A deleção de um ou de ambos alelos do *TP53* reduz a expressão do tetrâmero, resultando na diminuição da expressão dos genes inibidores de

crescimento. Este mecanismo é encontrado em diversos tipos de tumores ocasionais.

- Mutações “*nonsense*” ou no sítio de *splicing* que resultam em proteínas truncadas não permitem a oligomerização, e assim, reduzindo os tetrâmeros de p53. Mutações desse tipo são comuns em tumores de pulmão, esôfago e outros.

- Outro mecanismo envolve mutações “*missense*”, resultando em efeitos dominantes negativos, com uma redução do funcionamento de tetrâmeros ativos. Estas mutações são mais comuns em tumores de cólon, cérebro, pulmão, mama, pele, bexiga e outros.

- O quinto mecanismo no qual o p53 está envolvido na oncogênese é comum em tumores cervicais, onde a expressão do gene *E6* do papilomavírus humano resulta na inativação funcional do p53 através da ligação e degradação.

As mutações no *TP53* ocorrem por deleção, inserção, truncação ou mutação de ponto, sendo que os tumores freqüentemente apresentam perda de heterozigossidade somática pela deleção do alelo normal ou selvagem (VARLEY, 2003).

Diferente da maioria dos outros genes supressores tumorais, que são inativados por *frameshift* ou mutações *nonsense*, gerando o desaparecimento ou a síntese de produtos gênicos aberrantes, quase 90% das mutações no *TP53* são *missense* (troca de aminoácidos), produzindo a síntese de uma proteína estável, com a falta de um domínio específico de ligação ao DNA e que se acumula no núcleo das células tumorais (SOUSSI, BEROUD, 2001).

Esta particularidade de acúmulo nas células tumorais pode levar a duas conseqüências: (1) um papel dominante negativo pela heterooligomerização com o tipo selvagem de p53 expresso pelo segundo alelo, ou (2) um específico “ganho de função” do p53 mutante. Infelizmente os estudos que tentaram distinguir entre as duas hipóteses não foram elucidativos e foram dificultados pelo fato que nem todas as mutações do *TP53* se apresentam equivalentes, com diferentes alterações estruturais e de perda de função (SOUSSI, 2003).

Deleções do *TP53* não parecem ser comuns (PLUMMER et al., 1994), mas já foram descritas, incluindo um caso com uma completa deleção heterozigota do gene *TP53* (BOUGEARD et al., 2003). Mutações intrônicas e defeitos na região

promotora do *TP53* são raramente relatados (AVIGAD et al., 1997; BAREL et al., 1998).

O significado biológico de mutações por deleções, inserções ou *nonsense* parecem claras, no entanto, mutações germinativas *missense* podem causar dificuldade no momento de se diferenciar se essa variação é uma mutação causal ou, então, polimórfica, sem qualquer efeito no fenótipo. Mesmo com estudos aprofundados com análise de mutações familiares e estatísticas, esta questão permanece sem respostas (SOUSSI, BEROUD, 2003).

A mutação mais encontrada nas bases de dados de mutações no *TP53* está localizada no códon 175, com a substituição de uma guanina por uma adenina. Esta transformação faz com que uma arginina seja trocada por uma histidina. Esta mutação parece estar associada com uma atividade de ganho de função, conferindo também resistência à quimioterapia (BLANDINO et al., 1999).

A análise das bases de dados de alterações no gene *TP53* revela que as mutações encontradas correspondem a 30% de todas as mutações encontradas nas doenças humanas. Interessante notar que a frequência dos tipos de alterações é inversamente proporcional à atividade do p53, ou seja, quanto mais rara a mutação encontrada, menor o significado da alteração em relação à atividade do p53 selvagem (SOUSSI et al., 2006).

A inativação do p53 causa a replicação do dano ao DNA e acúmulo de mutações e rearranjos. O risco aumentado de câncer em indivíduos carregadores de mutações germinativas heterozigotas no *TP53* refletem a deficiência na manutenção da estabilidade genômica (CHOMPRET, 2002).

Há diversos métodos relatados para a detecção de mutações germinativas do *TP53*. Alguns grupos ainda utilizam apenas o estudo dos exons 5-8 usando a técnica de polimorfismo conformacional de fita dupla (SSCP), e muitas vezes estes estudos não incluem locais *splice*. Outros grupos executam estudos mais aprofundados, com a análise de toda a região codificadora pelo SSCP ou pelo seqüenciamento. Outros estudos focam a análise das mutações mais frequentes (“*hot spots*”) no gene *TP53*, denominado região II a V, codificado pelos exons 5 a 8 do gene (SOUSSI et al., 1990).

Para Soussi e colegas, o padrão ouro para a detecção de mutação no *TP53* é o seqüenciamento direto do DNA genômico, englobando a região codificadora, o

primeiro exon não codificador, a primeira região promotora, a região 3 delta e todas as junções *splice*. Se nenhuma região for encontrada, deve-se pesquisar alterações no tamanho e também se os dois alelos são expressos, sendo que este último caso somente é possível se o paciente possui um polimorfismo, por exemplo, no códon 72. Usando esta metodologia em um determinado grupo, Soussi e colaboradores (1990) encontraram mutações germinativas em 77% de famílias com a Síndrome de Li-Fraumeni e em 40% em famílias Li-Fraumeni-símile.

A observação clínica e epidemiológica dessas famílias com um tendência ao desenvolvimento de câncer, levou Knudson a desenvolver um modelo conhecido como “dupla mutação” que explicaria o desenvolvimento do câncer hereditário (KNUDSON, 1996). De acordo com sua hipótese, a mutação de um alelo do gene *TP53* é herdada de forma germinativa, levando a um aumento de susceptibilidade para o câncer nos portadores, sendo que uma “segunda mutação” ou a perda do segundo alelo normal é que resultaria no desenvolvimento do câncer.

As primeiras cinco mutações descritas no estudo realizado por Malkin e colaboradores (1990), envolvendo indivíduos com a SLF, foram todas encontradas aglomeradas numa pequena região do exon 7, revelando, de uma forma otimista, que todas as mutações causadas poderiam estar confinadas. Posteriormente comprovou-se que as mutações estavam presentes ao longo de todo o gene (VARLEY, 2003).

O tipo e a localização das mutações germinativas no *TP53* parecem ser idênticas àquelas observadas em mutações esporádicas (KLEIHUES et al., 1997). A grande maioria dessas ocorrem no domínio central de ligação seqüência-específica ao DNA e quase 50% alteram códons 175, 248, 249, 273 ou 282 (LEVINE, 1997; OLIVIER et al., 2003). Estas mutações são *hot spots*, ocorrendo um bloqueio físico de ligação do DNA (mutação de contato) ou, então, mudanças na conformação da proteína (mutação estrutural). Em geral, as mutações dentro do domínio central podem ser classificadas como as dos aminoácidos que têm contato direto com o DNA (CHO et al., 1994; WONG et al., 1999).

Experimentos *in vitro* demonstram que nem todas as mutações no *TP53* são equivalentes funcionalmente, algumas apresentam ganho de função e/ou propriedades dominantes negativas (BLANDINO et al., 1999). Estas diferenças poderiam explicar a tumorigênese nos diversos órgãos-alvos das mutações

germinativas do *TP53*. Outras influências seriam os fatores específicos do tecido, sendo um exemplo o relato da mutação R337H no *TP53* que predispõe exclusivamente a carcinoma adrenocortical em crianças (RIBEIRO et al., 2001).

Há evidências de que a natureza e a posição das mutações germinativas no *TP53* poderiam determinar o fenótipo do câncer nos portadores afetados pela SLF. Olivier e colaboradores (2003) pesquisaram a associação entre o tipo de tumor e o tipo de mutação no *TP53* nessas famílias. Mutações *missense* nas alças L2 e L3, que se ligam com a alça menor do DNA, foram associadas com tumores cerebrais e os carcinomas adrenocorticais foram associados com mutação *missense* localizadas nas alças que permitem o contato proteína-DNA.

De acordo com os resultados de Olivier, as mutações que resultam em fenótipo *null* (ausência de proteína ou perda de função) não foram associadas com nenhum tipo específico de tumor, mas foram correlacionadas com o início precoce dos tumores, especialmente os cerebrais. Isto poderia sugerir que estas mutações *null* tenham um efeito severo ou poderiam predispor a tumores com diferentes tipos histológicos com pior prognóstico.

Para o câncer de mama, a pesquisa conduzida por Olivier não encontrou nenhuma estrutura em particular associada à mutação, mas as mutações localizadas no domínio de ligação ao DNA foram relacionadas com o início precoce do tumor.

O mesmo trabalho permitiu avaliar o risco de desenvolvimento de um tumor específico em relação à idade dos indivíduos com a mutação do *TP53*. Antes dos 10 anos de vida, os carcinomas adrenocorticais, sarcomas de partes moles e tumores cerebrais são os mais prevalentes. Nos adolescentes, a prevalência desses três tumores diminui, sendo que o mais comum passa a ser o osteossarcoma. Depois dos 20 anos de idade, os principais tumores são os de mama e, novamente, o tumor cerebral (OLIVIER et al., 2003).

A comparação com a população em geral indicou que, nos casos de câncer de mama, sarcomas de partes moles e carcinomas adrenocorticais apresentados no estudo de Olivier e colaboradores, o pico de incidência é em idades mais jovens nos portadores de mutação no *TP53*. Já nos casos de osteossarcoma e tumor cerebral há o mesmo padrão de distribuição na população em geral (HERZOG, 2005; KONSTANTINIDOU et al., 2005).

Já o estudo conduzido por Nichols e colaboradores (2001), comparou a idade do diagnóstico de tumores com mutação de famílias com a SLF, acompanhado de mutação no *TP53*, com a incidência de câncer na população geral americana. O resultado foi que a idade do diagnóstico chegava a ser duas a três décadas mais cedo para os portadores de mutação no *TP53*, dependendo do local anatômico acometido.

3.3.1 Significado clínico e prognóstico para as mutações do gene *TP53*

O significado clínico das mutações no gene *TP53* apresenta um grande número de controvérsias, talvez explicado pela diversidade de metodologias para a pesquisa. Uma das maiores dificuldades consiste na comparação de análises de imunohistoquímica que são empregadas para avaliar o acúmulo de mutações estáveis nas células tumorais e análises moleculares que demonstram a natureza dos eventos mutacionais que inativam o gene *TP53* (SOUSSEI, 2003).

Em geral, mutações no *TP53* são mais freqüentes em doenças agressivas e são associadas com pior taxa de sobrevivência. É o que ocorre na fase crônica da leucemia mielóide crônica, em que as alterações no *TP53* são raras, mas são comuns na crise blástica, ocorrendo também na transformação do linfoma folicular indolente para a doença agressiva difusa, correlacionada com mutações no *TP53* em 25-30% dos casos (WICKREMASINGHE, HOFFBRAND, 1999).

O conhecimento do estado do *P53* no tumor pode contribuir para a avaliação prognóstica e guiar o processo de decisão terapêutica. Por exemplo, pacientes com câncer de mama metastático que apresentam mutação no *TP53* alcançam pouca resposta com terapia anti-estrógena utilizando tamoxifeno (BERNS et al., 2000).

A apoptose dependente do p53 pode modular o efeito tóxico de agentes antineoplásicos. Nos tumores de mama, as mutações no *TP53* foram associadas com resistência ao tratamento com doxorubicina (AAS et al., 1996). Já o paclitaxel, um agente estabilizador de microtúbulos, apresenta uma ótima resposta em tumores com a mutação, talvez explicado pela falha na parada do ciclo celular causado pela deficiência do p53 e, desta forma, garantindo a ação do paclitaxel durante a fase da mitose (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000).

Outros tumores que freqüentemente contêm mutações no gene *TP53* (câncer de pulmão, tumor colorretal, bexiga e próstata) muitas vezes respondem de forma insatisfatória ao tratamento com quimioterapia ou radioterapia, devido à falha na indução de apoptose resultante da mutação no *TP53*. Em crianças, a leucemia linfoblástica aguda, que freqüentemente apresenta a proteína p53 selvagem, responde muito bem à quimioterapia. Quando este tipo de neoplasia recidiva, a inefetividade da terapia está correlacionada com a aquisição de mutações no *TP53* (LEVINE, 1997).

A associação da inatividade do p53 e a pobre resposta ao tratamento quimio e radioterápico parece clara em modelos animais (PARANT, LOZANO, 2003), no entanto, os dados clínicos se mostram controversos e se tornam ainda mais complexos quando se detectam mutações no *TP53* altamente heterogêneas em termos de perda de função, gerando vários fenótipos que podem ser células-específicas (SOUSSI, BEROUD, 2003).

Os dois homólogos do gene *TP53*, o *TP63* e o *TP73*, são capazes de cooperar com o *TP53* para induzir a apoptose, sugerindo uma complexa, e ainda desconhecida, rede de interações entre os produtos dos três genes (DI COMO et al., 1999). Mutações no *TP63* e no *TP73* são muito incomuns em tumores humanos, mas a descoberta que mutações no *TP53* poderiam interferir nas proteínas p63 e p73 selvagens e na atividade apoptótica, indicaria que esta via de sinalização poderia ser central para mecanismos de resistência aos tratamentos anti-tumorais, explicando certas contradições reportadas na literatura (STRANO et al., 2000).

3.3.2 Polimorfismos

Usualmente, as variações genéticas encontradas em mais de 1% na população normal correspondem a um polimorfismo, ou seja, são mudanças sem qualquer efeito no fenótipo (NELSON, 2005). Diversos estudos têm sido propostos para a detecção de polimorfismos e para correlacioná-los com respostas a tratamentos, prognósticos e recorrências e, principalmente, para entender a sua participação no desenvolvimento das enfermidades na área da oncologia.

A proteína selvagem p53 possui um polimorfismo muito comum no aminoácido 72, resultando tanto no aminoácido prolina quanto em arginina nesta

posição. Este polimorfismo é gerado a partir de uma substituição de um único par de bases no códon 72, sendo que CCC codifica uma prolina e a combinação CGC codifica uma arginina. Esta mudança ocorre numa região não conservadora e resulta em uma mudança estrutural na proteína p53 selvagem, podendo ser comprovada pela diferença no padrão de migração das variações prolina e arginina em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (MATLASHEWSKI et al., 1987).

As diferenças biológicas e bioquímicas entre as variações prolina e arginina também puderam ser comprovadas por meio das habilidades em ativar genes relacionados com a maquinaria transcricional, sendo que a variação arginina mostrou mais rapidez e eficiência em induzir a apoptose do que a variação prolina (THOMAS et al., 1999). Este tipo de polimorfismo afeta a estrutura essencial para a apoptose (WALKER, LEVINE, 1996; SAKAMURO et al., 1997), podendo interferir na quimiossensibilidade de certos tumores (MARIN et al., 2000).

Um estudo de polimorfismo realizado por Bergamaschi e colaboradores (2003) demonstrou que somente mutações no *TP53* expressando a forma arginina é que são resistentes a agentes citotóxicos. Este estudo foi realizado com pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço com mutação no *TP53*, revelando que, quando a mutação estava associada com polimorfismo arginina, estes indivíduos tinham uma baixa resposta à quimioterapia e uma pequena taxa de sobrevida.

Diferenças étnicas relacionadas com as freqüências nos alelos são observadas, com aumento de freqüência de prolina no códon 72 em populações africanas. Já em populações da Europa Ocidental, Américas do Norte e Sul e Japão, a presença de arginina no códon 72 é a mais comum (OLIVIER et al., 2002).

A prevalência de alelo prolina no *TP53* parece ser maior em populações que estão perto da linha do Equador, podendo-se inferir que este genótipo confere um efeito protetor contra danos causados por raios ultra-violeta (BECKMAN et al., 1994).

O significado do prognóstico do polimorfismo no códon 72 também foi avaliado num grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado, mas os resultados não indicaram associação com aumento de sobrevida, sendo que os autores sugerem estudos mais aprofundados em relação ao início tardio e progresso lento da doença para os pacientes com códon 72 arginina (ZHANG et al., 2004).

Já estudo com casos de câncer colorretal com metástases hepáticas sugere que a perda da prolina no códon 72 ou mutações no códon arginina são associados com o potencial maligno deste tipo de tumor (SCHNEIDER-STOCK et al., 2004).

Estudo *in vitro* com a proteína p53 contendo arginina na posição 72 demonstrou que a proteína acabava sendo alvo para degradação da proteína E6 do papiloma vírus humano (HPV 16), sugerindo que os indivíduos homozigotos para a arginina na posição 72 poderiam correr um risco maior para câncer cervical relacionado por HPV 16 (STOREY et al., 1998). Mas os estudos populacionais não conseguiram chegar a uma correlação (KLUG et al., 2001; KOUSHIK et al., 2005). Outro estudo também não obteve sucesso em comprovar esta associação devido a variações inter-laboratoriais e dificuldades na replicação dos dados (MAKNI et al., 2000).

Outro exemplo de dificuldade de correlação do polimorfismo no códon 72 envolveu estudos com câncer de pulmão. O genótipo prolina homozigoto foi associado com aumento no risco para o desenvolvimento da neoplasia (KAWAJIRI et al., 1993; WU et al., 2002). Em contrapartida, outros estudo com genótipo arginina/prolina obteve conclusão oposta (FAN et al., 2000).

Além do códon 72, outro local estudado para a investigação da associação de polimorfismos no *TP53* com o aumento de risco de câncer é a duplicação do intron 3. Foi encontrado que este tipo de polimorfismo estava associado com aumento de câncer colorretal num estudo caso-controle (GEMIGNANI et al., 2004). Mas não foi possível determinar se o polimorfismo afeta sozinho a estabilidade do RNA mensageiro, ou se sua atividade está vinculada à variação prolina do códon 72.

Outro tipo de polimorfismo responsável pela alteração de seqüência de aminoácidos na proteína p53 é a troca de prolina por serina no resíduo 47. Este é um raro polimorfismo, já que em menos de 5% de afro-americanos, este aminoácido é uma serina (CANCER, 2005).

Um recente estudo (LI et al., 2005) sugeriu que este polimorfismo no códon 47 tem um significado funcional, diminuindo a habilidade de indução de apoptose. Também foi demonstrada uma diminuição na habilidade de ligação com genes transcripcionais alvos do p53, como o *p53AIP1* e *PUMA*.

Conforme o número de estudos aumenta, as correlações entre os polimorfismos e câncer parecem não chegar num consenso, conforme conclusão de

uma meta-análise com treze estudos sobre risco de câncer de pulmão e polimorfismo (MATAKIDOU et al., 2003).

Um estudo recém-publicado com grupo de indivíduos portadores da SLF confirmou o impacto da variação MDM2 SNP309, com troca de timina por guanina, no início precoce da formação do tumor nessa população com mutação no *TP53* e ainda sugere que este efeito pode estar aumentado nos casos de alelo 72 arginina no *TP53* (BOUGEARD et al., 2006).

3.4 PARTICIPAÇÃO DE OUTROS GENES NA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

Mais de 70% dos indivíduos com a Síndrome de Li-Fraumeni Clássica apresentam mutação germinativa no gene supressor tumoral *TP53* (VARLEY, 2003). A ausência de mutações no gene *TP53* numa proporção considerável de indivíduos com a SLF sugere que alterações em outros genes sejam relevantes para o surgimento do câncer neste grupo (BARLOW et al., 2004).

Membros de famílias com a SLF com alelos normais do *TP53* poderiam ter mutação em outros genes com alta penetrância que produziriam um padrão autossômico dominante similar de câncer, provavelmente envolvendo genes que participam na via de transdução do p53 (HISADA et al., 1998).

