



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Claudia Bustamante Levy

**Análise de mutações no gene *TP53* em casos de câncer de mama e estudo da
proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor**

Rio de Janeiro

2010

Claudia Bustamante Levy

Análise de mutações no gene *TP53* em casos de câncer de mama e estudo da proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Vitória de Moura Gallo

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L668 Levy, Claudia Bustamante.

Análise de mutações no gene TP53 em casos de câncer de mama e estudo da proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor / Claudia Bustamante Levy. – 2010.

84 f. : il.

Orientadora: Claudia Vitória de Moura Gallo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Mamas - Câncer - Fisiopatologia - Teses. 2. Genes p53 - Teses. 3. Mutagênese - Teses. 4. Proteínas mutantes - Teses. 5. Genes supressores de tumor - Teses. I. Gallo, Claudia Vitória de Moura. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 618.19-006.6

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Claudia Bustamante Levy

Análise de mutações no gene *TP53* em casos de câncer de mama e estudo da proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de julho de 2010.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Claudia Vitória de Moura Gallo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Stumbo Machado
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dr^a. Ana Paula Dinis Ano Bom
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Revisora/ Suplente Prof^a. Dr^a. Andréa Carla de Souza Góes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Suplente Prof. Dr. Jerson Lima da Silva
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meus amigos, muito importantes em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pois sem eles eu não teria chegado aqui, dando todo o apoio em todas as minhas escolhas.

Aos meus amigos, por me apoiarem em todos os momentos, todos vocês são muito importantes para mim. A Aline, Ana Paula e Michele, pela amizade desde a graduação, pelos momentos engraçados e divertidos que passamos juntas, que sempre lembro com saudades, e por serem grandes amigas nos momentos tristes e felizes.

Ao Thiago, por seu carinho e por estar ao meu lado nesta fase, me apoiando. Pela sua paciência e compreensão durante os dias que me ausentei para elaboração deste trabalho.

A minha orientadora, Cláudia Gallo, pela sua orientação desde IC, que me permitiu crescer profissionalmente. Pela disponibilidade, atenção, paciência, dedicação e profissionalismo.

A Prof.^a Ana Carolina, pela sua colaboração neste trabalho, pela atenção, carinho e por me ensinar e permitir realizar os experimentos de imuno em seu laboratório.

A todo o grupo da Prof.^a Claudia Gallo, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável, pela ajuda, pelos momentos de descontração e pela amizade. Em especial para “as meninas do sequenciamento” (Evelin, Lara e Yasmin), pela companhia divertida, todas as quintas, nos intermináveis sequenciamentos. Além disso, pela grande ajuda neste trabalho das meninas, Lara e Yasmin. Desejo muito sucesso para vocês! Agradeço também a Silvinha, apesar de não fazer mais parte do grupo, pelos seus ensinamentos e sua amizade.

A Deus por sempre me iluminar e me guiar...