Um estudo se propôs a avaliar a relação da SLF com a mutação no gene *Bax*, envolvido na regulação do p53 (BARLOW et al., 2004), já que mutações no gene *Bax* foram encontrados muito raramente em gliomas e em câncer de cólon (CHOU et al., 1996; RAMPINO et al., 1997). No entanto, o estudo não demonstrou que as alterações no *Bax* fossem responsáveis pelo câncer em indivíduos com a SLF com *TP53* selvagem.

Outros estudos também excluíram a responsabilidade dos genes *CDKN2A*, *PTEN*, *BCL10* e *TP63* na gênese do câncer nas famílias com a SLF (BURT et al., 1999; STONE et al., 1999; BROWN et al., 2000; PORTWINE et al., 2000; BOUGEARD et al., 2001).

O papel do gene *CHEK2* na SLF ainda não é muito claro, embora alguns trabalhos sugeriram que sua alteração esteja presente em poucas famílias (BELL et al., 1999; LEE et al., 2001; VAHTERISTO et al., 2001)

Após intensas pesquisas e revisões, verificou-se que nenhum outro gene está intrinsicamente associado com a SLF além do *TP53*. Mesmo as mutações relatadas no gene *CHEK2* atualmente são consideradas apenas polimorfismos, podendo ser associadas com a predisposição ao câncer de mama (ACHATZ,HAINAUT, 2005).

O entendimento atual da SLF e a sua associação com a mutação germinativa no *TP53* ainda são incompletos. Em se tratando de uma desordem como esta, o controle do câncer através da prevenção e da detecção precoce deve ser proposto para todos os familiares afetados.

3.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Os avanços na pesquisa genética prometem importantes mudanças no diagnóstico e no tratamento de muitas doenças, incluindo o campo da oncologia. No entanto, a emergente tecnologia genética acaba por oferecer testes e triagens antes mesmos da definição de tratamentos e de medidas de prevenção (NELSON et al., 2001).

O aconselhamento genético pode ser definido como um processo de comunicação que detalha os problemas humanos associados com a ocorrência, ou risco de ocorrência, de uma desordem genética na família (FRASER, 1974). Este processo se propõe a ajudar o indivíduo e sua família a:

- (1) compreender os fatos médicos, incluindo o diagnóstico, os prováveis cursos da doença e os tratamentos possíveis;
- (2) entender como a hereditariedade contribui para a doença e o risco para os parentes;
- (3) escolher as alternativas para extinguir os riscos de ocorrência ou recorrência;
- (4) decidir o curso mais apropriado, levando-se em consideração as metas familiares e seus padrões éticos e religiosos.

A *American Society of Clinical Oncology* (2003) recomenda que os testes e o aconselhamento genético em Oncologia sejam oferecidos quando:

- (1) exista um histórico familiar com predisposição ao câncer,
- (2) o teste genético seja adequadamente interpretado,

(3) o resultado ajude no diagnóstico ou influencie no tratamento médico do paciente ou membros da família com risco hereditário de câncer.

O *National Cancer Institute* (LI et al., 2006) acrescenta ainda as condições de um diagnóstico de câncer em idade atípica; o caso de tumores raros, como o carcinoma adrenocortical; tumores associados a defeitos de nascimento; múltiplos tumores na família ou em casos de ansiedade extrema relacionada a câncer, mesmo na ausência de risco aparente.

Também existe a recomendação que os testes sejam realizados mediante aconselhamento antes e após sua execução, proporcionando a discussão de possíveis riscos e benefícios da detecção precoce do câncer e das medidas de prevenção. O aconselhamento genético é fornecido por profissionais da saúde (enfermeiras, psicólogos, assistentes sociais e médicos) especializados nesta área *National Cancer Institute* (LI et al., 2006).

Os testes genéticos para a avaliação de susceptibilidade ao câncer são baseados em intensas pesquisas e, tanto na identificação de síndromes hereditárias ao câncer comuns ou raras, a confirmação de uma mutação possui um impacto muito grande, seja na conduta clínica ou nas decisões pessoais e familiares. Em outros casos, como as mutações no *TP53*, o acompanhamento clínico dos portadores é incerto, devido à complexidade do fenótipo, falta de triagem efetiva, ou medidas específicas para a diminuição dos riscos do câncer (SACGT, 2000).

Os resultados de um teste genético podem trazer alívio emocional e a dispensa de intervenções clínicas e cirúrgicas desnecessárias para os casos de testes negativos de indivíduos pertencentes a famílias com câncer hereditário. Já o resultado positivo e as subseqüentes intervenções acarretam estresse. Conseqüências adversas também são geradas nos casos de resultados ambíguos ou mal interpretados (FIELDS,CHEVLEN, 2006).

O significado da identificação de mutações germinativas de certos genes envolvidos no reparo do DNA e o encontro de polimorfismos co-responsáveis pela biotransformação de antineoplásicos ainda não são claros, principalmente quando os indivíduos não pertencem a famílias com histórico de câncer. Acredita-se que o desenvolvimento da farmacogenômica ajude a elucidar estas correlações (EMILIEN et al., 2000).

Os impactos médicos, sociais e de seguridade associados aos resultados de testes genéticos devem ser discutidos nas sessões de aconselhamento, sendo que a confidencialidade das informações genéticas deve ser primordial (LI et al., 2006).

Muitas condições genéticas ainda são difíceis de tratar ou prevenir e o valor das informações obtidas com os testes podem não alterar a condição clínica do indivíduo. Para uma criança, fica difícil discernir a relevância destas informações para sua própria vida, por isso uma atenção especial deve ser direcionada quanto à importância do aconselhamento genético para a família e para ela própria, se não momentaneamente, para o futuro (TISCHKOWITZ,ROSSER, 2004).

A *American Academy of Pediatrics* recomenda que o médico pediatra ajude a criança e seus pais a entenderem a importância dos resultados dos testes genéticos, encaminhe ao aconselhamento genético e realize os testes somente quando exista benefício para a criança.

Chompret e colaboradores (2000) sugerem que seja oferecido a análise do *TP53* para indivíduos que preencham, pelo menos, um dos seguintes critérios:

1) probando afetado por um sarcoma, tumor cerebral, câncer de mama ou carcinoma adrenocortical antes dos 36 anos de idade com pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau com câncer (diferente de câncer de mama se o probando tiver um câncer de mama) antes dos 46 anos de idade; ou, um parente com tumores múltiplos primários em qualquer idade;

2) probando com tumores múltiplos primários, dois dos quais sarcomas, tumor cerebral, câncer de mama e/ou carcinoma adreno-cortical, com o início do câncer ocorrendo antes dos 36 anos de idade, não obstante o histórico familiar.

3) probando com carcinoma adrenocortical, independente da idade de início ou história familiar.

Ainda não existem recomendações efetivas para diminuir a morbidade e mortalidade em indivíduos acometidos pela SLF (ACHATZ,HAINAUT, 2005).

O seguimento dos indivíduos acometidos por esta Síndrome ocorre de maneira diferenciada para adultos e crianças. Para adultos, são propostos exames físicos completos e dermatológicos anuais; além de exames relacionados com o histórico familiar (por exemplo, colonoscopia em intervalos regulares se um parente já teve câncer colorretal). Exames de triagem invasivas ou de alto custo, como por

exemplo ressonância magnética de corpo total e *PET scan*, não são recomendados para a detecção precoce de tumores sólidos (ENG et al., 1997).

No caso de câncer de mama é realizado o monitoramento por meio do auto-exame das mamas, rotinas de exames clínicos a cada seis meses e mamografias anuais, no entanto são efetivos em mulheres com idade acima de 40 anos (LI, 1995). A recomendação de mamografia rotineira para estas mulheres parece controversa, devido o risco potencial de radiação em casos de mutação no *TP53* (ENG et al., 2001). Também há a opção de mastectomia profilática para reduzir o risco de câncer de mama (THULL,VOGEL, 2004).

Indivíduos com mutações no *TP53* devem evitar ou minimizar a exposição à radiação (VARLEY, 2003), por se tratar de um conhecido fator de risco para o desenvolvimento do câncer, com exceção da leucemia linfocítica crônica (DARBY et al., 1987). Outra sugestão é que a radioterapia nesses indivíduos deve ser evitada se possível, já que vários estudos foram publicados detalhando a ocorrência de neoplasias secundárias à radioterapia em portadores de mutações (HISADA et al., 1998; VARLEY et al., 1999; NUTTING et al., 2000; LIMACHER et al., 2001) e em animais com p53 deficiente (KEMP et al., 1994; LEE et al., 1994).

Para o seguimento de crianças, são propostos alguns exames anuais, como: exame físico completo, realizado por médico especialista, urianálise, ultrassom abdominal e exames adicionais relacionados com o histórico familiar (por exemplo: tomografia cerebral se existe caso de tumores cerebrais na infância), sempre se levando em consideração as queixas de sintomas físicos como: desconforto abdominal, dores de cabeça e ossos. A solicitação sistemática de hemogramas para a detecção de leucemia parece ser questionada (HISADA et al., 1998; VARLEY, 2003).

A opção por um estilo de vida saudável e diminuição da exposição a fatores ambientais carcinogênicos deve ser recomendada. Devido à raridade da SLF, mais esforços devem ser empregados na busca por cooperação e estudos clínicos internacionais (HISADA et al., 1998). O entendimento das conseqüências das mutações no *TP53* encontradas em famílias com SLF, em especial em células mesenquimais, é fundamental para o cuidado e o aconselhamento desses pacientes (BOYLE et al., 1998).

3.6 CULTURA CELULAR

3.6.1 Características gerais

O termo cultura celular se refere a um cultivo derivado de células dispersas obtidas originalmente de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular por técnicas de desagregação enzimática, mecânica ou química. A técnica de cultura celular constitui um sistema viável para a manutenção de células e tecidos por propiciar um ambiente composto de substâncias indispensáveis à sobrevivência, crescimento e multiplicação como: concentrações adequadas de sais e íons, vitaminas, fontes de energia, aminoácidos e hormônios (MORTON et al., 1970).

Os primeiros experimentos foram realizados no início do século XX com tecidos de sapos. Com o aprimoramento das técnicas, as células obtidas de mamíferos foram as mais utilizadas, incluindo as células tumorais humanas. Com isso houve uma grande revolução na pesquisa médica, principalmente na produção de vacinas antivirais e no estudo do câncer (FRESHNEY, 2000).

O cultivo de células humanas recebeu um grande impulso com a disponibilidade de diversos meios nutritivos desenvolvidos para os específicos tipos celulares, como queratinócitos epidermais, células do epitélio brônquico e endotélio vascular (FRESHNEY, 2000).

O meio Eagle é um dos mais utilizados em culturas celulares, sendo composto de uma solução balanceada de salina, vitaminas e aminoácidos (EAGLE, H., 1958). Este meio também pode ser encontrado na forma básica (BME), que é mais indicado para culturas de células diplóides, ou então na sua forma de meios mínimo (MEM), que contém maiores quantidades de vitaminas e aminoácidos e é indicado para o cultivo de linhagens celulares (HAM et al., 1979). O meio de Eagle tem sido modificado por vários pesquisadores, como o D-MEM, modificado por Dubbecco (DULBECCO, R., FREEMAN, G., 1959). Já para culturas de células neoplásicas, como o osteossarcoma, o meio nutritivo mais utilizado é o RPMI 1640 (MOORE, GLICK, 1967).

A troca do meio celular em intervalos regulares é primordial para a manutenção das condições ideais do pH, desta forma estabelecendo um balanço

entre a proliferação celular e a atividade de biossíntese de cada tipo celular (CECCARINI,EAGLE, 1971).

O fornecimento de condições ambientais favoráveis, incluindo as características físico-químicas dos substratos presentes nos meios de cultura, a temperatura de incubação, a provisão de gás e condição aeróbica, é fundamental para que as células expressem suas funções especializadas (DIEGELMANN et al., 1979).

Dentre as várias técnicas existentes para o cultivo celular, as mais usadas são: cultura em suspensão, em monocamada, de explantação, em lamínula e em suspensão aderidas a partículas (*microcarriers*) (WASLEY, 1969).

Os diferentes tipos celulares podem ser identificados por características morfológicas em um organismo íntegro, mas em cultura celular, estas diferenças normalmente desaparecem.

A morfologia celular de uma linhagem de celular de fibroblastos obtidos de tecido mesenquimal pode variar com as condições de cultura, com a idade da cultura e da própria linhagem celular. Geralmente as células fibroblásticas apresentam-se alongadas, fusiformes ou com prolongamentos citoplasmáticos aderidos na superfície da cultura e com pequena capacidade de formar membranas. Normalmente sua disposição é um arranjo de células em paralelo, sendo que o contato da confluência inibe a expansão (KEIRA et al., 2004)

Diferentemente, células epiteliais tendem a se apresentar com formato mais ou menos hexagonais e intimamente unidas (HEALY,PARKER, 1966; HORNSBY,MCALLISTER, 1991).

Algumas limitações para a técnica de cultura celular estão na necessidade de condições e técnicas de preparo assépticas; elevado custo para a manutenção de incubadoras, câmara de fluxo laminar, meios de cultura e materiais estéreis; além da instabilidade genética e fenotípica das linhagens celulares (FRESHNEY, 2000).

Em contrapartida, o estudo de culturas celulares poupa o uso de modelos animais experimentais, desde que as técnicas utilizadas *in vitro* sejam validadas. No entanto, os testes pré-clínicos em animais para novos fármacos ainda são preconizados. Os principais tipos de investigação propiciados pela cultura celular são relacionados a:

- atividade celular, como por exemplo o estudo da síntese protéica e

metabolismo energético;

- fluxo intracelular, como translocação de receptores hormonais;
- interação ambiental, como ação de drogas, citotoxicidade, mutagenese e carcinogênese;
- interação célula-célula, como cinética de proliferação celular, estudo de adesão e motilidade celular;
- genética, incluindo análise genômica de células sob condições normais e patológicas,
- produtos celulares, como secreção e desenvolvimento de biotecnologia e bioreatores (FRESHNEY, 2000).

3.6.2 Cultura celular e estudo com lesão ao DNA

O estudo com cultura de células obtidas de pacientes com a SLF pode contribuir para o entendimento das alterações celulares decorrentes da mutação no gene *TP53* e para explicar o surgimento do câncer nesses indivíduos. Já foi demonstrado, *in vitro*, que as mutações no *TP53* pode exercer um efeito dominante negativo na proteína p53 selvagem presente nas células de pacientes com a SLF (SRIVASTAVA et al., 1993).

Devido à alta frequência de sarcomas de partes moles encontradas em pacientes com a SLF (MALKIN et al., 1990), os fibroblastos de pele obtidos desses indivíduos fornecem um modelo apropriado de tecido mesenquimal sob risco em potencial, servindo de campo para a pesquisa de mecanismos de atividade de genes mutados que podem ser associados com a instabilidade genômica e a predisposição ao câncer (LIU et al., 1996).

Em cultura, os fibroblastos com mutações germinativas no *TP53* de pacientes com a SLF são inicialmente normais, mas depois passam a mostrar espontaneamente mudanças na morfologia, aberrações cromossômicas, como deleções, ampliações, quebras cromossômicas, translocações e aneuploidias e também a perda do alelo *P53* selvagem (LIU et al., 1996). Esta perda do alelo selvagem é necessária, mas não suficiente, para a imortalização celular espontânea observada em fibroblastos humanos da SLF (BISCHOFF et al., 1990; ROGAN et al., 1995; SHAY et al., 1995). Por esta razão, é necessário utilizar fibroblastos nas

primeiras passagens após a biópsia (P1-P8).

A imortalização celular é um evento *in vitro* relacionado com a capacidade de células normais diplóides de escaparem da senescência celular e se proliferarem de forma ilimitada. O mecanismo molecular não é muito entendido, mas passa por um processo que envolve meses de cultura celular até se obter um raro clone que imortaliza. A imortalização espontânea é um raro evento e sugere um passo crítico e limitante para o desenvolvimento da maioria dos tumores humanos (HARRIS et al., 1987).

A imortalização de células da pele (BISCHOFF et al., 1990) e de células epiteliais de mama (SHAY et al., 1995), ambos obtidos de pacientes com a SLF, foram alcançados de forma espontânea, sugerindo que as alterações na função do p53 selvagem poderiam estar relacionadas com a perda do controle do ciclo celular, causando o aumento da proliferação e resultando na imortalização, geralmente com a reativação da atividade da telomerase e perda de outros genes relacionados, como o gene *Rb* (GOLLAHON et al., 1998).

Para a avaliação da resposta celular, pode-se provocar uma lesão ao DNA por meio de radiação. Uma vez exposta a essa lesão, uma complexa maquinaria de mecanismos de sobrevivência e interrupção da progressão do ciclo celular é ativado, garantindo a integridade genética (KASTAN et al., 1991).

Por exemplo, a maioria das células em proliferação exibe a parada do ciclo celular nas fases G1 para S ou na fase G2 para a mitose depois de uma exposição à radiação gama, ultra-violeta ou agentes alquilantes do DNA (KAUFMANN, WILSON, 1994). Esta parada no ciclo celular previne a replicação do DNA e a mitose na presença de alterações cromossômicas não reparadas, além de prover tempo para o reparo do DNA (PAULES et al., 1995). Se este dano for grave, é desencadeado o processo de apoptose. Defeitos nos controles de checagem do ciclo celular e nas vias de apoptose estão relacionadas à progressão do câncer (WILLIAMS et al., 1997).

Trabalho pioneiro demonstrou a parada no ciclo celular em G1 em células humanas após a exposição à radiação ionizante (LITTLE, 1970). Em contrapartida, os fibroblastos obtidos de pacientes com síndrome de predisposição ao câncer, conhecida como ataxia telangiectasia, não apresentavam essa radiosensibilidade (LITTLE, NAGASAWA, 1985).

Esta importante diferença poderia ser explicada devido à diminuição ou ausência da estabilização da expressão do p53 em células com ataxia telangiectasia induzida pela radiação, quando comparadas com células normais, resultando em diminuição da expressão da proteína p21, que está relacionada com a parada do ciclo celular em G1 (DULIC et al., 1994).

Já foi demonstrado que esta parada no ciclo celular em G1 em fibroblastos pode acontecer de duas formas. A primeira pode ser uma pausa transitória na progressão do ciclo. Já a segunda forma é uma parada permanente, como se o fibroblasto entrasse em um estado senescente, com a maioria das células perdendo a capacidade proliferativa (G0, intervalo 0 ou "GAP" 0). Esta parada permanente em fibroblastos poderia ser comparada funcionalmente à apoptose descrita em outros tipos celulares, como um mecanismo de remoção de células com danos genéticos (DILEONARDO et al., 1994).

De acordo com Williams e colaboradores (1997), não há diferença na parada em G1 transitória entre fibroblastos da SLF e fibroblastos normais. Já os fibroblastos da SLF demonstraram uma capacidade reduzida na parada em G1 permanente induzida por radiação, quando comparadas com linhagens normais. De acordo com os autores, esse defeito na parada do ciclo celular permanente poderia contribuir significativamente para a predisposição de câncer em famílias com a SLF.

Em 1999, Boyle e colegas reforçaram este achado através da demonstração que a parada em G1, tanto a transitória como a permanente, era significativamente diminuída em células da SLF com mutação heterozigota, quando comparadas com células normais e células da SLF, mas sem mutação.

Neste trabalho, existiram diferenças nas respostas das paradas em G1 entre as linhagens celulares com mutação, que foram atribuídas ao tipo de mutação acometida. As mutações *missense* na região de ligação ao DNA e mutação *stop códon* demonstraram redução na parada do ciclo celular em G1. Em contraste, as linhagens com mutação heterozigota *splice site* responderam como as células normais. Já as linhagens celulares obtidas de doadores de SLF, mas sem mutações no *P53*, demonstraram resposta normal no controle do ciclo celular.

Estudo posterior demonstrou que os danos cromossômicos causados por radiação às linhagens celulares com mutação no *TP53* eram 50% maiores quando comparadas à células normais e chegavam a 100% de danos nas células de SLF

mas sem mutação (BOYLE et al., 2001). Este trabalho comprovou que células de SLF, com ou sem mutação, possuem uma capacidade reduzida em eliminar ou reparar danos cromossômicos do tipo induzidas por radiação ionizante e, esta falha, poderia contribuir para a predisposição de câncer nessa síndrome.

A perda da função no controle da parada em G1 poderia estar relacionada com o aumento na formação de quebras de cromátides porque estas células teriam menos tempo para o reparo do DNA antes da sua replicação (PAULES et al., 1995).

A instabilidade cromossômica pode ser expressa como alterações cromossômicas numéricas e estruturais, podendo estar relacionada com a perda do alelo selvagem *P53* nessas linhagens e parece ser uma característica mais marcante do que o aumento da longevidade ou resistência à radiação ionizante nas linhagens de fibroblasto de SLF, com ou sem mutação (BOYLE et al., 2002).

Em linhagens com mutação *TP53* heterozigota, a instabilidade genômica poderia ser relacionada com a resistência ao efeito letal de radiação ionizante em baixas doses (SPROSTON et al., 1996; BOYLE et al., 1998) e também com um comprometimento no controle do ciclo celular em G1 (BOYLE et al., 1999).

Acredita-se que estudos envolvendo epidemiologia populacional, o papel dos carcinógenos ambientais no desenvolvimento de câncer entre os membros das famílias, o desenvolvimento e a aplicação de análises moleculares que identifiquem as diferenças de heterogeneidade e raros polimorfismos e a pesquisa básica, como, por exemplo, o estudo de cultura celular obtido de indivíduos portadores da SLF com mutação no *TP53*, possam contribuir para o maior entendimento desta rara síndrome.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Uma paciente em tratamento oncológico foi encaminhada ao Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) para identificar provável alteração no DNA devido ao histórico familiar de câncer.

Após a explicação dos testes e ampla discussão sobre os possíveis resultados laboratoriais e de seus possíveis significados, foi solicitado à probanda, seu esposo, seus dois filhos, à sua mãe e à sua única sobrinha, a assinatura do Termo de Consentimento para a execução dos testes laboratoriais (Apêndices 1 e 2) e para a guarda do material biológico, que incluiu também células geradas a partir da biópsia da probanda e se sua mãe (Apêndice 3). Este estudo foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Anexo 1).

Foi realizada uma entrevista com a probanda e familiares sobre as principais manifestações clínicas apresentadas por ela e seus familiares em ordem cronológica. A partir dessas informações, foi elaborado um heredograma onde constam todos os casos de câncer.

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue foram obtidas da probanda, de seu esposo, dos dois filhos, de sua sobrinha e de sua mãe para extração de DNA e seqüenciamento de todo gene *p53*. Um fragmento de pele foi obtido da probanda e de sua mãe para obter cultivo de fibroblastos, e a partir destes fazer o seqüenciamento de DNA e avaliar como eles reagem à radiação gama (5 Gy), alterando a proliferação celular, usando como marcador de proliferação a incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), e avaliando a apoptose por meio do teste de TUNEL. Os dados familiares de câncer indicavam se tratar de SLF, e formulou-se a hipótese de que deveria existir na paciente disfunção da proteína *p53*.

Como controle, foi utilizada uma cultura de fibroblastos obtida a partir de fragmentos de pele de uma doadora sem histórico de câncer submetida a

procedimento cirúrgico eletivo sem finalidade oncológica. Para esta doadora, foi solicitado a assinatura do Termo de Consentimento Informado (Apêndice 4) e o termo para a guarda do material biológico (Apêndice 5).

4.3 SEQÜENCIAMENTO DO P53

O DNA genômico fornecido pela probanda e seus parentes, foi encaminhado e analisado no *Clinical Molecular Diagnostic Laboratory* da *City of Hope*, localizado na Califórnia, Estados Unidos. De acordo com a metodologia empregada no laboratório, o material foi amplificado em 5 segmentos cobrindo os éxons codificadores (exons 2-11) e uma junção *splicing* adjacente intrônica. Os segmentos amplificados foram analisados por seqüência direta do DNA por meio de um seqüenciador fluorescente. Para a confirmação de uma alteração foi realizada uma análise de seqüência do DNA na direção oposta usando um segmento amplificado independente.

Este tipo de análise para a detecção de mutação de ponto heterozigota apresenta uma sensibilidade maior que 95% e uma especificidade estimada em torno de 98%.

4.4 CULTURA CELULAR

Fragmentos de pele provenientes de biópsia foram transferidos para placa de Petri e lavados três vezes com o meio de cultura, composto por RPMI 1640 (85%), soro fetal bovino (15%), penicilina G sódica (10.000 unidades/mL), sulfato de estreptomicina (10.000 µg/mL) (0,5%) e anfotericina B (1µg/mL) (0,1%). Em seguida, foi realizada uma dissecação de tecido gorduroso e cortados fragmentos de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Os fragmentos foram lavados com meio e distribuídos em frascos de cultura celular de 75 cm².

O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a anfotericina B fez parte do meio de cultura do tecido e depois foi excluído do meio onde havia apenas células. Após uma semana, os fibroblastos aderiram à parede do frasco e, depois de atingirem confluência celular foram dissociadas utilizando-se tripsina-EDTA 0,5% por 10 minutos (processo de tripsinização enzimática).

Após a centrifugação por sete minutos, o precipitado celular foi ressuscitado em meio de cultura e os fibroblastos foram subdivididos em subculturas numa proporção de 1:4 em novos frascos de cultura celular. Este grupo de células foi denominado de células de 1^a. passagem (P1, ou seja, da primeira tripsinização). Este procedimento foi repetido até a 3^a. passagem (P3), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido como matrizes para uso futuro com passagens entre P4 e P6, evitando uso de fibroblastos que já alcançaram muitas passagens, as quais geralmente não se proliferam com a mesma rapidez ou podem já ter atingido o estágio de quiescência (G0, parada permanente do ciclo celular).

Os fibroblastos foram congelados usando meio e dimetil sulfóxido (DMSO) a 10 % e guardados em nitrogênio líquido. Em todos os experimentos com células da probanda e controle, foram utilizadas células da 4^a. passagem (P4).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

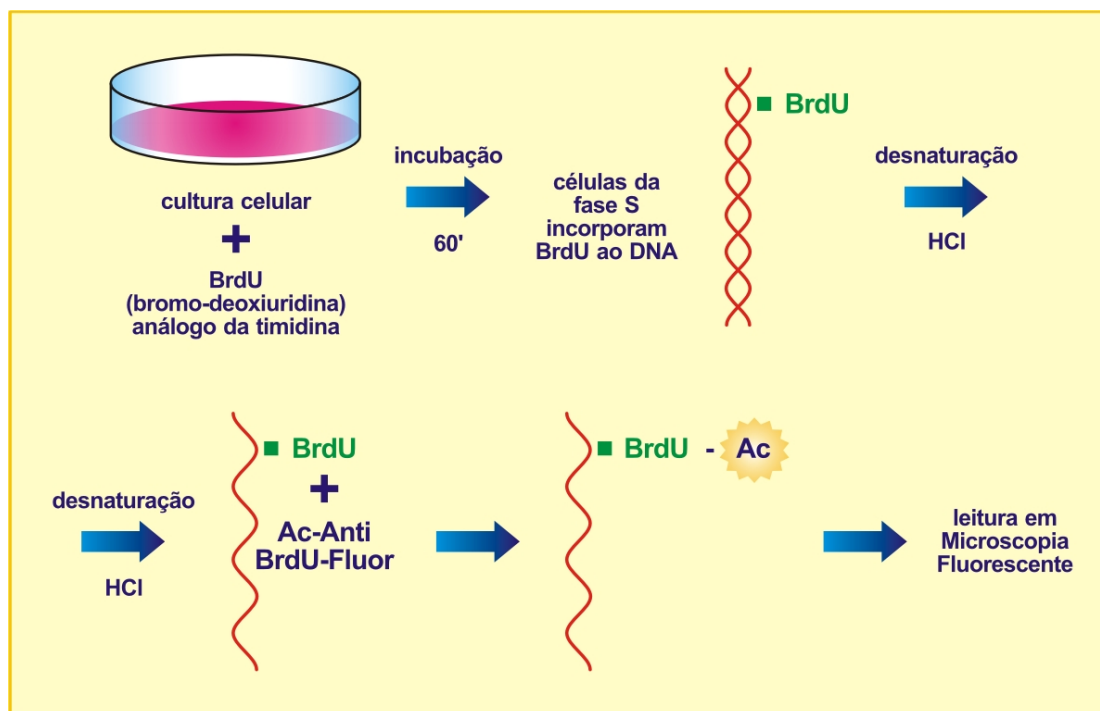
No interior dos poços da placa de cultura (com 24 poços) foram colocadas lamínulas de plástico estéreis, previamente tratadas com poli-L-lisina a 0,05% (SIGMA) por 30 minutos e o excesso foi retirado com água autoclavada, e em seguida deixado secar na capela de fluxo laminar sob luz ultra-violeta (UV) e fluxo laminar ligado por 2 horas.

O procedimento inicial deste teste consistiu na transposição de fibroblastos da congelados na 3^a. Passagem para os poços da placa, em quantidade suficiente para se alcançar a confluência celular em torno de 50% da superfície de cada lamínula, 24 horas antes da irradiação.

Metade deste material foi exposto a 5 Gy de radiação gama utilizando-se uma fonte de Cobalto (⁶⁰Co) com rendimento de 68,23 cGy/min a 80 cm. Esse radioisótopo emite fótons com energia média de 1,25 MeV. O material sem exposição à radiação serviu como controle negativo de lesão ao DNA. O mesmo procedimento foi realizado com a cultura de fibroblasto obtido da doadora sadia.

Para a detecção de proliferação celular utilizada no presente trabalho foi utilizado o kit Roche[®] cat. n^o. 1810740, baseado na incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina. O princípio deste teste é esquematizado na Figura 6.

FIGURA 6: Princípio do teste de Proliferação Celular



Procedimentos seguintes:

- 1) Seis horas após a exposição à radiação, o meio de cultura celular foi desprezado e adicionado novo meio, acrescido de solução de BrdU.
- 2) Em seguida, as células foram incubadas por sessenta minutos a 37°C em incubadora com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar.
- 3) Após este período, a solução foi desprezada e as células foram lavadas por cinco minutos, por três vezes, com tampão fosfato salina (PBS).
- 4) Foi adicionada a solução fixativa (solução de glicina 50 mM, pH 2 e etanol) e incubado por quarenta e cinco minutos em temperatura ambiente.
- 5) A solução foi desprezada e nova lavagem com PBS por duas vezes.
- 6) Foi adicionada a solução de desnaturação (ácido clorídrico 4M) e incubado por vinte minutos em temperatura ambiente.
- 7) Após este período, a solução foi desprezada e as células foram lavadas por três vezes com PBS, até atingir pH 6,5.
- 8) Foi adicionado 100 µL de tampão de incubação contendo 0,5% de solução de albumina bovina/fração V e 0,1% de Tween 20 e incubado por dez minutos em temperatura ambiente.

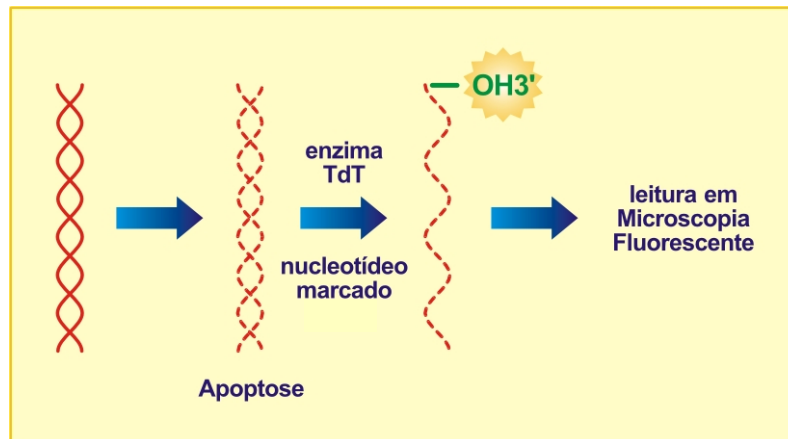
9) O tampão de incubação foi desprezado e adicionado 50 μL de solução de anticorpo anti-BrdU-FITC (anticorpo conjugado com fluoresceína). Imediatamente o material foi incubado por quarenta e cinco minutos a 37°C protegido da luz.

10) Após a incubação, foram novamente lavados com PBS por três vezes. Em seguida, as lamínulas foram colocadas em lâminas de vidro, intercaladas com 10 μL de solução DAPI/antifade.

4.6 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE *IN SITU*

Para a detecção e quantificação de apoptose a nível celular individual foi feita usando o kit Roche[®] cat. n.º. 11684795910, baseado na marcação de quebras de fita de DNA pela técnica de marcação dos terminais de DNA com dUTP (conjugada com FITC) mediada pela enzima deoxinucleotidil transferase terminal (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling =TUNEL). O princípio do teste de TUNEL é esquematizado na Figura 7.

FIGURA 7: Princípio do Teste de TUNEL



Células na fase logarítmica de crescimento de 4^a. passagem foram colocadas 24 horas antes da radiação numa concentração de 1×10^5 células/mL em lamínulas plásticas estéreis preparadas previamente com solução poli-L-lisina 0,05%.

Metade deste material foi exposto a 5 Gy de radiação gama utilizando-se uma fonte de Cobalto (^{60}Co) com rendimento de 68,23 cGy/min a 80 cm. Esse radioisótopo emite fótons com energia média de 1,25 MeV, sendo que o material

sem exposição à radiação serviu como controle livre de dano celular. O mesmo procedimento foi realizado com a cultura de fibroblasto obtido da doadora sadia.

Para a realização do teste de TUNEL, foi seguida a metodologia descrita a seguir:

1) Seis horas após a exposição à radiação, as células sofreram o processo de fixação com a adição de solução de paraformaldeído 4% recém-preparado e incubação por 1 hora em temperatura ambiente.

2) Após este período, as células foram lavadas com PBS.

3) Posteriormente as células foram permeabilizadas com solução Triton X-100 a 2°C por dois minutos e novamente lavadas com PBS por duas vezes.

4) Para controle positivo de apoptose, algumas lamínulas com células foram tratadas com deoxirribonuclease I 3U/ μ L por 20 minutos em temperatura ambiente.

5) Depois todas as lamínulas foram incubadas por sessenta minutos a 37°C no escuro com 50 μ L de solução recém preparada de mistura de TUNEL (solução com a enzima deoxinucleotidil transferase e dUTP marcada com FITC), com exceção das lamínulas para o controle negativo que ficaram livre da solução da mistura de TUNEL.

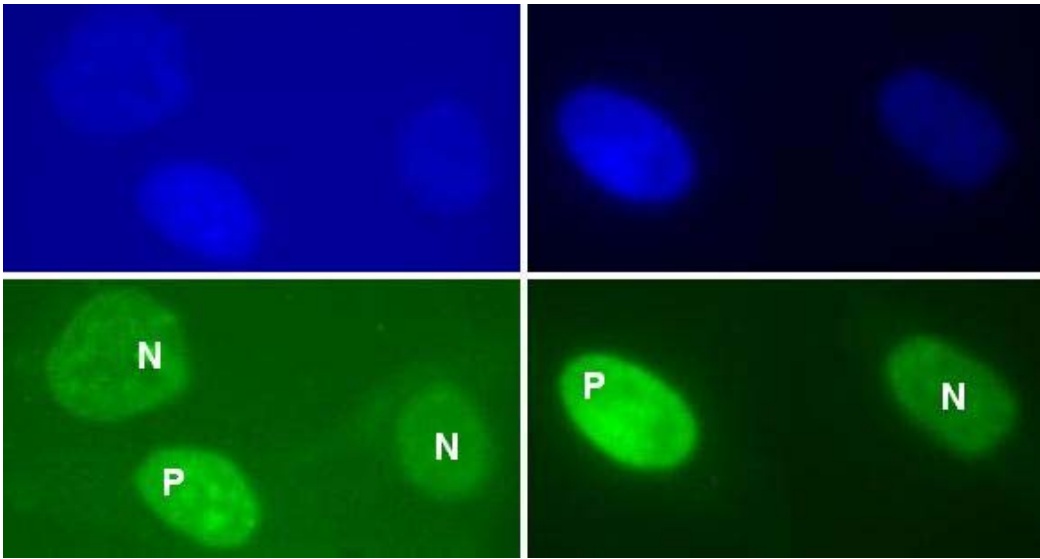
6) Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS. As lamínulas foram, então, transferidas para lâminas de vidro, intercaladas com 10 μ L de solução DAPI/antifade.

4.7 CONTAGEM DE CÉLULAS

As células de ambos testes foram analisadas com microscópio fluorescente (Zeiss Axiostop 2 plus mot; Carl Zeiss, Heidelberg, Germany). As imagens foram adquiridas usando o software Expo, versão 2.1.1 (Spectral Imaging Applied). Foi realizada a captura de imagens de cinquenta campos, contabilizando a média da quantidade de núcleos fluorescentes com filtro DAPI (filtro para excitação no comprimento de UV) e filtro FITC (filtro com excitação na faixa do azul, 450-490).

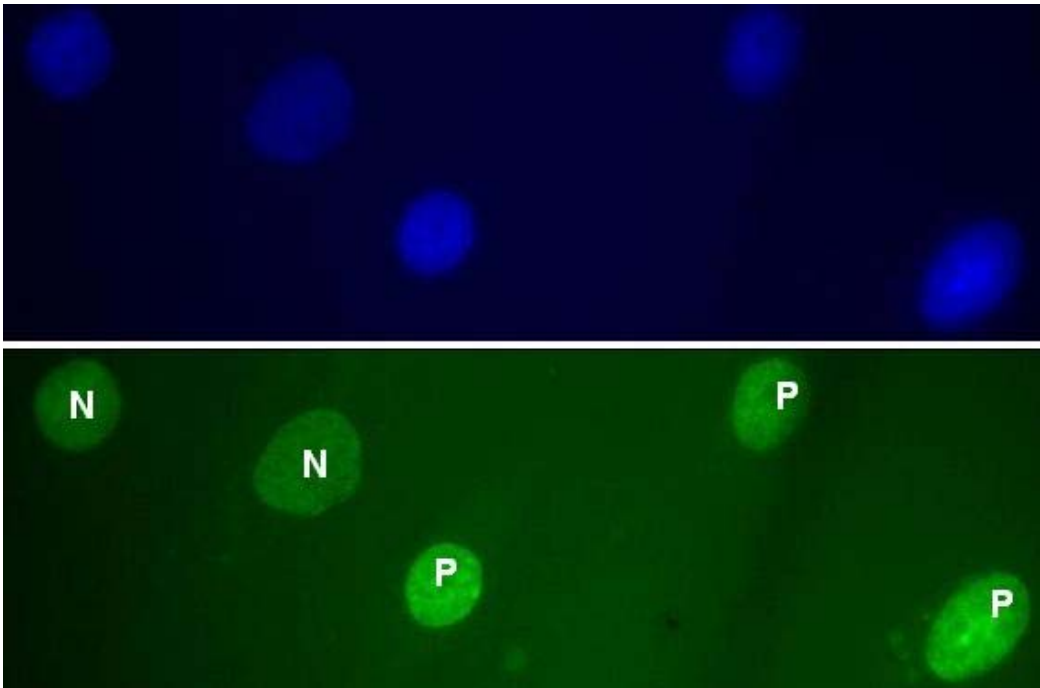
As figuras abaixo ilustram as células positivas (=P) e negativas (=N) para a contagem dos núcleos do teste de proliferação celular (Figura 8) e teste de TUNEL (Figura 9).