RESUMO

Levy, Claudia Bustamante. *Análise de mutações no gene TP53 em casos de câncer de mama e estudo da proteína mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor*. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O câncer de mama é o tipo mais frequente de neoplasia maligna entre as mulheres, com a incidência de mais de um milhão de novos casos no mundo, por ano. O gene *TP53* é responsável por regular o destino da célula em resposta a estresses genotóxicos e não genotóxicos. Mutações somáticas neste gene são encontradas em, aproximadamente, 50% dos carcinomas humanos. No câncer de mama, a frequência das mutações no *TP53* é em torno de 20 a 50%, sendo a alteração mais encontrada. Estas mutações podem alterar a conformação da proteína, prejudicando sua função de ativadora da transcrição de genes alvo e, pode levar a p53 a apresentar tendência à agregação. Neste trabalho, foi realizada a análise da presença de mutações nos exons 5 a 10 do gene *TP53*, em biópsias de câncer de mama, de mulheres residentes na cidade do Rio de Janeiro. Após a identificação das amostras com mutação em *TP53*, algumas foram selecionadas para se verificar o comportamento das diversas mutantes quanto à formação de agregados de p53, em cortes histológicos dos tumores de mama. Foram utilizados os anticorpos A11 e DO1, que reconhecem oligômeros pré-fibrilares e a p53 mutante ou selvagem, respectivamente. Para tanto, foi utilizado o ensaio de co-localização por imunofluorescência, utilizando microscópio confocal para a observação dos resultados. Mutações no gene *TP53* foram detectadas em 19% dos casos analisados de câncer de mama sendo 88,2% do tipo “missense”. Estas mutações, em tumores do tipo carcinoma ductal infiltrante (CDI), estavam associadas a um estágio mais tardio e agressivo de câncer, representado pelo Grau III de Elston ($p < 0,0001$). Também foi observada relação positiva dos tumores com mutações e o acúmulo da p53 ($p = 0,0184$). Além disso, foi observado um padrão diferente das mutantes de p53 quanto à tendência a agregação, sendo as mutantes R273H e P278A as que apresentaram uma maior agregação. Assim, a agregação da p53 mutante observada “in vivo” e descrita nesta dissertação, parece depender do tipo de mutação observada nos casos de câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Mutações no *TP53*. Agregados fibrilares.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in women, with 1 million of new cases in the world each year. The *TP53* gene is responsible for the regulation of the cell's fate in response to genotoxic and non-genotoxic stress. Somatic *TP53* mutations are found in, approximately, 50% of human cancers. In breast cancer, *TP53* mutation is the most frequent genetic alteration, being present in 20 to 50% of cases. These mutations may change the protein conformation, impairing the transcription of target genes, and may lead the mutant p53 to aggregate. In this study, we analyzed the presence of mutations in exons 5-10 of *TP53* in breast cancer biopsies of women resident in the metropolitan area of Rio de Janeiro. After the determination of samples with mutation, some of them were selected to investigate the behavior of different mutants in the formation of p53 aggregates in tumors using A11 and DO-1 antibodies, which recognizes pre-fibrillar oligomers and mutant or wild-type p53, respectively. So, we utilized a immunofluorescence co-localization assay using confocal microscope. *TP53* mutations were detected in 19% of the breast cancer cases, with 88.2% of missense type. These mutations, in tumors classified as infiltrating ductal carcinoma (CDI), were associated with a later and aggressive stage of cancer, represented by Elston's Grade III ($p < 0.0001$). A relation was also observed between these mutations and p53 accumulation ($p = 0.0184$). Furthermore, a different pattern of p53 mutants for the tendency to aggregate was observed and we detected that the mutants R273H and P278A showed a greater aggregation. Thus, the mutant p53 aggregation observed in vivo and described in this study, seems to depend on the type of mutation found in breast cancer cases.

Keywords: Breast cancer. *TP53* mutation. Fibrillar aggregates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo.....	17
Figura 2 –	Incidência e mortalidade por câncer em mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	17
Figura 3 –	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.....	18
Figura 4 –	Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010.....	19
Figura 5 –	Vias de ação da p53.....	25
Figura 6 –	Esquema mostrando as ações da p53 mutante.....	26
Figura 7 –	As estruturas das proteínas da família p53.....	27
Figura 8 –	Estrutura da região N-terminal da p53 ligada a uma proteína.....	28
Figura 9 –	Estrutura do domínio central da p53 sem estar ligada ao DNA.....	29
Figura 10 –	Estrutura do domínio de oligomerização.....	30
Figura 11 –	Estrutura do domínio C-terminal da p53 ligado com uma proteína.....	31
Figura 12 –	Histograma mostrando as posições das mutações somáticas por substituição de base no <i>TP53</i> com destaque para os códons “hotspot”.....	32
Figura 13 –	Modelo de agregação de p53.....	34
Figura 14 –	Eletroferograma mostrando o sequenciamento de um dos tumores.....	49
Figura 15 –	Imunohistoquímica para p53 e A11.....	52
Figura 16 –	Imunofluorescência mostrando o ensaio de co-localização da p53 selvagem e de agregados proteicos.....	54
Figura 17 –	Imunofluorescência mostrando o ensaio de co-localização da p53 mutante e de agregados proteicos.....	55
Figura 18 –	Eletroferograma mostrando a inserção da mutação R248P no plasmídeo com a p53 inteira.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Graduação de Elston.....	22
Tabela 2 –	Sequência dos iniciadores utilizados na PCR do gene <i>TP53</i>	38
Tabela 3 –	Sequência dos iniciadores utilizados na PCR sítio dirigida.....	43
Tabela 4 –	Características clínico-patológicas das amostras analisadas.....	45
Tabela 5 –	Mutações encontradas no gene <i>TP53</i> e o efeito na função da proteína.....	48
Tabela 6 –	Correlação entre as características clínico-patológicas das amostras de câncer de mama e a análise da presença ou não de mutações no gene <i>TP53</i>	50
Tabela 7 –	Correlação entre as características clínico-patológicas de amostras de câncer de mama apenas de subtipo CDI e a análise da presença ou não de mutações no gene <i>TP53</i>	51
Tabela 8 –	Análise da presença de agregados de p53.....	53
Tabela 9 –	Plasmídeos construídos com as mutações desejadas no gene <i>TP53</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg –	microgramas
μL –	microlitro
ATM –	“Ataxia-telangiectasia Mutated”
<i>BAG-1</i> –	“Bcl-2-associated athano gene-1”
BAX –	proteína pró-apoptótica membro da família bcl-2
<i>BRCA1</i> –	“breast cancer 1 gene”
<i>BRCA2</i> –	“breast cancer 2 gene”
CDI –	carcinoma ductal infiltrante
cDNA –	DNA complementar
CHK2 –	“Checkpoint kinase 2”
<i>c-MYC</i> –	proto-oncogene que codifica a fosfoproteína nuclear c-MYC
CpG –	dinucleotídeos de citosina e guanina unidos por ligação fosfodiéster
DNA –	ácido desoxirribonucleico
dNTP –	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA –	ácido etilenodiamino tetracético
<i>EGFR</i> –	gene do receptor do fator de crescimento epidérmico
g –	gramas
GADD45 –	“growth arrest and DNA damage-inducible protein”
IARC –	“International Agency for Research on Cancer”
IFF –	Instituto Fernandes Figureira
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
KCl –	cloreto de potásio
KDa –	quilodalton

M –	molar
MDM2 –	“Murine double minute 2”
<i>MDR1</i> –	gene de resistência a múltiplas drogas
mg –	miligramas
MgCl ₂ –	cloreto de magnésio
mL –	mililitros
mM –	milimolar
NaCl –	cloreto de sódio
ng –	nanogramas
nm –	nanômetro
P21 –	proteína inibidora de ciclina
P53 –	fosfoproteína supressora de tumor
P63 –	membro da família p53
P73 –	membro da família p53
pb –	pares de base
PBS –	tampão fosfato-salino
PBS/BSA –	tampão fosfato-salino com albumina sérica bovina
PCR –	reação em cadeia da polimerase
pH –	potencial de hidrogênio
pmol –	picomol
PUMA –	“p53 upregulated modulator of apoptosis”
rpm –	rotações por minuto
SDS –	dodecil sulfato de sódio
SV40 –	simian virus 40
TAD –	domínio de transativação

TAE –	tampão tris-acetato-EDTA
TE –	tampão tris-EDTA
<i>TP53</i> –	gene da p53
<i>TP63</i> –	gene da p63
<i>TP73</i> –	gene da p73
Tris –	trihidroximetil-amino-metano
U –	unidade
v –	volts
VEGF –	gene do fator de crescimento endotelial vascular
Zn –	zinco

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	O CÂNCER DE MAMA	16
1.1	O câncer de mama e a incidência no mundo	16
1.2	Incidência no Brasil	18
1.3	Tipos histológicos dos tumores de mama	19
1.4	Gradação histológica dos tumores de mama	21
1.5	Alterações genéticas no câncer de mama	22
2	A PROTEÍNA P53	23
2.1	O histórico da sua descoberta	23
2.2	O gene <i>TP53</i> e sua família	24
2.3	A estrutura da p53	27
2.4	A p53 mutante	31
2.5	Agregados de proteínas: agregados de p53	33
	OBJETIVOS	35
	MATERIAL E MÉTODOS	36
1	MATERIAL	36
1.1	Amostras biológicas de pacientes com câncer de mama	36
2	MÉTODOS	36
2.1	Extração de DNA genômico de biópsias de tecidos mamários frescos	36
2.2	Verificação da qualidade do DNA extraído e quantificação	37
2.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
2.4	Eletroforese em gel de agarose 1,5%	39
2.5	Purificação das amostras	39
2.6	Sequenciamento	40
2.7	Imunohistoquímica	41
2.8	Imunofluorescência	42
2.9	Mutação sítio-dirigida	43
2.10	Análise Estatística	44
	RESULTADOS	45
1	Análise de mutações no gene <i>TP53</i> e o câncer de mama	45

2	Estudo da presença de agregados de p53 em tumores de mama.....	52
3	Mutação sítio-dirigida.....	58
	DISCUSSÃO.....	59
	CONCLUSÕES.....	64
	PERSPECTIVAS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXO A - Co-localization of mutant p53 and amyloid aggregates in breast tumors	74