FIGURA 8: Padrão de células positivas e negativas para o teste de proliferação



NOTA: As células positivas (=P) e negativas (=N) são analisadas com filtro para FITC e objetiva de 40 x.

FIGURA 9: Padrão de células positivas e negativas para o teste de TUNEL



NOTA: As células positivas (=P) e negativas (=N) são analisadas com filtro FITC e objetiva de 40 x.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio do teste para diferenças entre as proporções das médias do número de células fluorescentes/campo de grande aumento, após a regressão linear múltipla (por meio do *software* R, versão 2.40). O nível mínimo de significância para diferenças entre as médias foi de $p < 0,05$.

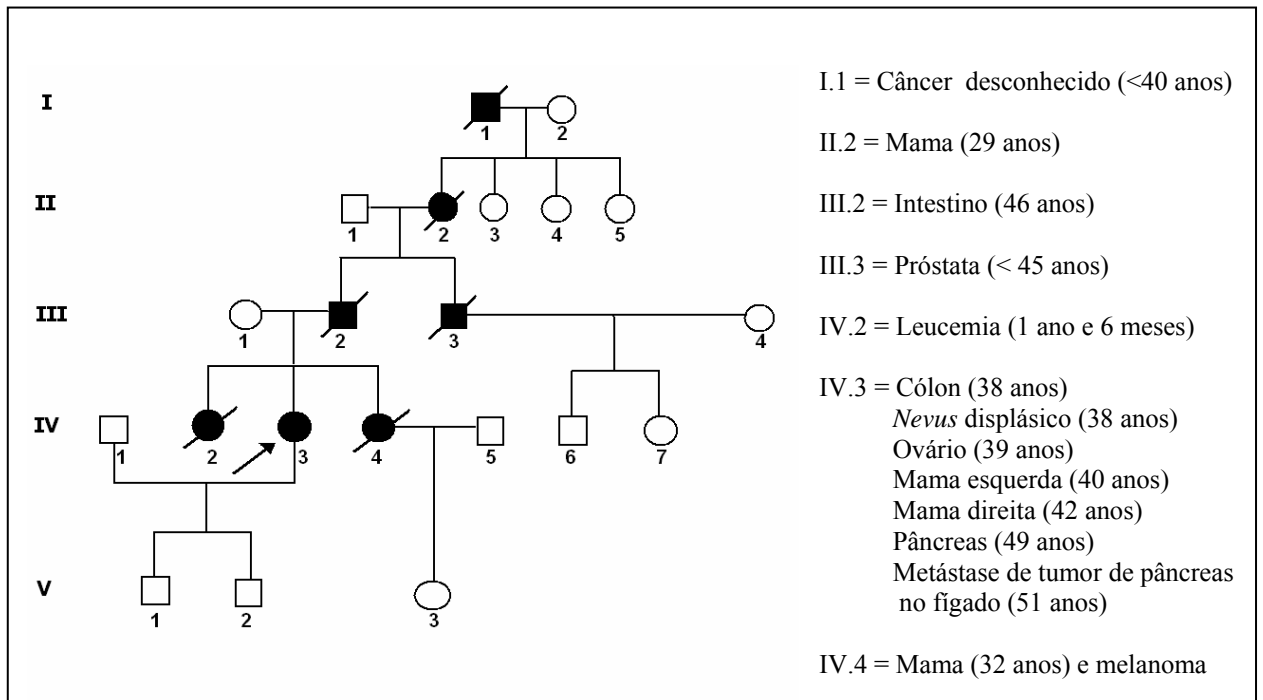
5 RESULTADOS

5.1 HEREDOGRAMA E HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA

Paciente do sexo feminino, branca, natural da região sul do Brasil, atualmente com 51 anos, foi inicialmente diagnosticada com adenocarcinoma de cólon (T₃N₀M₀), que foi totalmente ressecado, e se submeteu a uma biópsia excisional de *nevus* displásico no quadril direito também há 13 anos. Há 12 anos foi diagnosticado um novo tumor primário, classificado como adenocarcinoma mucinoso de ovário (estádio 3), sendo submetida a uma salpingooforectomia bilateral e histerectomia. No ano seguinte, foi constatado um carcinoma ductal *in situ* na mama esquerda, que apesar de tratamento com tamoxifeno por dois anos, este reapareceu, sendo encaminhada para quadrantectomia de mama esquerda e sessões de radioterapia. Há cerca de 9 anos teve as mesmas lesões na mama direita, com associação de carcinoma ductal invasivo grau II-III. Foi sugerida a mastectomia completa bilateral preventiva, mas a paciente optou apenas pela realização da quadrantectomia de mama direita com esvaziamento axilar. Há cerca de três anos foi diagnosticado o câncer de pâncreas, sendo submetida a uma ressecção cirúrgica. No presente ano, nova cirurgia de fígado foi realizada, confirmando metástase do tumor de pâncreas.

Como mostra o heredograma (Figura 10), o histórico familiar revelou a presença de diversos parentes do lado paterno com tumores, a maioria com idade igual ou inferior a 46 anos. A irmã mais velha faleceu aos dois anos de idade com leucemia, e a irmã mais nova faleceu com câncer de mama e melanoma aos 31 anos. O pai apresentou câncer de intestino aos 46 anos e o tio paterno apresentou câncer de próstata aos 46 anos, ambos falecidos um ano após o diagnóstico. A avó paterna também faleceu com câncer de mama aos 29 anos.

FIGURA 10: Heredograma



5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE *P53*

5.2.1 Probanda

A análise do seqüenciamento do gene *TPp53* da probanda revelou uma mudança de G para A (TGG → TAG) no nucleotídeo 13116, resultando num códon de parada no códon 146 (13116 G>A, trp146ter) localizado no éxon 5 do gene *TP53*.

Além da mutação, foram encontrados cinco polimorfismos na probanda, todos heterozigotos:

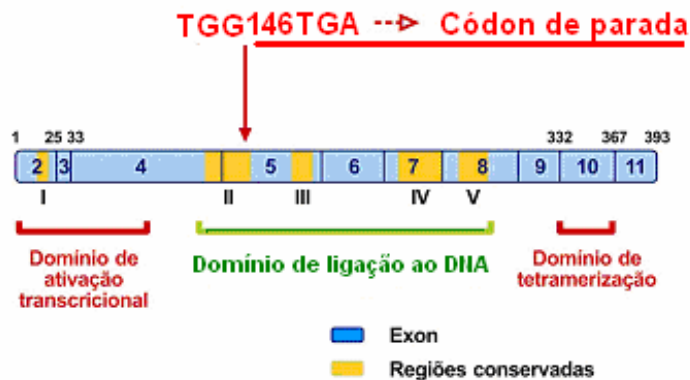
- Intrônicos - IVS02+37 G>C; IVS03+40 in 16 bp; IVS10+60T>C, IVS10-221G>A
- No exon 04 - 12139 G>C; arg72pro (um alelo com prolina na posição 72).

5.2.2 Familiares da probanda

Todos os membros da quinta geração, e mais os indivíduos III.1 e IV.1 foram examinados e não apresentaram a mutação *TP53* trp146ter. Destes parentes,

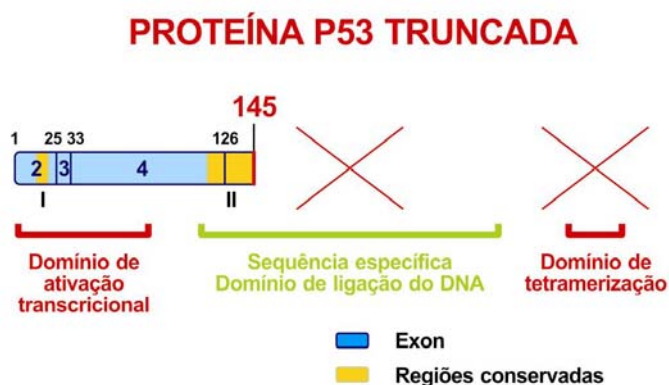
apenas a mãe da probanda teve gene do p53 totalmente seqüenciado, sendo que os dados continuam em análise.

FIGURA 11: A proteína p53 e a localização da mutação



Esta alteração genética criou uma mudança *nonsense* no códon 146 resultando numa proteína P53 truncada, com apenas 145 aminoácidos. A probanda é heterozigota para esta alteração, permanecendo uma cópia “normal” do gene *P53*. Além desta haploinsuficiência, o alelo restante que codifica uma proteína inteira possui o polimorfismo arginina→prolina que talvez impossibilite de chamá-lo de alelo normal. A comprovação da localização deste polimorfismo arginina→prolina, separado do alelo da mutação 146TGA poderá ser deduzida a partir dos resultados do seqüenciamento da mãe da probanda.

FIGURA 12: A proteína p53 truncada



5.3 ESTUDO *IN VITRO* COM CULTURAS DE FIBROBLASTOS

5.3.1 Proliferação celular em resposta ao teste da radiação

O ritmo de proliferação celular foi avaliado de acordo com o padrão já conhecido e descrito anteriormente. As fotomicrografias da figura 13 mostram fibroblastos controle e da probanda, antes e após a radiação, algumas apresentando padrões de incorporação de BrdU (verde mais forte). A coloração com verde mais fraco (sem incorporação de BrdU) é não específica, talvez por ligação inespecífica do anticorpo anti-BrdU aos sítios onde não existe DNA. Observa-se que a radiação reduziu drasticamente a proliferação celular no grupo controle, como mostra a fotomicrografia (Figura 13, Ci).

Entretanto, nota-se que não ocorreu o mesmo comportamento nos fibroblastos da probanda (figura 13, Pi), indicando uma falha no bloqueio do ciclo celular que seria o esperado após a radiação.

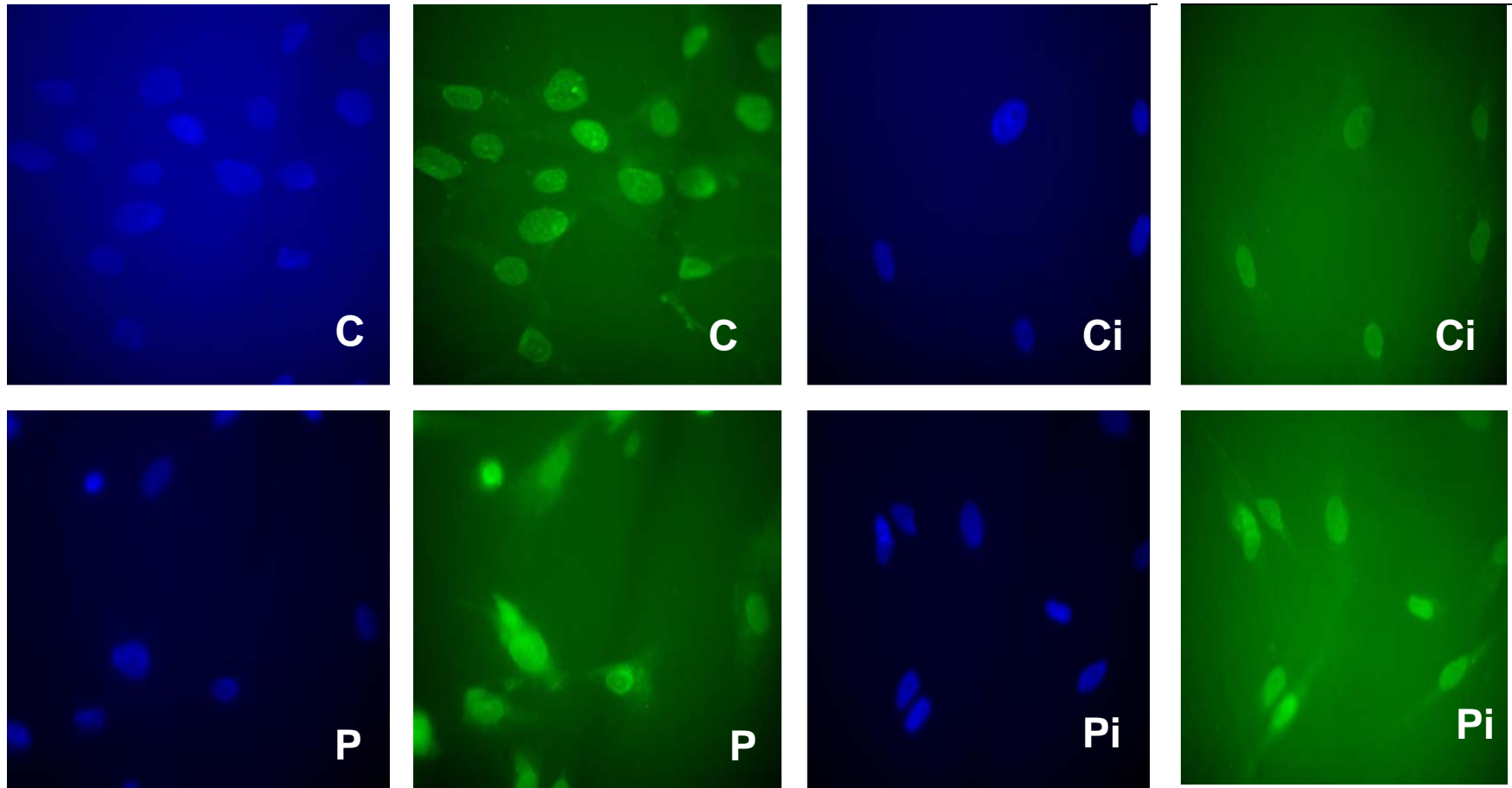
A proporção de proliferação de fibroblastos irradiados do grupo controle (de doador aparentemente normal e sem história familiar de SLF) foi inferior ao de fibroblastos da probanda ($p < 0,05$), indicando um defeito na parada do ciclo em G1 (Figura 14).

5.3.2 Morte celular em resposta ao teste da radiação

A frequência de morte celular após a radiação depende da carga total de radiação e do tempo transcorrido para análise. No presente estudo, a carga de 5 Gy de radiação ionizante (raios γ) foi proposta como modelo de agente genotóxico (WILLIAMS et al., 1997). O padrão de células antes e depois da irradiação, indicativo de morte celular (verde fluorescente com intensidade moderada ou forte), foi apresentado na Figura 15.

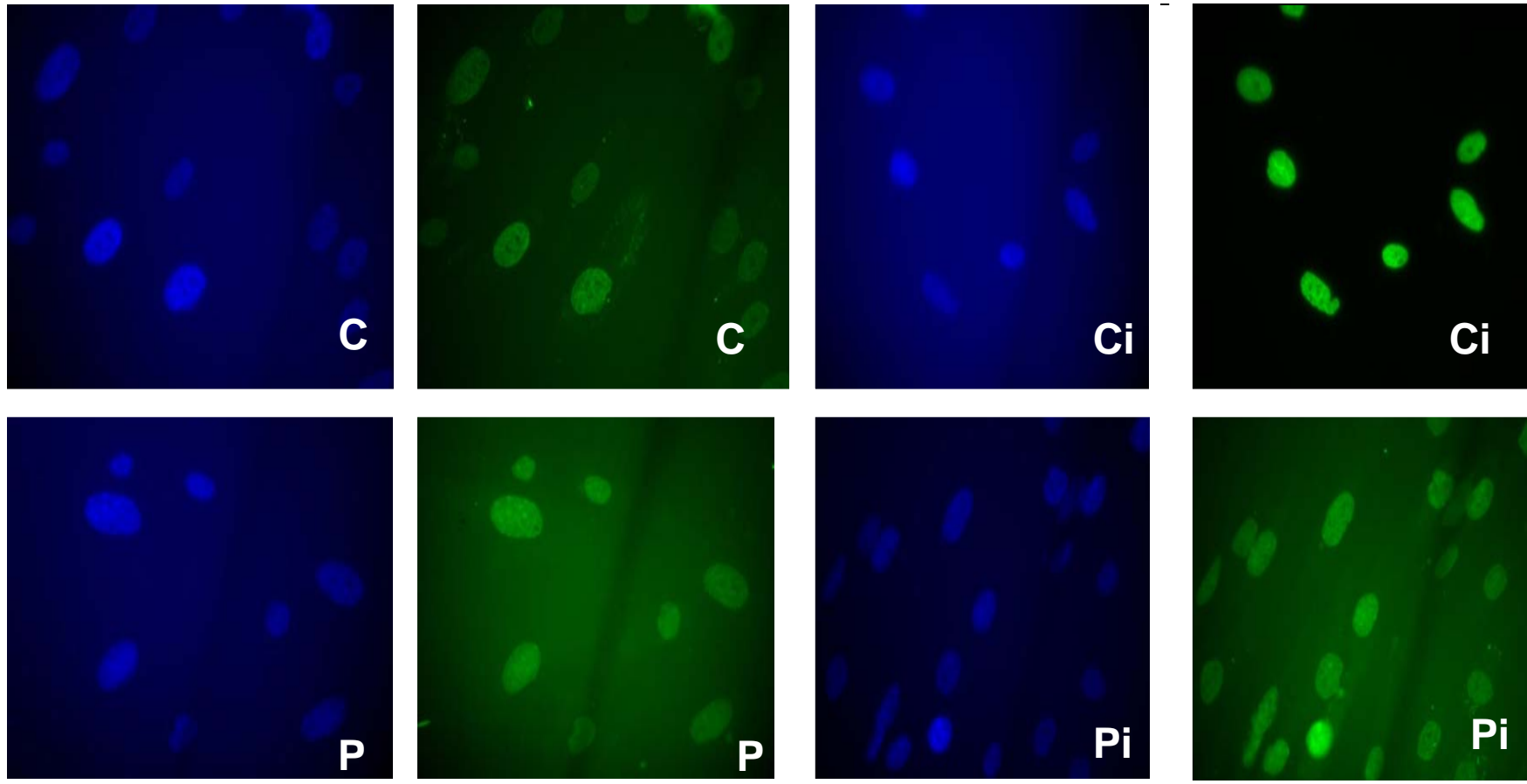
Notou-se que este número de células com morte celular programada foi maior ($p < 0,05$) em células controles irradiadas do que nos demais grupos (Figura 16).

FIGURA 13 – Proliferação de fibroblastos não irradiados e irradiados



Fotos de células em azul (coloração com DAPI visualizas com filtro para excitação no comprimento de UV) e em verde (FITC=fluoresceína visualizas com filtro com excitação na faixa do azul, 450-490). Células não irradiadas (C= controle; P= probanda) e irradiadas (Ci= controle; Pi= probanda). As células foram irradiadas com 5 Gy e analisadas 6 horas depois. As células com verde intenso indicam incorporação de BrdU reconhecido com anticorpo anti-BrdU marcado com FITC (indicativo de proliferação).