INTRODUÇÃO

1 – O CÂNCER DE MAMA

1.1 – O câncer de mama e a incidência no mundo

O câncer de mama é uma doença heterogênea com o comportamento biológico altamente variável (Osuch JR, 2002). Na maioria das vezes é derivado das células epiteliais que revestem a unidade do ducto terminal do lóbulo mamário e apresenta duas importantes fases na sua evolução: a fase “in situ”, na qual as células cancerosas não ultrapassam as camadas dos ductos, e a fase invasiva, quando ocorre a disseminação para os tecidos adjacentes (Sainsbury JRC et al, 2000; Fentiman IS, D’Arrigo C, 2004).

Este carcinoma é o tipo mais frequente de neoplasia entre as mulheres, com a incidência de mais de um milhão de novos casos por ano e com a mortalidade de, aproximadamente, quatrocentas mil pessoas em todo o mundo, representando 14% de mortes por câncer em mulheres (Parkin DM, Fernandez LMG, 2006). A **FIGURA 1** mostra a sua incidência e mortalidade no mundo por 100.000 pessoas. A incidência do câncer de mama tem aumentado em mais de 5% por ano em populações de países em desenvolvimento (Stewart B, Kleihues PE, 2003). A China, por exemplo, apresentou um aumento de 20 a 30% na última década (Anderson BO et al, 2008). Portanto, estas observações indicam que o câncer de mama, anteriormente conhecido como doença de países desenvolvidos, agora tornou-se global. A **FIGURA 2** mostra a incidência e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

A incidência e mortalidade para o câncer de mama entre os diferentes países mostram importantes diferenças populacionais em relação à exposição aos hormônios endógenos, ao estilo de vida, aos fatores ambientais, à susceptibilidade genética e à prática da mamografia (Hulka BS, Moorman PG, 2001). Por exemplo, em países mais desenvolvidos, são observadas altas taxas de incidência, sendo a mais alta na América do Norte. Em parte, isto pode ser devido à presença de programas de rastreamento que levam ao diagnóstico precoce do câncer (Parkin DM et al, 2002).

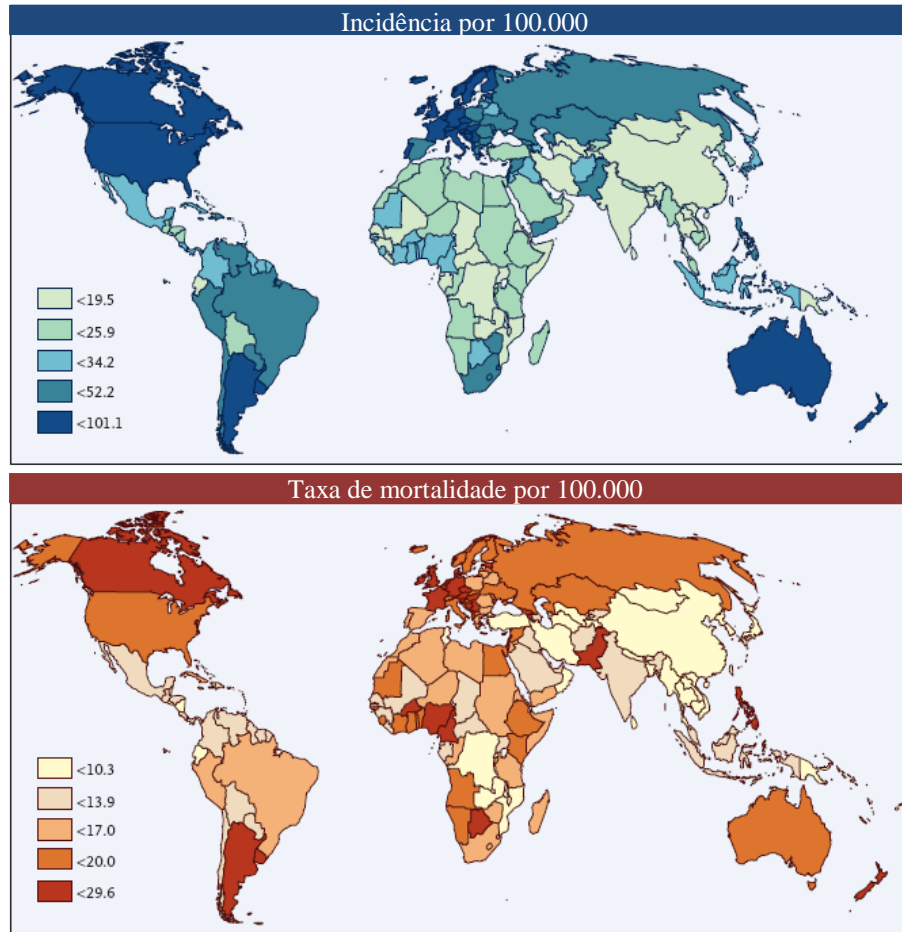


FIGURA 1 – Incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo (Fonte: Porter P, 2008).

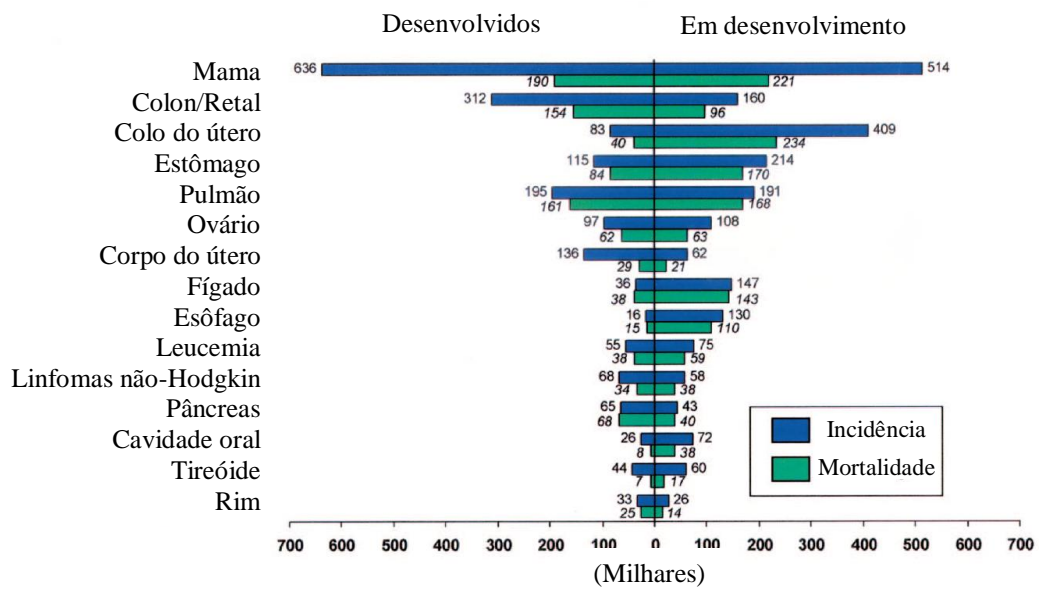


FIGURA 2 – Incidência e mortalidade por câncer em mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Fonte: Parkin DM et al, 2002).

1.2 – Incidência no Brasil

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 será de 49 mil, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (**FIGURA 3**).

Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Esta alta distribuição pode estar relacionada aos fatores de risco para o câncer de mama, como dieta rica em gordura, idade tardia da primeira gravidez, maior exposição a poluentes ambientais, entre outros, que estão associados à intensa urbanização e industrialização da Região Sudeste. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte é o segundo tumor mais incidente (17/100.000) (Ministério da Saúde / INCA, 2009) (**FIGURA 4**).