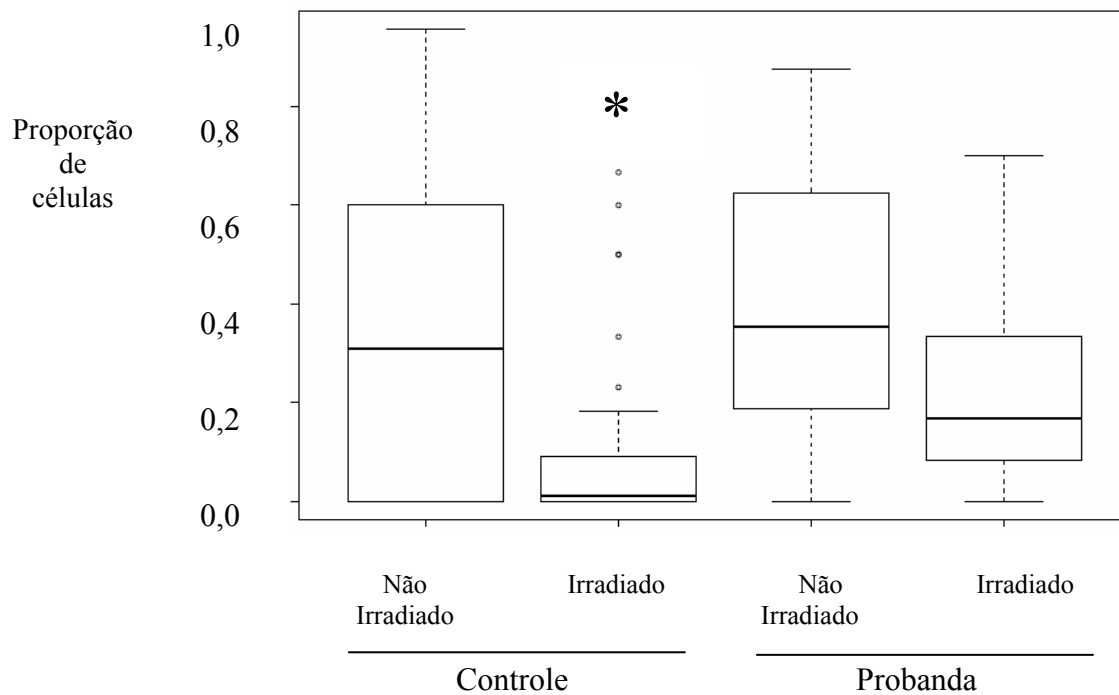
FIGURA 15 – Apoptose em fibroblastos não irradiados e irradiados



Fotos de células em azul (marcadas com DAPI) e em verde (marcadas com FITC=fluoresceína). Células não irradiadas (C= controle; P= probanda) e irradiadas (Ci= controle; Pi= probanda). As células foram irradiadas com 5 Gy e analisadas 6 horas depois. As células com verde intenso indicam quebra do DNA (indicativo de apoptose). A quebra do DNA é indicada pelo verde brilhante mais forte, indicativo da presença de nucleotídeos marcados com FITC ligados ao terminal de DNA genômico por meio da enzima terminal deoxinucleotidil transferase.

FIGURA 14. Proporções de células (média \pm DP) que proliferaram.

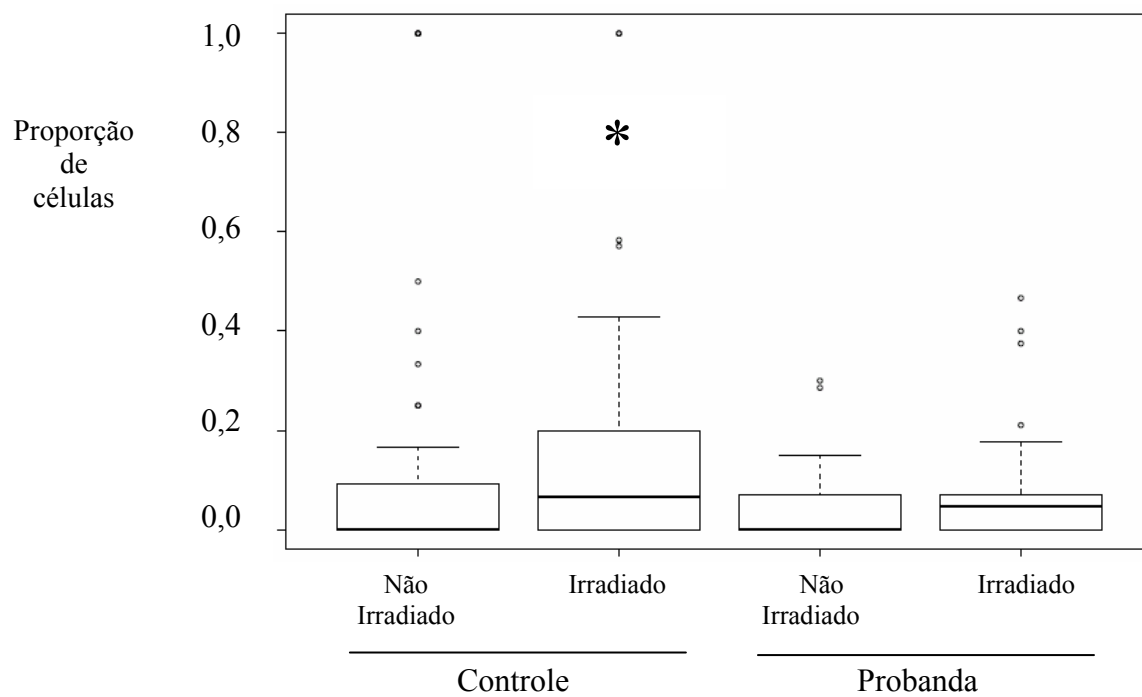
A tendência de cada média está indicada pela linha horizontal em negrito nas barras (box plot).



* Estatisticamente inferior aos demais grupos ($p < 0,05$)

FIGURA 16. Proporções de células (média \pm DP) que sofreram apoptose.

A tendência de cada média está indicada pela linha horizontal em negrito nas barras (box plot).



* Estatisticamente superior aos demais grupos ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma rara síndrome familiar de câncer (CHOMPRET et al., 2001). Possui característica de transmissão num padrão autossômico dominante com alta penetrância, sendo que 90% dos portadores desenvolvem câncer até a sétima década de vida (LUSTBADER et al., 1992).

A análise do histórico familiar e o heredograma (Figura 10) revelam que o caso apresentado é de LFS, visto que se enquadra com os parâmetros definidos por Li e Fraumeni (1988), ou seja: a probanda teve o seu primeiro diagnóstico de câncer de cólon com 37 anos, a irmã mais velha foi acometida com leucemia com idade inferior a dois anos e a irmã mais nova foi diagnosticada com câncer de mama aos 30 anos de vida.

Os principais tumores encontrados nos indivíduos com LFS são: sarcomas de partes moles, osteossarcoma, câncer de mama, tumores cerebrais, leucemia e carcinomas adreno-corticais (LI et al., 1988). No caso apresentado, a probanda desenvolveu o câncer na mama esquerda e posteriormente na mama direita. Tumores de mama são os mais freqüentes quando comparados com outros tumores presentes nas famílias com a SLF (HERBERT et al., 2001). Cerca de 77% dos indivíduos com LFS clássica apresentam mutação germinativa no gene supressor tumoral *TP53*, e apenas cerca de 40% quando se trata de LFS não clássica, chamada de LFS-símile, por não se enquadrar exatamente na faixa etária ou tipo de câncer (VARLEY;MCGOWN et al., 1997).

Neste trabalho relatou-se o encontro de uma mutação herdada no códon 146 do gene *TP53* com LFS. Esta mutação germinativa no códon 146 do gene foi relatado pela primeira vez por Pinto e colaboradores (2002) em estudo restrito à descrição da mutação. A maioria das mutações encontradas no gene *TP53* é do tipo *missense*, ocorrendo a troca de aminoácidos (SOUSSI,BEROUD, 2001), mas no caso apresentado, a mutação é classificada como *non sense*, gerando uma proteína p53 truncada germinativa com 145 aminoácidos.

O que motivou a realização do presente estudo foi o aparecimento de vários tumores com intervalo de 1 a 4 anos na probanda, totalizando cinco tumores e uma recidiva fora do comum do tumor de pâncreas no fígado, dois anos após a ressecção completa. Este evolução com múltiplos tumores em pessoa com LFS já foi descrito

em várias famílias com LFS (HISADA et al., 1998) e há o relato na literatura de indivíduo com até dezessete tumores primários separados, em parte devido ao fato de ter acumulado danos genéticos causados por agentes ambientais ao longo dos seus 60 anos de vida (NUTTING et al., 2000). Entretanto, sempre existiram dúvidas quanto ao mecanismo levando ao câncer, principalmente com relação à possibilidade de associação de mutações diferentes em ambos os alelos do *P53*, o que nos levou a postular a hipótese de que a probanda poderia ter mutação em ambos alelos de *P53*, ou a combinação de um alelo com mutação ou polimorfismo, não pesquisados ou encontrados por Pinto e colaboradores (2002).

Baseado na hipótese de Knudson (1984), para genes recessivos como o *P53*, deveria acontecer um segundo evento somático (perda do alelo normal) para aumentar os riscos de câncer na ausência do p53. Como segunda hipótese, o segundo evento poderia ser não-obrigatório, porém implicaria que o segundo alelo também fosse ineficiente ou ter uma resposta atenuada (incompleta) após uma lesão celular. O fato de um dos alelos ter prolina ocupando o códon 72 foi uma forte evidência em favor da segunda hipótese, ou seja, se este polimorfismo estivesse no alelo considerado como normal. Corroborando com esta explicação, Sjalander e colaboradores já haviam previamente relatado a maior frequência de câncer de mama em pacientes com o alelo 72 prolina (SJALANDER et al., 1996).

Conforme apresentado nesse estudo, havia 2 alelos de *TP53*: um que gera uma proteína truncada no códon 146 com arginina no códon 72 e o segundo alelo que poderia ter prolina na posição 72 (dados continuam em análise). Este alelo com prolina 72 parece não ser eficiente e foi proposto como uma das hipóteses para o surgimento dos cinco tipos diferentes de câncer na probanda.

Para avaliar o perfil de resposta do p53 após uma lesão ao DNA por meio de radiação, foram realizados os testes de proliferação celular (incorporação de BrdU) e apoptose (teste de TUNEL) em cultura de células de fibroblastos obtidos da probanda.

Defeitos nos genes envolvidos nas etapas de controle de ciclo (“*checkpoints*”) são associados às altas taxas de mutação e instabilidade cromossômica, mesmo na aparente ausência de dano ao DNA e na resposta ao estresse do ambiente, (BIGBEE et al., 1989; WEINERT,HARTWELL, 1990; LIVINGSTONE et al., 1992; YIN et al., 1992; WEINERT,HARTWELL, 1993). As células em proliferação respondem à

lesão do DNA induzido por radiação ionizante ou ultra-violeta, agentes alquilantes ou exposição a metabólicos tóxicos nas 3 etapas de controle do ciclo: transições de G1→S ou G2→M, e pela redução na taxa de replicação do DNA a partir dos inicializadores (*replicons*) na fase S (PAINTER, YOUNG, 1980; WEINERT, HARTWELL, 1988; O'CONNOR et al., 1992; KAUFMANN, WILSON, 1994).

A parada no ciclo celular em resposta a uma radiação permite que as células ganhem tempo para reparar o DNA antes da alteração irreversível do genoma durante a replicação do DNA ou segregação mitótica. Este tipo de resposta é estudado com células em meio de cultura para avaliar os genes envolvidos nas etapas de controle do ciclo, e no presente trabalho optou-se pela verificação da parada do ciclo sem especificar o *checkpoint*, avaliando-se a incorporação de bromo-deoxiuridina (BrdU, que substitui a timina) e depois o DNA que possui BrdU é reconhecido pelo anticorpo marcado com fluoresceína (FITC). A segunda mais importante função do P53, apoptose, foi estudada pela técnica do TUNEL.

A probanda com LFS do presente estudo foi parcialmente avaliada nos aspectos clínicos (até o aparecimento do 4º tumor da probanda), com identificação do códon 146 de parada da transcrição de um dos alelos do *TP53*, e no encaminhamento para quimioterapia e radioterapia para tratamento de tumor de mama (PINTO et al., 2002).

O presente estudo realizou o seqüenciamento completo do gene do P53 de DNA leucocitário e de fibroblastos obtidos da biópsia de pele da probanda, confirmando a presença do códon de parada, e acrescentou a informação sobre a existência de 5 polimorfismos no gene do *P53*. Também foi registrado que nos últimos 2 anos a paciente teve também câncer de pâncreas que recidivou 2 anos depois no fígado. Atualmente a probanda está clinicamente bem e sem câncer ativo. A seqüência do gene do P53 obtida da probanda poderia talvez ser diferente de outros órgãos, em função de outras mutações poderem ter acontecido em algum dos órgãos, particularmente após a radioterapia no ano 2000 (que não deveria ter sido realizada).

Na continuidade deste estudo foi realizada investigação completa de fibroblastos da mãe da probanda (seqüenciamento de DNA e proliferação e morte celular em resposta à radiação) com a finalidade de esclarecer se a probanda teria

herdado da mãe o polimorfismo Arg72Pro (um alelo com prolina na posição 72). Como não houve tempo para se concluir as avaliações com DNA e célula da mãe, estes dados não entraram nos resultados desta dissertação e os resultados obtidos com fibroblastos da probanda foram comparados com a resposta de fibroblastos de doador normal sem LFS.

Os efeitos observados no estudo *in vitro* com fibroblastos da probanda foram reavaliados com o seguinte raciocínio: (1) considerando um alelo de *P53* com códon de parada herdado do pai (linhagem de segregação com LFS) e (2) outro alelo de *P53* normal que poderia ou não ser o alelo com o polimorfismo Arg72Pro.

No presente estudo foi observado que após 6 horas da radiação gama (5 Gy) a proliferação nos fibroblastos da probanda foi significativamente maior do que nos fibroblastos de doador sem LFS ($p < 0,05$), ou seja, que os fibroblastos com mutação heterozigota no gene *P53* não conseguem parar o ciclo para reparo de DNA com a mesma eficiência dos fibroblastos normais. Este padrão de resposta foi também obtido e discutido por outros autores para outros tipos de mutações usando metodologia semelhante (tabela 1).

TABELA 1: Respostas e mecanismos propostos em células heterozigotas para mutação no *P53* irradiadas *in vitro*

Autores	Método	Mutação	Resultado	Comentários
(BISCHOF F et al., 1990)	Avaliação do crescimento celular e instabilidade cromossômica	Códon 175 (Arg→His) het Códon 248 (Arg→Trp) het	Fibroblastos SLF escapam da senescência, mantendo a morfologia de células transformadas e continuam proliferando após 35 passagens em cultura.	Fibroblastos humanos e heterozigóticos para o gene <i>TP53</i> (mut/selvagem) apresentam elevada frequência de instabilidade cromossômica, com mudanças estruturais e numéricas.
(MIRZAYANS et al., 1995)	Síntese de DNA pela técnica de incorporação da timidina triciada medida por autoradiografia após radiação (10 Gy) Tempos: 2h, 4h, 7h e 10h	Linhagem com mutação no códon 245 (Gly→Asp) em <i>p53</i> , sem 234, sem <i>c-myc</i> e sem <i>raf-1</i> , porém não excluiu outras mutações em outros genes (2674T) Uma linhagem com mutação no códon 245 herdada + mutação no códon 234 (Ala→Gly) adquirida em cultura, além de mutação em <i>c-myc</i> e possivelmente <i>c-raf-1</i> (2800T) Ou 245 + mut em <i>c-myc</i> e possivelmente <i>c-raf-1</i> (2675T). As mutações <i>c-myc</i> e <i>raf-1</i> são autossômicas dominantes.	Normal e mutados diminuem na 1ª hora, mas após 6-8 horas o mutado mantém alto nível de incorporação e normal diminui. Normal e mutados diminuem na 1ª hora, mas após 6-8 horas o mutado mantém nível mais elevado do que as linhagens apenas com 245.	A presença de mutação no códon 245 (recessiva) foi suficiente para ter falha na inibição da síntese de DNA, porém os autores não descartam a possibilidade de ter outro tipo de mutação auxiliando no efeito observado após a radiação.
(PAULES et al., 1995)	Microscopia de células que se apresentam com parada em G2 para cálculo do índice mitótico após radiação (3-6 Gy) Tempos: 1h, 2h e 4h	Códon 184 do <i>p53</i> com <i>frameshift</i> heterozigoto e outra linhagem com mutação de ponto no códon 284.	Redução do índice mitótico após 1 hora da radiação. Ou seja: a rápida resposta em G2 depois da radiação é similar ao normal, indicando que o <i>p53</i> selvagem não é necessário para G2 em resposta à radiação.	Foi observada máxima demora na passagem de G2 para mitose em fibroblastos normais, o que foi superior a de pacientes com telangiectasia atáxica. O mesmo efeito não foi observado em fibroblastos de pacientes com LFS (<i>frameshift</i> no códon 184 e <i>missense</i> no 248). Os autores defendem a hipótese de que ao nível de G2 o controle de parada (“ <i>checkpoint</i> ”) é mediado pelo complexo <i>p34^{CDC2}/ciclina B1</i> . O <i>p53</i> não tenha um papel decisivo poucas horas após a radiação.
(WILLIAMS et al., 1996)	Parada em G1 após 16 horas de radiação (6 Gy) (linhagem linfoblastóide)	175 (Arg→His) het 180 (Glu→Lys) het 220 (Tyr→Cys) het 248 (Arg→Gln) het	Parada em G1 similar ao normal. Redução na parada G1, mas se tornou aneuploide em cultura.	Mutação <i>p53</i> het não tem efeito na expressão do <i>p53</i> após radiação e parada em G1/S.

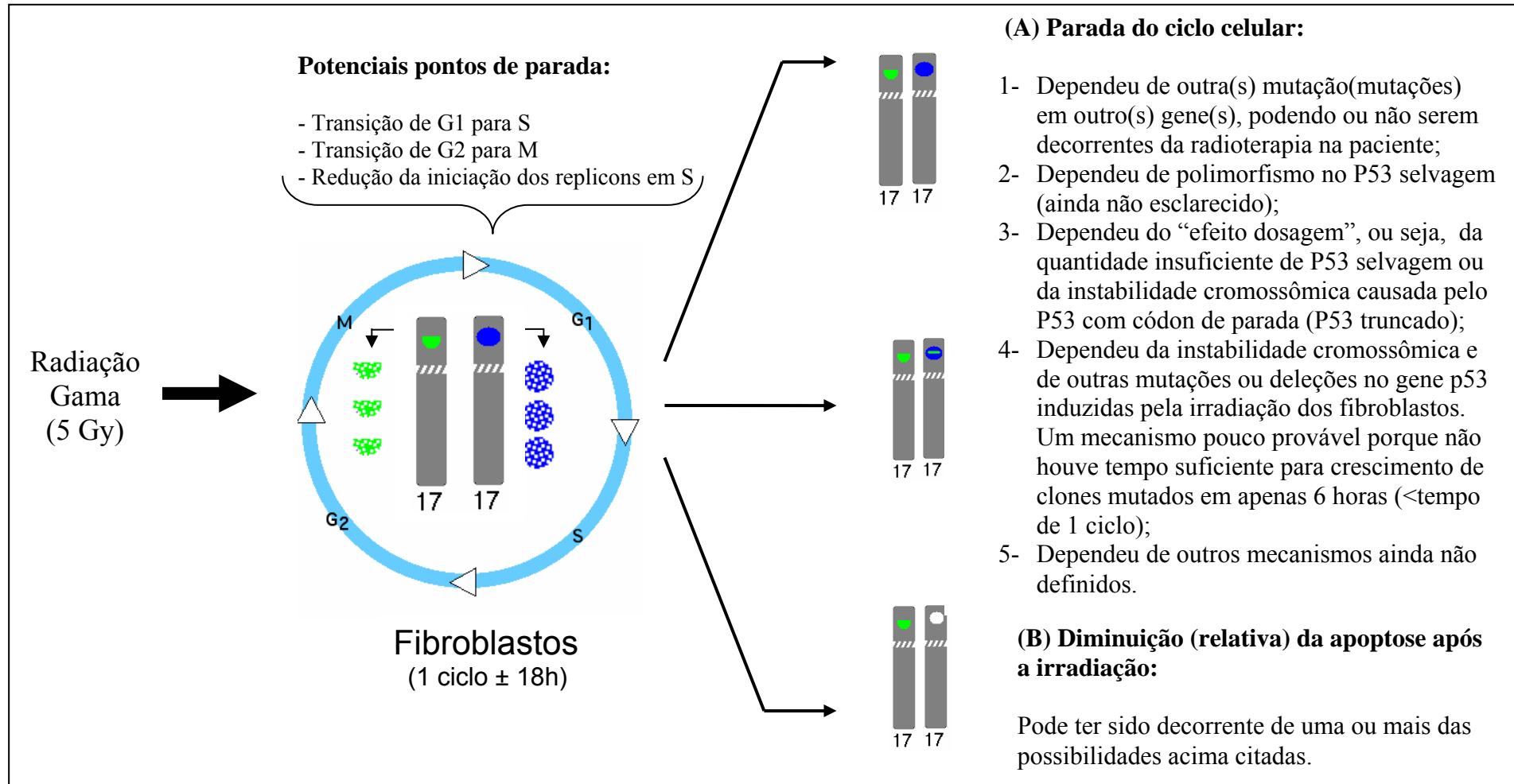
(WILLIA MS et al., 1997)	Síntese de DNA pela técnica de incorporação da timidina triada medida por autoradiografia após γ radiação (4 Gy) Tempos: 20h, 40h, 60h, 80h, 100h e 120 h	Códon 220 (Tyr→Cys) het	Não há diferença na parada transitória. Parada permanente G1 é menor em linhagens com mutação	A redução na parada permanente em G1 em linhagens com mutação explicaria a radiorresistência, atuando como um mecanismo similar à apoptose
		Códon 175 (Arg→His) het		
		Códon 180 (Glu→Lys) het		
		Códon 248 (Arg→Gln) het		
		Códon 248 (Arg→Trp) het		
(BOYLE et al., 1998)	Avaliação da instabilidade cromossômica e resistência à radiação ionizante (3 e 6 Gy)	Códon 248 (Arg→Trp) het	Linhagens com mutação mostraram alta frequência de aberrações cromossômicas estruturais e aneuploidia antes da senescência. Mutações nos códons 248 (Arg→Trp), 175 e 220 foram consideradas radiorresistentes.	Confirmou dados anteriores (Bischoff e col., 1990): fibroblastos de LFS e heterozigóticos para o gene <i>Tp53</i> (mut/selvagem) apresentam elevada frequência de instabilidade cromossômica após a perda do alelo selvagem.
		Códon 248 (Arg→Gln) het		
		Códon 175 (Arg→His) het		
		Códon 220 (Tyr→Cys) het		
		Códon 180 (Glu→Lys) het		
(BOYLE et al., 1999)	Síntese de DNA pela técnica de incorporação BrdU (0,5Gy e 4 Gy) (17h) e timidina H após γ radiação (4 Gy) (60h e 120h)	Códon 248 (Arg→Trp) het	A redução na parada em G1, de maneira transitória e permanente, foi demonstrada em linhagens com mutação <i>missense</i> e mutação <i>stop códon</i> heterozigotas. A mutação <i>missense</i> no códon 180 mostrou resposta marginal. Já as mutações <i>splice site</i> não tiveram alteração.	Provavelmente a redução na parada em G1 não foi por diminuição na quantidade de proteína total (“efeito dosagem”), porque a linhagem com mutação no <i>splice site</i> claramente teve diminuição na quantidade de p53, mas não afetou a proliferação celular.
		Códon 248 (Arg→Gln) het		
		Códon 175 (Arg→His) het		
		Códon 220 (Tyr→Cys) het		
		Códon 180 (Glu→Lys) het		
		Códon 209 (Arg→stop) het		
		Códon 152 (Pro→Leu) het		
		Códon 344 (Leu→Pro)		
Códon 337 (Arg→Cys)				
(BOYLE et al., 2002)	Avaliação de alterações cromossômicas estruturais e numéricas após γ radiação (3 e 6 Gy) Tempo: após 6 passagens/duplicações de população	Códon 248 (Arg→Trp) (163MA) het	Elevada proporção de aberrações cromossômicas não relacionadas com a perda do alelo selvagem, provavelmente pode ter adquirido outro tipo de mutação (sem ser no p53) que FHI não adquiriu.	Admitem que a perda do alelo selvagem não seja sempre o motivo da instabilidade como eles mesmos reportaram anteriormente (Boyle et al., 1998). Fibroblastos humanos de LFS, heterozigóticos para o gene <i>Tp53</i> (mut/selvagem), em resposta à radiação, apresentam mais instabilidade cromossômica do que fibroblastos de camundongos com <i>P53</i> (-/selvagem) porque provavelmente devem existir outras mutações nos fibroblastos humanos.
		Códon 248 (Arg→Trp) het (FHI) de paciente diferente de 163MA	Relativamente estável	
		Códon 175 (Arg→His) het	Relativamente estável.	
		Códon 180 (Glu→Lys) het	Relativamente estável.	
		Códon 209 (Arg→stop) het	Elevada proporção de aberrações cromossômicas, e hiperplodia com 6 Gy (p<0,05) não relacionadas com a perda do alelo selvagem.	
		Códon 152 (Pro→Leu) het	Relativamente estável.	

A avaliação da mutação no *TP53* foi também feita pela técnica do TUNEL que avalia a apoptose induzida pela radiação gama. Apesar das limitações desta técnica (menos acurada do que a técnica de proliferação com a incorporação de BrdU), observou-se também que a apoptose foi inferior nos fibroblastos mutados.

O desenvolvimento do câncer é um processo multifatorial, necessitando de alterações genéticas que comprometam o controle de ciclo celular (NOWELL et al., 1976), e neste estudo, ao se estudar o comportamento dos fibroblastos da probanda com relação à proliferação e à apoptose após a radiação (período curto de 6 horas), pode-se ter uma noção de uma parte do processo multifatorial. A diferença é que, enquanto no aparecimento espontâneo do câncer na probanda, admite-se que houve perda do alelo *P53* selvagem (por mutação disfuncional ou por deleção completa), seguindo a descrição do duplo golpe de Knudson (1984), ou seja, um por herança e outro por evento somático, gerando um clone sem função do *P53*, nos estudos *in vitro* várias possibilidades de mecanismos existem apresentadas por outros autores e discutidas na tabela 1.

No presente estudo, partiu-se da observação de uma linhagem de fibroblastos aparentemente com o mesmo genoma (na passagem 2, P2), que ao serem irradiados, poderiam ter danos de diversos tipos em várias partes do genoma, atingindo alguns dos milhões de fibroblastos em cultura, com pouca chance de ter perda do alelo selvagem do *P53* abrangendo todos os fibroblastos (que se encontram em etapas diferentes do ciclo, portanto com sensibilidade variável à radiação). O que já estava instalado no genoma dos fibroblastos com *P53* truncado/selvagem e mais a lesão provocada pela radiação levaria a uma instabilidade cromossômica (LIVINGSTONE et al., 1992; YIN et al., 1992; HARVEY et al., 1995), que poderiam resultar em alterações de funções de outros genes sem necessariamente ter havido mutações em determinados tipos de genes relacionados com o controle direto e indireto do ciclo celular (comentários na Figura 17), sugerindo que há mais que uma via ou múltiplos componentes na resposta à radiação à progressão da parada do ciclo celular.

FIGURA 17. Mecanismos propostos para redução da proliferação e apoptose em fibroblastos heterozigóticos para *p53*



Todas as células que se encontram em G1 podem passar para fase seguinte (incorporar BrdU), independente de qualquer disfunção de P53. Parte da população de fibroblastos que se encontra nas fases M e G2 terão tempo (em 6 horas) de sofrerem inibição por parte do P53 e outros inibidores. A indução de apoptose pode acontecer em função do grau de lesão do irreparável do DNA causada pela irradiação.

● → P53 Selvagem; ● → P53 Truncado; ☐ → P53 deletado e ● → P53 mutado são hipotéticos.

A resistência à radiação ionizante (não existe a parada em G1 ou G2 para serem reparadas), que acontece nos fibroblastos de pacientes com LSF apresentando mutações no gene *P53*, (tabela 1) é aqui apresentada não apenas como condição que predispõe ao câncer, mas também como meio pelo qual células do próprio câncer podem deixar de reparar danos em outros genes e sempre estarem seguindo para o ciclo seguinte e acumulando mutações.

Entretanto, segundo Schwartz e colaboradores (1995, 1997) essas células com mais danos cromossômicos seriam seletivamente eliminadas por apoptose na linhagem com *P53* selvagem. A hipótese de Schwartz, se estendida para células com diminuição na parada permanente em G1, poderia prever que fibroblastos de pacientes com LFS com mutação no *P53* poderiam exibir mais danos cromossômicos na sua primeira mitose depois de radiação em G1 que fibroblastos normais.

Vale lembrar que somente cerca de 77% das famílias com SLF e 40% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni símile (LFL) são portadoras de mutação herdada no TP53 (revisado por VARLEY, 2003), e fibroblastos de casos de LFS sem mutação no *P53* não tem defeito na parada em G1 depois da radiação (BOYLE et al., 1999; BOYLE et al., 2001).

Para se perceber uma diferença na resposta à radiação foi proposto que seria mais sensível aplicando uma carga pequena de radiação gama, caso contrário o teste poderia ser erroneamente considerado como normal para determinado grupo de fibroblastos com mutação heterozigota no *P53* recebendo carga grande de radiação. Segundo Boyle et al (1999), quando um teste não acusar diferença em relação ao controle, recomenda-se a exposição a doses menores que 4 Gy (BOYLE et al., 1999).

Quando se trata de células aparentemente com fenótipo normal como fibroblastos obtidos de tecido normal, a instabilidade cromossômica poderia existir levando a outras alterações, mas seriam precisos outros eventos até culminar com a formação do câncer. Os mecanismos que poderiam existir nesta etapa de instabilidade cromossômica associada com mutação no *P53* e formação do tumor são discutidos a seguir nos modelos de estudos *in vitro*. É preciso considerar que o seqüenciamento do DNA de fibroblastos sadios de doadores de SLF não acuse

mutações no *P53* e outros genes, mas é possível que culturas de fibroblastos derivados desses doadores poderiam adquirir mutação *in vitro* (VARLEY;EVANS et al., 1997).

Várias mutações no *TP53* heterozigotas em fibroblastos foram testadas quanto à habilidade de pararem a proliferação celular, demonstrado pela técnica de incorporação de BrdU, porém alguns tipos de mutação se comportaram de maneira semelhante às células normais (tabela 1).

Numa linhagem resistente à radiação ionizante, os produtos dos genes com certos tipos de mutação e selvagem do p53, mesmo presentes em quantidades iguais (mutante e selvagem), combinam-se para formar uma proteína tetramérica híbrida com função diminuída ou ausente (MIRZAYANS et al., 1995). No presente estudo, esta possibilidade é impossível de acontecer porque falta toda parte da proteína monomérica do P53 mutado além do códon 145, que é a parte responsável pela ligação dos monômeros e dímeros formando os tetrâmeros.

A associação de mutações no *TP53* em linhagem germinativa de pacientes com LFS com mutações em outros genes pode passar despercebida, como foi reportado por Mirzayans et al. (95) a partir de observações iniciais de Chang e colaboradores (1987), mostrando linhagem de fibroblasto de membros de SLF exibindo elevada expressão de c-myc, uma situação com maior predisposição ao tumor. O fato de camundongos com *knockout* para o gene do *P53* com linhagem germinativa heterozigota (selvagem/-) reagirem normalmente à radiação gama foi atribuída à ausência de outras mutações ou porque a instabilidade cromossômica não ocorre da mesma forma para células com mutações do tipo *missense* (BOYLE et al., 2002).

A possibilidade que outros *checkpoints* do ciclo celular podem estar comprometidos em famílias sem mutação no *TP53* está sob investigação e recentemente uma mutação germinativa no *hChk2* foi encontrada em uma família como dados não publicados e citados por Boyle et al., (1999). Assim, não podemos detectar fenótipos anormais em fibroblastos associados com essa mutação (BOYLE et al., 2000).

A possibilidade dos fibroblastos do presente estudo terem o alelo selvagem com o polimorfismo no códon 72 (Arg→Pro) pode ser explorada mais tarde, se é que este tipo de polimorfismo realmente tornaria menos funcional o P53, uma suposição

bastante polêmica e com resultados muitos contraditórios entre os vários grupos de pesquisadores (tabela 2).

TABELA 2: - Os diferentes achados em relação ao papel do polimorfismo 72Arg ou 72Pro

(THOMAS et al., 1999) In vitro	Arginina suprime efetivamente a transformação celular.
(DUMONT et al., 2003) In vitro	Arginina mais rápida e eficiente para produzir apoptose.
(BERGAMASCHI et al., 2003) In vitro	Arginina é resistente a citotóxicos. Câncer de cabeça e pescoço apresenta resposta diminuída à quimioterapia e pequena taxa de sobrevida.
(ZHANG et al., 2004) 102 casos	Sem associação com sobrevida nos casos de adenocarcinoma gástrico avançado.
(SCHNEIDER-STOCK et al., 2004) 61 casos de câncer colorretal e 28 casos com metatástase hepática	Arginina tem potencial maligno para tumor colorretal com metástase hepática.
(BECKMAN et al., 1994)	Maior frequência de prolina em população nigeriana quando comparado com suecos.
(OLIVIER et al., 2002)	Arginina: presente em populações da Europa Ocidental, Japão e Américas do Norte e do Sul.
(STOREY et al., 1998) In vitro	Arginina/arginina têm risco aumentado para câncer cervical associado a HPV16.
(MAKNI et al., 2000); (KLUG et al., 2001; KOUSHIK et al., 2005)	Não encontraram uma correlação de polimorfismo no códon 72 com HPV16.
(FAN et al., 2000) 482 casos e 510 controles	Arginina/prolina associado com câncer de pulmão.
(KAWAJIRI et al., 1993) 328 casos e 347 controles	Prolina/prolina foi associado com câncer de pulmão.
(WU et al., 2002) 635 casos e 635 controles	Prolina/prolina foi associado com câncer de pulmão.
(MATAKIDOU et al., 2003)	Metanálise de 13 estudos com câncer de pulmão não chegou num consenso sobre a influência do polimorfismo nesta patologia.
(SJALANDER et al., 1996) 177 casos	Prolina pode estar funcionalmente relacionada com baixa malignidade em câncer de mama.
(GOODE et al., 2002) 2078 casos	Não houve diferença estatisticamente significativa em análises multivariadas para a associação com sobrevida de câncer de mama em inglesas.
(MABROUK et al., 2003) Bexiga= 47 casos e 34 controles Mama= 30 casos e 49 controles	Sem evidência de polimorfismo relacionado a risco de câncer de bexiga e mama na população tunisiana.
(BUYRU et al., 2003) 115 casos e 76 controles	Arginina/arginina prevalece em câncer de mama em turcas.
(HUANG et al., 2003) 200 casos e 282 controles	Prolina/prolina prevalece em câncer de mama em japonesas.

(OHAYON et al., 2005) 132 casos e 167 controles	Arginina/arginina está associado com aumento estatisticamente significativo de câncer de mama em mulheres judias de alto risco.
(BOUGEARD et al., 2006) 61 portadores de mutação P53 germinativa com SLF	Arginina em indivíduos com SLF e variação MDM2 SNP309 pode estar relacionado com início precoce da formação do tumor.

Linhagem linfoblástica de SLF com mutação heterozigota no p53 reage de maneira normal, parando o ciclo em G1 da mesma forma que células sem mutação (LALLE et al., 1995; WILLIAMS et al., 1996; WILLIAMS et al., 1997; VARLEY, 2003). Os autores sugerem, entre outras possibilidades, que esta linhagem poderia ser resistente ao *TP53* mutado. Para demonstrar que esta situação não tem relação com a mutação, outros estudos com os mesmos tipos de mutação em fibroblastos (códon 175 Arg→His; códon 220 Tir→ Cis) e utilizando a técnica de incorporação de BrdU encontraram redução da proliferação celular (BOYLE et al., 1999). Dependendo do tipo celular, defeito na parada permanente em G1 ou a apoptose podem significativamente contribuir para a predisposição ao câncer em SLF (WILLIAMS et al., 1997), e seria o principal motivo para os tipos mais comuns de cânceres e menor prevalência de outros tipos na LFS.

Uma possível explicação para a heterogeneidade em estabilidade em cromossômos entre linhagens de células SLF é que somente certas mutações em *TP53* conferem instabilidade em heterozigotos e que a instabilidade cromossômica é o maior mecanismo de predisposição ao câncer em pacientes com a SLF (BOYLE et al., 2002).

7 CONCLUSÃO

A realização deste projeto de pesquisa permitiu que fossem obtidas as seguintes conclusões abaixo relacionadas:

1. Foi caracterizado um caso de Síndrome de Li-Fraumeni evidenciado pelo histórico familiar e heredograma.
2. Foi identificada na probanda uma mudança *nonsense*, com troca de G para A (TGG → TAG) no nucleotídeo 13116, resultando num sinal de parada no códon 146 (13116 G>A, trp146ter) no éxon 5 do gene *TP53*, que sintetiza uma proteína p53 truncada. Foram identificados cinco polimorfismos, todos heterozigotos: Intronic: IVS02+37 G>C; IVS03+40 in 16 bp; IVS10+60T>C, IVS10-221G>A; Exon 04: 12139 G>C; arg72pro (um alelo com prolina na posição 72, e arginina na posição 72 do alelo truncado).
3. A proliferação celular foi menos bloqueada e a apoptose menos acentuada nos fibroblastos da probanda após a lesão do DNA, indicando disfunção do P53 da probanda, provavelmente causada pela instabilidade cromossômica e, como possibilidade adicional mais remota, talvez a presença do polimorfismo 72Pro no alelo selvagem (investigação ainda em andamento).

REFERÊNCIAS

- AMERICAN society of clinical oncology policy statement update: Genetic testing for cancer susceptibility. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 12, p. 2397-2406, 2003.
- AAS, T., et al. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nat Med**, v. 2, n. 7, p. 811-814, 1996.
- ACHATZ, M. I. e HAINAUT, P. Tp53 gene and li-fraumeni syndrome. **Applied Cancer Research**, v. 25, n. 2, p. 51-27, 2005.
- AMUNDSON, S. A., et al. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: Putting on the brakes after genotoxic stress. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3287-3299, 1998.
- ANTONSSON, B., et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 15, p. 11615-11623, 2001.
- AVIGAD, S., et al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. **Oncogene**, v. 14, n. 13, p. 1541-1545, 1997.
- BACHINSKI, L. L., et al. Genetic mapping of a third li-fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. **Cancer Research**, v. 65, n. 2, p. 427-431, 2005.
- BAREL, D., et al. A novel germ-line mutation in the noncoding region of the p53 gene in a li-fraumeni family. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 103, n. 1, p. 1-6, 1998.
- BARLOW, J. W., et al. Germ line bax alterations are infrequent in li-fraumeni syndrome. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 8, p. 1403-1406, 2004.
- BECKMAN, G., et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum Hered**, v. 44, n. 5, p. 266-270, 1994.
- BELL, D. W., et al. Heterozygous germ line hchk2 mutations in li-fraumeni syndrome. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2528-2531, 1999.
- BERGAMASCHI, D., et al. P53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 387-402, 2003.
- BERNS, E. M., et al. Complete sequencing of tp53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. **Cancer Res**, v. 60, n. 8, p. 2155-2162, 2000.
- BIGBEE, W. L., et al. Evidence for an elevated frequency of in vivo somatic cell mutations in ataxia telangiectasia. **Am J Hum Genet**, v. 44, n. 3, p. 402-408, 1989.
- BIRCH, J. M., et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 li-fraumeni families. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1298-1304, 1994.

BISCHOFF, F. Z., et al. Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with li-fraumeni cancer syndrome: Aneuploidy and immortalization. **Cancer Res**, v. 50, n. 24, p. 7979-7984, 1990.

BLANDINO, G., et al. Mutant p53 gain of function: Differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. **Oncogene**, v. 18, n. 2, p. 477-485, 1999.

BOUGEARD, G., et al. Impact of the mdm2 snp309 and p53 arg72pro polymorphism on age of tumour onset in li-fraumeni syndrome. **J Med Genet**, v. 43, n. 6, p. 531-533, 2006.

BOUGEARD, G., et al. Screening for tp53 rearrangements in families with the li-fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the tp53 gene. **Oncogene**, v. 22, n. 6, p. 840-846, 2003.

BOUGEARD, G., et al. Detection of 11 germline inactivating tp53 mutations and absence of tp63 and hchk2 mutations in 17 french families with li-fraumeni or li-fraumeni-like syndrome. **J Med Genet**, v. 38, n. 4, p. 253-257, 2001.

BOYLE, J. M., et al. Radiation-induced g1 arrest is not defective in fibroblasts from li-fraumeni families without tp53 mutations. **Br J Cancer**, v. 79, n. 11-12, p. 1657-1664, 1999.

BOYLE, J. M., et al. Chromosome instability is a predominant trait of fibroblasts from li-fraumeni families. **Br J Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2181-2192, 1998.

BOYLE, J. M., et al. Chromosome instability in fibroblasts derived from li-fraumeni syndrome families without tp53 mutations. **Br J Cancer**, v. 83, n. 9, p. 1136-1138, 2000.

BOYLE, J. M., et al. The relationship between radiation-induced g(1)arrest and chromosome aberrations in li-fraumeni fibroblasts with or without germline tp53 mutations. **Br J Cancer**, v. 85, n. 2, p. 293-296, 2001.

BOYLE, J. M., et al. Delayed chromosome changes in gamma-irradiated normal and li-fraumeni fibroblasts. **Radiat Res**, v. 157, n. 2, p. 158-165, 2002.

BROWN, L. T., et al. Identification of a novel pten intronic deletion in li-fraumeni syndrome and its effect on rna processing. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 123, n. 1, p. 65-68, 2000.

BURT, E. C., et al. Exclusion of the genes cdkn2 and pten as causative gene defects in li-fraumeni syndrome. **Br J Cancer**, v. 80, n. 1-2, p. 9-10, 1999.

BUYRU, N., et al. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncol Rep**, v. 10, n. 3, p. 711-714, 2003.

CADWELL, C. e ZAMBETTI, G. P. Regulators and mediators of the p53 tumor suppressor. **J Cell Biochem Suppl**, v. 30-31, n. p. 43-49, 1998.

CADWELL, C. e ZAMBETTI, G. P. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 15-30, 2001.

CANCER, I. I. A. F. R. O. Functional properties of p53 mutant proteins. Disponível em: <<http://www-p53.iarc.fr/p53MUTfunction.html>.> Acesso em 07 abr. 2006.

CARBONARI, M., et al. Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. **Blood**, v. 83, n. 5, p. 1268-1277, 1994.

CARON DE FROMENTEL, C. e SOUSSI, T. Tp53 tumor suppressor gene: A model for investigating human mutagenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 1992.

CECCARINI, C. e EAGLE, H. Ph as a determinant of celular growth and contact inhibition. **Proc Nat Acad Sci**, v. 68, n. p. 229-233, 1971.

CHANG, E. H., et al. Oncogenes in radioresistant, noncancerous skin fibroblasts from a cancer-prone family. **Science**, v. 237, n. 4818, p. 1036-1039, 1987.

CHAO, C., et al. P53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. **Embo J**, v. 19, n. 18, p. 4967-4975, 2000.

CHO, Y., et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 346-355, 1994.

CHOMPRET, A. The li-fraumeni syndrome. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 75-82, 2002.

CHOMPRET, A., et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **Journal of Medicine Genetics**, v. 38, n. 1, p. 43-47, 2001.

CHOMPRET, A., et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 12, p. 1932-1937, 2000.

CHOU, D., et al. The bax gene maps to the glioma candidate region at 19q13.3, but is not altered in human gliomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 88, n. 2, p. 136-140, 1996.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

DARBY, S. C., et al. Long term mortality after a single treatment course with x-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. **Br J Cancer**, v. 55, n. 2, p. 179-190, 1987.

DI COMO, C. J., et al. P73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 1438-1449, 1999.

DIEGELMANN, R. F., et al. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. **J Cell Physiol**, v. 98, n. 2, p. 341-346, 1979.

DILEONARDO, L., et al. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent g1 arrest and long-term induction of cip1 in normal human fibroblasts. **Genes Dev**, v. 8, n. p. 2540-2551, 1994.

DONALD, S. P., et al. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. **Cancer Res**, v. 61, n. 5, p. 1810-1815, 2001.

DONEHOWER, L. A., et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 215-221, 1992.

DULIC, V., et al. P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1013-1023, 1994.

DUMONT, P., et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 357-365, 2003.

EELES, R. A. Germline mutations in the tp53 gene. **Cancer Surveillance**, v. 25, n. p. 101-124, 1995.

EL-DEIRY, W. S. Regulation of p53 downstream genes. **Semin Cancer Biol**, v. 8, n. 5, p. 345-357, 1998.

EL-DEIRY, W. S., et al. Definition of a consensus binding site for p53. **Nat Genet**, v. 1, n. 1, p. 45-49, 1992.

EMILIEN, G., et al. Impact of genomics on drug discovery and clinical medicine. **Qjm**, v. 93, n. 7, p. 391-423, 2000.

ENG, C., et al. Genetic testing for cancer predisposition. **Annual Review of Medicine**, v. 52, n. p. 371-400, 2001.

ENG, C., et al. Third international workshop on collaborative interdisciplinary studies of p53 and other predisposing genes in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 6, n. 5, p. 379-383, 1997.

FAIRBAIRN, D. W., et al. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: Discriminating apoptosis from necrosis. **Scanning**, v. 18, n. 6, p. 407-416, 1996.

FAN, R., et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 9, n. 10, p. 1037-1042, 2000.

FEARON, E. R. e VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FIELDS, M. M. e CHEVLEN, E. Screening for disease: Making evidence-based choices. **Clin J Oncol Nurs**, v. 10, n. 1, p. 73-76, 2006.

FISHER, D. E. The p53 tumor suppressor: Critical regulator of life & death in cancer. **Apoptosis**, v. 6, n. 1-2, p. 7-15, 2001.

FRASER, F. C. Genetic counseling. **Am J Hum Genet**, v. 26, n. 5, p. 636-661, 1974.

FREEDMAN, D. A. e LEVINE, A. J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by mdm2 and human papillomavirus e6. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 12, p. 7288-7293, 1998.

FRESHNEY, R. I. Introduction. In:_____. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

FRIEDMAN, P. N., et al. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 8, p. 3319-3323, 1993.

FUCHS, S. Y., et al. Jnk targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. **Genes Dev**, v. 12, n. 17, p. 2658-2663, 1998.

FUJITA, K., et al. Quantitative detection of apoptotic thymocytes in low-dose x-irradiated mice by an anti-single-stranded DNA antibody. **J Radiat Res (Tokyo)**, v. 41, n. 2, p. 139-149, 2000.

FUNK, W. D., et al. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 2866-2871, 1992.

GAVRIELI, Y., et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GEMIGNANI, F., et al. A tp53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of tp53 mrna. **Oncogene**, v. 23, n. 10, p. 1954-1956, 2004.

GOLLAHON, L. S., et al. Telomerase activity during spontaneous immortalization of li-fraumeni syndrome skin fibroblasts. **Oncogene**, v. 17, n. 6, p. 709-717, 1998.

GOODE, E. L., et al. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 12, p. 1513-1530, 2002.

GORCZYCA, W., et al. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Res**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.

GRAEBER, T. G., et al. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a g1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 6264-6277, 1994.

GRONOSTAJSKI, R. M., et al. Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. **Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 3, p. 442-448, 1984.

HANSEN, S., et al. The n terminus of the murine p53 tumour suppressor is an independent regulatory domain affecting activation and thermostability. **J Mol Biol**, v. 275, n. 4, p. 575-588, 1998.

HARRIS, C. C. e HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N Engl J Med**, v. 329, n. 18, p. 1318-1327, 1993.

HARRIS, C. C., et al. Biochemical and molecular epidemiology of human cancer: Indicators of carcinogen exposure, DNA damage, and genetic predisposition. **Environ Health Perspect**, v. 75, n. p. 109-119, 1987.

HARVEY, M., et al. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. **Nat Genet**, v. 9, n. 3, p. 305-311, 1995.

HEALY, G. M. e PARKER, R. C. Cultivation of mammalian cells in defined media with protein and nonprotein supplements. **J Cell Biol**, v. 30, n. 3, p. 539-553, 1966.

HERBERT, B. S., et al. Effects of chemopreventive and antitelomerase agents on the spontaneous immortalization of breast epithelial cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 1, p. 39-45, 2001.

HERZOG, C. E. Overview of sarcomas in the adolescent and young adult population. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 27, n. 4, p. 215-218, 2005.

HICKMAN, E. S., et al. The role of p53 and prb in apoptosis and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 1, p. 60-66, 2002.

HISADA, M., et al. Multiple primary cancers in families with li-fraumeni syndrome. **Journal of Natural Cancer Institute**, v. 90, n. 8, p. 606-611, 1998.

HONDA, R., et al. Oncoprotein mdm2 is a ubiquitin ligase e3 for tumor suppressor p53. **FEBS Lett**, v. 420, n. 1, p. 25-27, 1997.

HORNSBY, P. J. e MCALLISTER, J. M. Culturing steroidogenic cells. **Methods Enzymol**, v. 206, n. p. 371-380, 1991.

HUANG, X. E., et al. Association of p53 codon arg72pro and p73 g4c14-to-a4t14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of japanese breast cancer. **Breast Cancer**, v. 10, n. 4, p. 307-311, 2003.

INSTITUTE, N. C. Dictionary of cancer terms. Disponível em:<http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?expand=G> Acesso em 07 abr. 2006.

JEFFERS, J. R., et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 321-328, 2003.

KANAVAKIS, E. e TRAEGER-SYNODINOS, J. Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. **Journal of Medicine Genetics**, v. 39, n. 1, p. 6-11, 2002.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D., et al. Tp53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2000.

KASTAN, M. B., et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res**, v. 51, n. 23 Pt 1, p. 6304-6311, 1991.

KAUFMANN, W. K. e WILSON, S. J. G1 arrest and cell-cycle-dependent clastogenesis in uv-irradiated human fibroblasts. **Mutat Res**, v. 314, n. 1, p. 67-76, 1994.

- KAWAJIRI, K., et al. Germ line polymorphisms of p53 and cyp1a1 genes involved in human lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 6, p. 1085-1089, 1993.
- KEIRA, S., et al. Experimental model for fibroblast culture. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. p. 2004.
- KEMP, C. J., et al. P53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. **Nat Genet**, v. 8, n. 1, p. 66-69, 1994.
- KERR, J. F., et al. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, n. 8, p. 2013-2026, 1994.
- KLEIHUES, P., et al. Tumors associated with p53 germline mutations: A synopsis of 91 families. **Am J Pathol**, v. 150, n. 1, p. 1-13, 1997.
- KLUG, S. J., et al. Tp53 polymorphism, hpv infection, and risk of cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 9, p. 1009-1012, 2001.
- KNUDSON, A. G. Hereditary cancer: Two hits revisited. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 122, n. 3, p. 135-140, 1996.
- KNUDSON, A. G., JR. Genetic predisposition to cancer. **Cancer Detect Prev**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 1984.
- KNUDSON, C. M., et al. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. **Science**, v. 270, n. 5233, p. 96-99, 1995.
- KOCKX, M. M., et al. Rna synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 885-888, 1998.
- KONSTANTINIDOU, A. E., et al. Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis. **J Neurooncol**, v. 72, n. 2, p. 151-156, 2005.
- KOUMENIS, C., et al. Regulation of p53 by hypoxia: Dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 4, p. 1297-1310, 2001.
- KOUSHIK, A., et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Detect Prev**, v. 29, n. 4, p. 307-316, 2005.
- KUSSIE, P. H., et al. Structure of the mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. **Science**, v. 274, n. 5289, p. 948-953, 1996.
- LALLE, P., et al. Genomic stability and wild-type p53 function of lymphoblastoid cells with germ-line p53 mutation. **Oncogene**, v. 10, n. 12, p. 2447-2454, 1995.
- LANE, D. P. Cancer. P53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15-16, 1992.
- LEE, J. M., et al. Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3731-3736, 1994.

- LEE, S. B., et al. Destabilization of chk2 by a missense mutation associated with li-fraumeni syndrome. **Cancer Research**, v. 61, n. 22, p. 8062-8067, 2001.
- LEVINE, A. J. The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. **Virology**, v. 177, n. 2, p. 419-426, 1990.
- LEVINE, A. J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.
- LI, F. P. Identification and management of inherited cancer susceptibility. **Environ Health Perspect**, v. 103 Suppl 8, n. p. 297-300, 1995.
- LI, F. P. e FRAUMENI, J. F., JR. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Annual International Medicine**, v. 71, n. 4, p. 747-752, 1969.
- LI, F. P., et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Research**, v. 48, n. 18, p. 5358-5362, 1988.
- LI, P. F., et al. Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/genetics/predictive-testing-p53-mutations>> Acesso em 07 abr. 2006.
- LI, X., et al. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 24245-24251, 2005.
- LIMACHER, J. M., et al. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with li-fraumeni syndrome. **International Journal of Cancer**, v. 96, n. 4, p. 238-242, 2001.
- LIN, D., et al. Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late g1 phase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 9210-9214, 1992.
- LITTLE, J. B. Irradiation of primary human amnion cell cultures: Effects on DNA synthesis and progression through the cell cycle. **Radiat Res**, v. 44, n. 3, p. 674-699, 1970.
- LITTLE, J. B. e NAGASAWA, H. Effect of confluent holding on potentially lethal damage repair, cell cycle progression, and chromosomal aberrations in human normal and ataxia-telangiectasia fibroblasts. **Radiat Res**, v. 101, n. 1, p. 81-93, 1985.
- LIU, P. K., et al. Analysis of genomic instability in li-fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations. **Oncogene**, v. 12, n. 11, p. 2267-2278, 1996.
- LIU, Z., et al. Puma overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 5, p. 1647-1654, 2005.
- LIVINGSTONE, L. R., et al. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, v. 70, n. 6, p. 923-935, 1992.

LOTEM, J., et al. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 17, p. 9166-9171, 1996.

LUO, J., et al. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 8, p. 2259-2264, 2004.

LUSTBADER, E. D., et al. Segregation analysis of cancer in families of childhood soft-tissue-sarcoma patients. **American Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 2, p. 344-356, 1992.

MABROUK, I., et al. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in tunisian patients. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1010, n. p. 764-770, 2003.

MAKNI, H., et al. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: Effect of inter-laboratory variation. **Int J Cancer**, v. 87, n. 4, p. 528-533, 2000.

MALKIN, D., et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, 1990.

MARIN, M. C., et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. **Nat Genet**, v. 25, n. 1, p. 47-54, 2000.

MARTIN, S. J. e GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, n. 3, p. 349-352, 1995.

MATAKIDOU, A., et al. Tp53 polymorphisms and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 377-385, 2003.

MATLASHEWSKI, G. J., et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 961-963, 1987.

MERCER, W. E. Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 2, n. 3, p. 251-263, 1992.

MIKHAILOV, V., et al. Bcl-2 prevents bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. **J Biol Chem**, v. 276, n. 21, p. 18361-18374, 2001.

MIRZAYANS, R., et al. Abnormal pattern of post-gamma-ray DNA replication in radioresistant fibroblast strains from affected members of a cancer-prone family with li-fraumeni syndrome. **Br J Cancer**, v. 71, n. 6, p. 1221-1230, 1995.

MIYASHITA, T., et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 9, n. 6, p. 1799-1805, 1994.

MIYASHITA, T. e REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293-299, 1995.

- MOMAND, J., et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1237-1245, 1992.
- MOORE, G. E. e GLICK, J. L. Perspective of human cell culture. **Surg Clin North Am**, v. 47, n. 6, p. 1315-1324, 1967.
- MORTON, H. J., et al. Related effects of serum and carbon dioxide on initial growth of strain I cells. **Journal of Natural Cancer Institute**, v. 45, n. p. 1113-1118, 1970.
- MULLER-TIEMANN, B. F., et al. Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6079-6084, 1998.
- NAKANO, K. e VOUSDEN, K. H. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Mol Cell**, v. 7, n. 3, p. 683-694, 2001.
- NELSON, D. R. 'a variant of uncertain significance' and the proliferation of human disease gene databases. **Hum Genomics**, v. 2, n. 1, p. 70-74, 2005.
- NELSON, R. M., et al. Ethical issues with genetic testing in pediatrics. **Pediatrics**, v. 107, n. 6, p. 1451-1455, 2001.
- NICHOLS, K. E., et al. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 10, n. 2, p. 83-87, 2001.
- NOWELL, P., et al. T cell variant of chronic lymphocytic leukaemia with chromosome abnormality and defective response to mitogens. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 459-468, 1976.
- NUNEZ, G., et al. Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3237-3245, 1998.
- NUTTING, C., et al. A patient with 17 primary tumours and a germ line mutation in tp53: Tumour induction by adjuvant therapy? **Clinical Oncology (R Coll Radiology)**, v. 12, n. 5, p. 300-304, 2000.
- O'CONNOR, P. M., et al. Relationships between cdc2 kinase, DNA cross-linking, and cell cycle perturbations induced by nitrogen mustard. **Cell Growth Differ**, v. 3, n. 1, p. 43-52, 1992.
- ODA, E., et al. Noxa, a bh3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1053-1058, 2000.
- OHAYON, T., et al. The r72p p53 mutation is associated with familial breast cancer in jewish women. **Br J Cancer**, v. 92, n. 6, p. 1144-1148, 2005.
- OLINER, J. D., et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 80-83, 1992.

- OLIVE, P. L. e BANATH, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. **Exp Cell Res**, v. 221, n. 1, p. 19-26, 1995.
- OLIVIER, M., et al. The iarc tp53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**, v. 19, n. 6, p. 607-614, 2002.
- OLIVIER, M., et al. Li-fraumeni and related syndromes: Correlation between tumor type, family structure, and tp53 genotype. **Cancer Research**, v. 63, n. 20, p. 6643-6650, 2003.
- OWEN-SCHAUB, L. B., et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce fas/apo-1 expression. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 3032-3040, 1995.
- PAINTER, R. B. e YOUNG, B. R. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 12, p. 7315-7317, 1980.
- PARANT, J. M. e LOZANO, G. Disrupting tp53 in mouse models of human cancers. **Hum Mutat**, v. 21, n. 3, p. 321-326, 2003.
- PAULES, R. S., et al. Defective g2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. **Cancer Res**, v. 55, n. 8, p. 1763-1773, 1995.
- PAYNE, C. M. e CROMEY, D. W. An image analysis workstation designed for multiple users: Application of quantitative digital imaging techniques to electron microscopy. **Ultrastruct Pathol**, v. 16, n. 1-2, p. 147-154, 1992.
- PIETENPOL, J. A., et al. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 6, p. 1998-2002, 1994.
- PINTO, F. N., et al. Mutação do gene p53 induzindo predisposição hereditária ao câncer: Relato de um caso da síndrome de li-fraumeni. **Rev Med**, v. 81, n. p. 42-46, 2002.
- PLUMMER, S. J., et al. A germline 2.35 kb deletion of p53 genomic DNA creating a specific loss of the oligomerization domain inherited in a li-fraumeni syndrome family. **Oncogene**, v. 9, n. 11, p. 3273-3280, 1994.
- PLUQUET, O. e HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Lett**, v. 174, n. 1, p. 1-15, 2001.
- PORTWINE, C., et al. Absence of germline p16(ink4a) alterations in p53 wild type li-fraumeni syndrome families. **J Med Genet**, v. 37, n. 8, p. E13, 2000.
- PRIVES, C. e HALL, P. A. The p53 pathway. **J Pathol**, v. 187, n. 1, p. 112-126, 1999.
- RAHA, S. e ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. **Am J Med Genet**, v. 106, n. 1, p. 62-70, 2001.
- RAMPINO, N., et al. Somatic frameshift mutations in the bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 967-969, 1997.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. **Semin Hematol**, v. 34, n. 4 Suppl 5, p. 9-19, 1997.

RIBEIRO, R. C., et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

ROGAN, E. M., et al. Alterations in p53 and p16ink4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of li-fraumeni syndrome fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 9, p. 4745-4753, 1995.

RYAN, K. M., et al. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. **Current Opinion Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 332-337, 2001.

SACGT, S. S. A. C. O. G. T. Enhancing the oversight of genetic tests: Recommendations of the sacgt, secretary's advisory committee on genetic testing. Disponível em: <<http://www4.od.nih.gov/oba/sacgt/gtdocuments.html>> Acesso em 07 abr. 2006.

SAKAMURO, D., et al. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. **Oncogene**, v. 15, n. 8, p. 887-898, 1997.

SANTIBANEZ-KOREF, M. F., et al. P53 germline mutations in li-fraumeni syndrome. **Lancet**, v. 338, n. 8781, p. 1490-1491, 1991.

SARASTE, A. e PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SCHENDEL, S. L., et al. Bcl-2 family proteins as ion-channels. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 5, p. 372-380, 1998.

SCHNEIDER-STOCK, R., et al. Selective loss of codon 72 proline p53 and frequent mutational inactivation of the retained arginine allele in colorectal cancer. **Neoplasia**, v. 6, n. 5, p. 529-535, 2004.

SCHWARTZ, J. L. e JORDAN, R. Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by p53-dependent apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 1, p. 201-205, 1997.

SCHWARTZ, J. L., et al. Different sensitivity to cell killing and chromosome mutation induction by gamma rays in two human lymphoblastoid cell lines derived from a single donor: Possible role of apoptosis. **Mutagenesis**, v. 10, n. 3, p. 227-233, 1995.

SETO, E., et al. Wild-type p53 binds to the tata-binding protein and represses transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 12028-12032, 1992.

SGONC, R. e GRUBER, J. Apoptosis detection: An overview. **Exp Gerontol**, v. 33, n. 6, p. 525-533, 1998.

SHAULSKY, G., et al. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 12, p. 6565-6577, 1990.

SHAY, J. W., et al. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with li-fraumeni syndrome. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 425-432, 1995.

SHERR, C. J. e ROBERTS, J. M. Cdk inhibitors: Positive and negative regulators of g1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-1512, 1999.

SHIEH, S. Y., et al. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by mdm2. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 325-334, 1997.

SIDDIQUI, R., et al. The tp53 mutational spectrum and frequency of chek2*1100delc in li-fraumeni-like kindreds. **Fam Cancer**, v. 4, n. 2, p. 177-181, 2005.

SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SIONOV, R. V. e HAUPT, Y. The cellular response to p53: The decision between life and death. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6145-6157, 1999.

SJALANDER, A., et al. P53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1313-1316, 1996.

SLEE, E. A., et al. To die or not to die: How does p53 decide? **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2809-2818, 2004.

SMITH, G. J., et al. Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology. **J Electron Microscop Tech**, v. 18, n. 1, p. 38-49, 1991.

SOUSSI, T. Focus on the p53 gene and cancer: Advances in tp53 mutation research. **Hum Mutat**, v. 21, n. 3, p. 173-175, 2003.

SOUSSI, T. e BEROUD, C. Assessing tp53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 3, p. 233-240, 2001.

SOUSSI, T. e BEROUD, C. Significance of tp53 mutations in human cancer: A critical analysis of mutations at cpg dinucleotides. **Hum Mutat**, v. 21, n. 3, p. 192-200, 2003.

SOUSSI, T., et al. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, v. 5, n. 7, p. 945-952, 1990.

SOUSSI, T., et al. Locus-specific mutation databases: Pitfalls and good practice based on the p53 experience. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2006.

SPROSTON, A. R., et al. Fibroblasts from li-fraumeni patients are resistant to low dose-rate irradiation. **Int J Radiat Biol**, v. 70, n. 2, p. 145-150, 1996.

SRIVASTAVA, S., et al. Several mutant p53 proteins detected in cancer-prone families with li-fraumeni syndrome exhibit transdominant effects on the biochemical properties of the wild-type p53. **Oncogene**, v. 8, n. 9, p. 2449-2456, 1993.

SRIVASTAVA, S., et al. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with li-fraumeni syndrome. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 747-749, 1990.

- STONE, J. G., et al. Analysis of li-fraumeni syndrome and li-fraumeni-like families for germline mutations in bcl10. **Cancer Lett**, v. 147, n. 1-2, p. 181-185, 1999.
- STOREY, A., et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-234, 1998.
- STRANO, S., et al. Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. **J Biol Chem**, v. 275, n. 38, p. 29503-29512, 2000.
- THOMAS, M., et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 1092-1100, 1999.
- THORNBERRY, N. A. e LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.
- THORNBERRY, N. A., et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 272, n. 29, p. 17907-17911, 1997.
- THULL, D. L. e VOGEL, V. G. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. **Oncologist**, v. 9, n. 1, p. 13-24, 2004.
- THUT, C. J., et al. P53 transcriptional activation mediated by coactivators tafii40 and tafii60. **Science**, v. 267, n. 5194, p. 100-104, 1995.
- TICE, R. R., et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TISCHKOWITZ, M. e ROSSER, E. Inherited cancer in children: Practical/ethical problems and challenges. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 16, p. 2459-2470, 2004.
- TURNBULL, C. e HODGSON, S. Genetic predisposition to cancer. **Clin Med**, v. 5, n. 5, p. 491-498, 2005.
- VAHTERISTO, P., et al. P53, chk2, and chk1 genes in finnish families with li-fraumeni syndrome: Further evidence of chk2 in inherited cancer predisposition. **Cancer Research**, v. 61, n. 15, p. 5718-5722, 2001.
- VARLEY, J. M. Germline tp53 mutations and li-fraumeni syndrome. **Human Mutation**, v. 21, n. 3, p. 313-320, 2003.
- VARLEY, J. M., et al. Li-fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 1, p. 1-14, 1997.
- VARLEY, J. M., et al. Are there low-penetrance tp53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 4, p. 995-1006, 1999.
- VARLEY, J. M., et al. Germ-line mutations of tp53 in li-fraumeni families: An extended study of 39 families. **Cancer Research**, v. 57, n. 15, p. 3245-3252, 1997.

VENOT, C., et al. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific pig3 gene transactivation and with transcriptional repression. **Embo J**, v. 17, n. 16, p. 4668-4679, 1998.

VILLUNGER, A., et al. P53- and drug-induced apoptotic responses mediated by bh3-only proteins puma and noxa. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1036-1038, 2003.

VOGELSTEIN, B. e KINZLER, K. W. P53 function and dysfunction. **Cell**, v. 70, n. 4, p. 523-526, 1992.

VOGELSTEIN, B., et al. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 1602, n. 1, p. 47-59, 2002.

WADA, S., et al. Detection of radiation-induced apoptosis using the comet assay. **J Vet Med Sci**, v. 65, n. 11, p. 1161-1166, 2003.

WALKER, K. K. e LEVINE, A. J. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 26, p. 15335-15340, 1996.

WANG, L., et al. Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. **J Biol Chem**, v. 276, n. 47, p. 43604-43610, 2001.

WANG, Y., et al. P53 domains: Identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. **Genes Dev**, v. 7, n. 12B, p. 2575-2586, 1993.

WASLEY, G. D. A simplified microplate cell culture system. **J Med Lab Technol**, v. 26, n. 2, p. 134-135, 1969.

WEINERT, T. A. e HARTWELL, L. H. The rad9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 241, n. 4863, p. 317-322, 1988.

WEINERT, T. A. e HARTWELL, L. H. Characterization of rad9 of *saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 12, p. 6554-6564, 1990.

WEINERT, T. A. e HARTWELL, L. H. Cell cycle arrest of *cdc* mutants and specificity of the rad9 checkpoint. **Genetics**, v. 134, n. 1, p. 63-80, 1993.

WEISS, R. H. P21waf1/cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 425-429, 2003.

WICKREMASINGHE, R. G. e HOFFBRAND, A. V. Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3587-3600, 1999.

WILLIAMS, K. J., et al. Cell cycle arrest defect in li-fraumeni syndrome: A mechanism of cancer predisposition? **Oncogene**, v. 14, n. 3, p. 277-282, 1997.

- WILLIAMS, K. J., et al. No defect in g1/s cell cycle arrest in irradiated li-fraumeni lymphoblastoid cell lines. **Br J Cancer**, v. 74, n. 5, p. 698-703, 1996.
- WONG, K. B., et al. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8438-8442, 1999.
- WU, G. S., et al. Killer/dr5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. **Nat Genet**, v. 17, n. 2, p. 141-143, 1997.
- WU, X., et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes Dev**, v. 7, n. 7A, p. 1126-1132, 1993.
- WU, X., et al. P53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 9, p. 681-690, 2002.
- XIONG, Y., et al. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 701-704, 1993.
- YAMAMOTO, T. e NISHIOKA, K. Increased expression of p53 and p21 (waf1/cip1) in the lesional skin of bleomycin-induced scleroderma. **Arch Dermatol Res**, v. 296, n. 11, p. 509-513, 2005.
- YIN, Y., et al. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell**, v. 70, n. 6, p. 937-948, 1992.
- YU, J., et al. Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. **Mol Cell**, v. 7, n. 3, p. 673-682, 2001.
- YU, J., et al. Identification and classification of p53-regulated genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 25, p. 14517-14522, 1999.
- ZHANG, Z. W., et al. Prognostic value of tp53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 1 Pt 1, p. 131-135, 2004.
- ZHAO, R., et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. **Genes Dev**, v. 14, n. 8, p. 981-993, 2000.

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO DA PROBANDA

EXAMES SOLICITADOS POR PACIENTES E FAMILIARES COM SUSPEITA DE
SEREM PORTADORES DE MUTAÇÃO NO GENE TP53

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Nome do probando: _____ Idade: _____

Fui paciente com vários tipos de câncer que foram diagnosticados por outros médicos. Alguns dos meus parentes de cada geração (exceto na geração mais jovem) tiveram câncer, e estes dados levaram os médicos a acreditarem na hipótese de doença genética.

Procurei o Dr. Bonald C. Figueiredo, por meio de Dra. Glaci do Hospital de Clínicas da UFPR, e solicitei exames de DNA para investigar alguma doença genética. Concordei em me submeter a coleta de sangue para extração de DNA de leucócito e de me submeter a uma biópsia de pele para realização de cultura células.

Entendi as explicações dadas pelo Dr. Bonald, na presença de Dra. Glaci e de Dr. Jesus do HC, sobre a necessidade de analisar o gene TP53. Entendi e aceitei também estudar o comportamento das minhas células em meio de cultura, por meio de teste de resposta à irradiação, e não espero que estes testes apresentem alguma solução importante para minha doença, mas que talvez poderá trazer informação que possa ser utilizada pelos pesquisadores. Também fiquei sabendo que o CEGEMPAC não cobra por exames, mas utiliza os resultados inéditos para publicação sem divulgar os nomes de pacientes e parentes, e que algum dia os conhecimentos obtidos poderiam beneficiar no diagnóstico e tratamento de outras pessoas.

Mesmo depois de saber dos resultados destes testes, poderei recusar que os dados destes testes façam parte de publicações. Segundo o Dr. Bonald, o seqüenciamento de DNA será realizado por laboratório americano que poderá eventualmente recusar fazer o exame e exigir pagamento, e na hipótese de pagamento eu me encarregarei de acertar diretamente com o laboratório.

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura do probando

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura do pesquisador responsável

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura da testemunha

APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARENTES

EXAMES SOLICITADOS POR PACIENTES E FAMILIARES COM SUSPEITA DE
SEREM PORTADORES DE MUTAÇÃO NO GENE TP53

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Nome do parente: _____ Idade: _____

Sou parente [filho/esposo/sobrinho(a)/mãe] de _____
que teve vários tipos de câncer diagnosticados por outros médicos. Alguns dos meus parentes
de cada geração (exceto na geração mais jovem) tiveram câncer, e estes dados levaram os
médicos a acreditarem na hipótese de doença genética.

Sei que o Dr. Bonald C. Figueiredo foi procurado pela parente acima citada por meio
da Dra. Glaci do Hospital de Clínicas da UFPR, e também solicitei exames de DNA para
investigar alguma doença genética. Concordei em me submeter a coleta de sangue para
extração de DNA de leucócito.

Entendi as explicações dadas pelo Dr. Bonald, na presença de Dra. Glaci e de Dr.
Jesus do HC, sobre a necessidade de analisar o gene *TP53*. Também fiquei sabendo que o
CEGEMPAC não cobra por exames, mas utiliza os resultados inéditos para publicação sem
divulgar os nomes de pacientes e parentes, e que algum dia os conhecimentos obtidos
poderiam beneficiar no diagnóstico e tratamento de outras pessoas.

Mesmo depois de saber dos resultados destes testes poderei recusar que os dados
destes testes façam parte de publicações. Segundo o Dr. Bonald, o seqüenciamento de DNA
será realizado por laboratório americano que poderá eventualmente recusar fazer o exame e
exigir pagamento, e na hipótese de pagamento eu me encarregarei de acertar diretamente com
o laboratório.

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura do probando

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura do pesquisador responsável

_____ Local: _____ Data: ____/____/2005.
Assinatura da testemunha

APÊNDICE 3: TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

GUARDA E UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS SOLICITADAS PELO PACIENTE

Nome do PACIENTE: _____

CPF: _____ RG _____

Seguindo orientação da minha médica, a oncologista Dra. Glaci Letchacovski Moura, solicitei ao Diretor do CEGEMPAC, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, a realização de exames de DNA para o gene P53, cujos resultados alterados foram confirmados pelo laboratório americano “City of Hope”. Segundo Dr. Bonald, a alteração gênica encontrada foi a primeira descrição citada em linhagem germinativa, justificando os vários casos de câncer na minha família. Entretanto, por não existir uma explicação para eu ter tido várias formas de câncer, foi sugerido um teste de provocação de lesão celular com irradiação não letal das células (fibroblastos). Assim, solicitei me submeter a uma biópsia de pele com o propósito de cultivar as células em meio de cultura e depois guardar em nitrogênio líquido. Foi explicado que estas células seriam descongeladas, expostas à irradiação, e mantidas em meio de cultura para análise de morfologia e contagem de células (ver se existe perfil pré-neoplásico) e análise de proteínas. A guarda destas células e estas avaliações serão realizadas no CEGEMPAC sob à orientação de Dr. Bonald C. Figueiredo, sendo algumas avaliações solicitadas de laboratório comercial americano, porém todos estes testes serão gratuitos .

Assinatura do paciente

Data: ____/____/2005.

Assinatura do pesquisador responsável

Data: ____/____/2005.

Assinatura da testemunha

Data: ____/____/2005.

**APÊNDICE 4: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA DOADORA
SADIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Nome do PACIENTE: _____

CPF: _____ RG _____

Sou paciente do Dr. Márcio Moura e fui procurada por ele para doar fragmentos de pele que seriam descartados no momento da minha cirurgia eletiva. Foi explicado que estes fragmentos não teriam aproveitamento algum, mas a doação desses fragmentos ao Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) poderia ser utilizada no cultivo de células (fibroblastos) que serviriam de controle para testes com outras células. Sei que esta doação não trará nenhum benefício para mim, mas fui informada que o cultivo de células será muito importante como controle na investigação de doenças de outros pacientes. Foi explicado que estas células seriam descongeladas, expostas à irradiação, e mantidas em meio de cultura para análise de morfologia, contagem de células, análise de proteínas e testes de resposta à irradiação (proliferação e apoptose). A guarda destas células e estas avaliações serão gratuitas e realizadas no CEGEMPAC sob à orientação de Dr. Bonald C. Figueiredo. Também fui informada que o CEGEMPAC utiliza os resultados inéditos desses testes para publicação sem divulgar os nomes dos participantes. Mesmo depois dos resultados desses testes, poderei recusar que estes dados façam parte dessas publicações. Assim, autorizo que pequenos fragmentos de pele que seriam descartadas da minha cirurgia sejam encaminhadas para o CEGEMPAC com o propósito de cultivar as células em meio de cultura e depois guardar em nitrogênio líquido.

Data: ____ / ____ / 2005.

Assinatura do paciente

Data: ____ / ____ / 2005.

Assinatura do pesquisador responsável

Data: ____ / ____ / 2005.

Assinatura da testemunha

**APÊNDICE 5: TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA
DOADORA SADIA**

GUARDA E UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS SOLICITADAS PELO PACIENTE

Nome do PACIENTE: _____

CPF: _____ RG _____

Sou paciente do Dr. Márcio Moura e fui procurada por ele para doar fragmentos de pele que seriam descartados no momento da minha cirurgia eletiva. Foi explicado que estes fragmentos não teriam aproveitamento algum, mas a doação desses fragmentos ao Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) poderia ser utilizada no cultivo de células (fibroblastos) que serviriam para extrair células (chamadas fibroblastos) que poderiam ser utilizadas como células normais, como grupo controle de outras células consideradas anormais. O CEGEMPAC sempre avalia a função de células anormais, do tipo cancerosas ou suspeitas de terem algum risco para se tornar células cancerosas. Sei que esta doação não trará nenhum benefício para mim, mas fui informada que o cultivo de células será muito importante como controle na investigação de doenças de outros pacientes. Foi explicado que estas células seriam descongeladas, expostas à irradiação, e mantidas em meio de cultura para análise de morfologia, contagem de células, análise de proteínas e testes de resposta à irradiação (proliferação e apoptose). A guarda destas células e estas avaliações serão gratuitas e realizadas no CEGEMPAC sob à orientação de Dr. Bonald C. Figueiredo. Também fui informada que o CEGEMPAC utiliza os resultados inéditos desses testes para publicação sem divulgar os nomes dos participantes. Mesmo depois dos resultados desses testes, poderei recusar que estes dados façam parte dessas publicações. Assim, autorizo que pequenos fragmentos de pele que seriam descartadas da minha cirurgia sejam encaminhadas para o CEGEMPAC com o propósito de cultivar as células em meio de cultura e depois guardar em nitrogênio líquido.

Data: ____/____/2005.

Assinatura do paciente

Data: ____/____/2005.

Assinatura do pesquisador responsável

Data: ____/____/2005.

Assinatura da testemunha

ANEXO 1: CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP