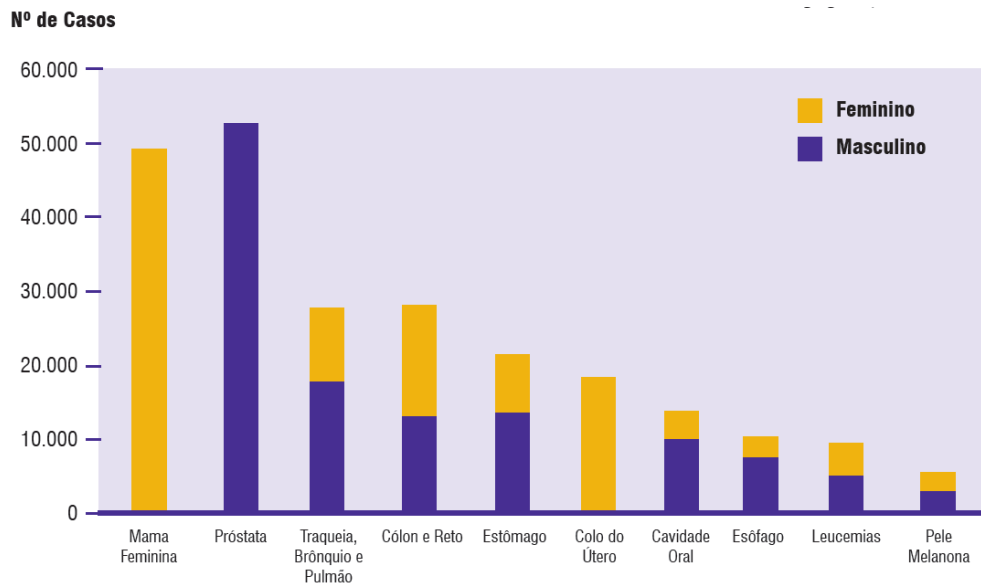


FIGURA 3 - Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira (Fonte: Ministério da Saúde / INCA, 2009).

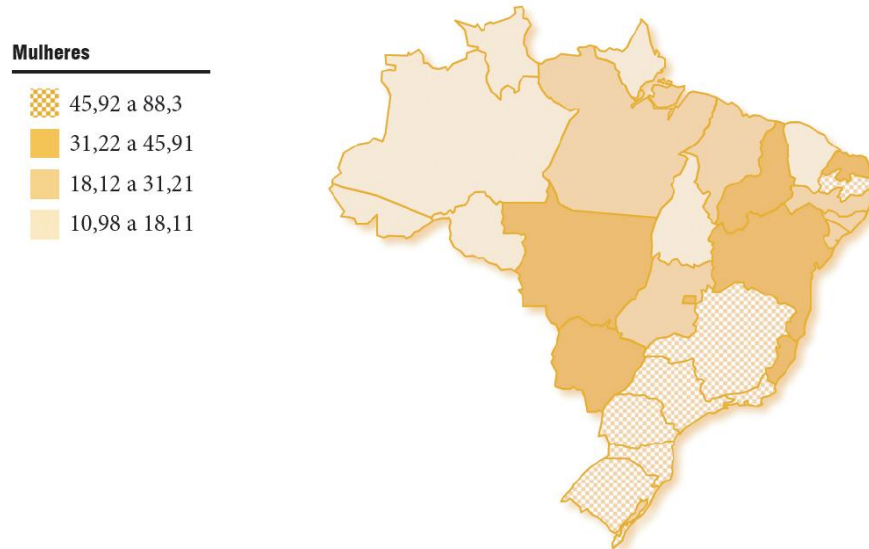


FIGURA 4 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010 (Fonte: Ministério da Saúde / INCA, 2009).

1.3 – Tipos histológicos dos tumores de mama

Aproximadamente 90% de todos os carcinomas de mama ocorrem nos ductos ou nos lóbulos, sendo que 80% de todos os casos iniciam nas células dos ductos. Os carcinomas que se iniciam nos lóbulos são chamados de carcinomas lobulares e é bilateral em 30% dos casos. Outros tumores de mama menos comuns incluem tumores medulares (5% dos tumores de mama), mucinosos, tubulares, papilares ou inflamatórios.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2003), os tumores malignos de mama são classificados da seguinte maneira:

Carcinomas “in situ” - caracterizados pelas células neoplásicas proliferarem dentro dos ductos ou lóbulos mamários sendo denominados carcinoma intraductal e carcinomas lobulares “in situ”, respectivamente.

- Carcinoma intraductal – é o tipo mais comum de carcinoma não-invasivo entre as mulheres e caracteriza-se por uma proliferação de células neoplásicas dentro do ducto, não ultrapassando os limites da membrana basal, associada a um pleomorfismo

nuclear, com alteração da orientação celular do revestimento epitelial. Essas células podem proliferar e obstruir completamente a luz dos ductos.

- Carcinoma lobular “in situ” - caracteriza-se pela proliferação de células pequenas e uniformes no interior de ductos terminais e lóbulos. Este carcinoma apresenta baixa taxa de proliferação.

Carcinomas invasivos - caracterizam-se pela penetração de células neoplásicas na membrana basal de um ducto contendo carcinoma ductal “in situ” e extensão de agregados de células neoplásicas no estroma mamário.

- Carcinoma ductal infiltrante (CDI) - é o mais comum, encontrado em 70% dos casos e cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares. O CDI se inicia em um ducto da mama, encontra a parede do ducto e se espalha para o estroma. Caracteriza-se por apresentar células neoplásicas com diversos graus de atipia nuclear, com uma tendência diversa a formar estruturas pseudoglandulares ou semelhantes aos ductos, e com atividade mitótica variável.
- Carcinoma mucoso ou mucinoso - outro tipo ductal, compreende 3% dos carcinomas mamários e geralmente ocorre em mulheres com idade mais avançada. Apresenta baixa taxa de proliferação, mas pode alcançar proporções volumosas. Quando o tumor é predominantemente mucoso, o prognóstico tende a ser favorável.
- Carcinoma medular - apresenta lesões limitadas que podem alcançar grandes dimensões, mas apresenta baixa capacidade de infiltração. Constitui de 5 a 7% de todos os carcinomas mamários e é caracterizado por uma margem bem delimitada, células pouco diferenciadas, alto índice mitótico e presença de um intenso infiltrado linfoplasmocitário. Está associado com um prognóstico relativamente favorável.
- Carcinoma tubular - constitui 2% dos carcinomas da mama. Ele consiste em tumor bem diferenciado com proliferação de túbulos glandulares. O tumor é diagnosticado carcinoma tubular somente se 75% ou mais do tumor é composto por estes túbulos.
- Carcinoma papilífero - constitui de 1% a 2% dos carcinomas mamários e apresenta uma arquitetura papilar do componente invasor e do intraductal. Ocorre mais frequentemente nas mulheres idosas.

- Carcinoma lobular infiltrante - geralmente ocorre antes da menopausa, pode crescer ao redor dos ductos e lóbulos. É relativamente incomum, representando apenas 5 a 10% dos casos de tumores de mama.
- Carcinoma micropapilífero infiltrante - apresenta uma frequência inferior a 2% de todos os carcinomas de mama invasivo. Geralmente estão associados a outros tipos de carcinomas. Focos de padrão micropapilar foram observados em 3-6% dos carcinomas invasivos. Normalmente ocorre como uma massa sólida semelhante ao carcinoma ductal, com metástases nos gânglios linfáticos axilares no momento do diagnóstico em mais de 70% dos casos.
- Carcinoma apócrino infiltrante - normalmente é compreendido como uma variante do carcinoma ductal infiltrante. As células têm o mesmo padrão arquitetural de invasividade do carcinoma ductal infiltrante, mas elas se diferenciam por apresentarem características de células de secreção apócrina.
- Carcinoma infiltrante misto - apresenta dois tipos de carcinomas invasivos associados, geralmente ductal e lobular.

1.4 – Graduação histológica dos tumores de mama

Em 1957, Bloom e Richardson relataram o papel importante da graduação histológica na informação do prognóstico do câncer de mama. Para tornar o critério de graduação mais quantitativo, Elston-Ellis modificaram o sistema de Bloom e Richardson (Elston CW, Ellis IO, 1991). Este novo sistema (sistema Nottingham) baseou-se em uma avaliação semiquantitativa de 3 características morfológicas (grau de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico) (Singletary SE et al, 2002) (**TABELA 1**). Com esta graduação, foi possível diminuir os problemas de reprodutibilidade e mostrar a forte associação entre graus histológicos e o prognóstico, onde o grau I tem sobrevida melhor que os graus II e III (Farias RE et al, 2005).

Neste sistema, uma grande quantidade dos tumores (30 a 60%) ainda é classificada como grau II, o que não é ideal para uma decisão terapêutica, devido ao risco intermediário de recorrência (Ignatiadis M, Sotiriou C, 2008).

TABELA 1 - Graduação de Elston. Grau I: 3-5 pontos (bem diferenciado); Grau II: 6-7 pontos (moderadamente diferenciado); Grau III: 8-9 pontos (pouco diferenciado);

(Fonte: Farias RE et al, 2005).

1. Formação Tubular	Escore
Muita formação no tumor (> 75%)	1
Formação moderada (10-75%)	2
Pouca formação ou nenhuma(< 10%)	3
2. Pleomorfismo nuclear	
Núcleos pequenos, regulares e uniformes	1
Aumento moderado do tamanho e variabilidade	2
Marcada variação	3
3. Contagem mitótica	
0-5 mitoses	1
6-10 mitoses	2
> 11 mitoses	3

1.5 – Alterações genéticas no câncer de mama

A maioria dos carcinomas de mama é esporádica, porém mutações germinativas em genes de alta penetrância como o *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* também estão associadas ao desenvolvimento do câncer de mama (Boyle, Levin, 2008). No caso dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, mutações são encontradas em 60% dos casos de câncer hereditário (Steiner E et al, 2008). Certas mutações nestes genes ocorrem com alta frequência em populações definidas. Por exemplo, 2% das mulheres judias Ashkenazi podem apresentar as seguintes alterações: *BRCA1* 185 del AG, *BRCA1* 5382 ins C ou *BRCA* 6174 del T. Já no *TP53*, mutações germinativas estão associadas com a síndrome de Li-Fraumeni (McPherson et al, 2000). Apesar dos portadores de mutações nestes genes terem um risco de mais de 50% de desenvolver o câncer de mama, estas alterações são raras na maioria das populações, responsáveis por 2 a 5% dos casos (Boyle, Levin, 2008).

No caso dos carcinomas esporádicos, mutações no gene *TP53* são as mais frequentes, encontradas em 20 a 50% dos casos (Zhou et al, 2009). A presença de mutações no gene *TP53*

está associada com uma menor taxa de sobrevivência e com uma baixa resposta ao tratamento, logo com um pior prognóstico (Takahashi et al, 2008).

2 – A PROTEÍNA P53

2.1 – O histórico da sua descoberta

Em 1979, a p53 foi descoberta através de um experimento onde se procurava identificar proteínas virais responsáveis pela transformação maligna de células infectadas pelo vírus SV40. Neste experimento, foram encontradas duas proteínas virais, chamadas antígenos T grande e pequeno, sendo que em uma delas, a antígeno T grande, uma proteína não-viral de 53 KDa, a p53, estava associada (Lane DP, Crawford LV, 1979; Linzer DI, Levine AJ, 1979).

Outro experimento demonstrou que animais imunizados com células transformadas não-virais produziam anticorpos para a mesma proteína de 53 KDa, qualificando-a como um antígeno tumoral (DeLeo AB et al, 1979). Portanto, altos níveis desta proteína não estavam apenas presentes em células transformadas por SV-40, mas também em outros tipos de células de câncer. Além disso, pouca ou nenhuma expressão de p53 foi detectada em células não-transformadas.

Depois de alguns anos, com o isolamento e a clonagem do cDNA do *TP53*, foi observado que a p53 poderia cooperar com outros oncogenes na transformação em células malignas (Parada LF et al, 1984). Outros experimentos relataram a alta expressão em células de câncer humanas, enquanto que isto não foi observado em células normais (Crawford LV, et al 1981). Com isso, foi sugerido que a p53 apresentava um papel de oncogene.

Foi relatado que o *TP53*, na verdade, era um gene supressor de tumor apenas no final dos anos 80, apesar do surgimento de várias pistas. A teoria de que o *TP53* era um oncogene foi descartada, quando foi notada a ausência de transformação nas células em um experimento com um clone de cDNA de *TP53*. Assim, ao comparar as sequências de DNA de vários clones utilizados, foi relatado que eles apresentavam sequências diferentes. Portanto, os clones testados em estudos anteriores poderiam estar mutados (Levine AJ, Oren M, 2009). Também foi visto que as p53 mutantes derivadas de tumores podem promover a transformação maligna, já as células com a p53 selvagem não promovem (Eliyahu D et al,

1988). Além disso, foi observado que em todos os estudos, os quais demonstraram a atividade oncogênica da p53, foi utilizada a p53 mutada, derivada de linhagens de células cancerosas (Levine AJ, Oren M, 2009). Sendo assim, a função de oncogene foi suposta erroneamente.

2.2 – O gene *TP53* e sua família

O gene *TP53* é um gene regulador chave do ciclo celular que, quando sofre mutações deletérias, pode levar ao desenvolvimento de neoplasias, atuando, portanto, como um gene supressor tumoral em condições normais. Ele está localizado no cromossomo 17p13.1 e é composto por 11 exons, sendo que o primeiro não é codificado (Bouchet BP et al, 2006). Este gene codifica um fator de transcrição nuclear, a proteína p53, uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa composta por 393 aminoácidos que atua como um guardião do genoma.

Normalmente, a p53 é mantida em baixos níveis nas células devido à ação realizada pela ubiquitina ligase MDM2, que utiliza dois mecanismos: promovendo a liberação do p53 para o citoplasma e sua consequente degradação, e bloqueando seu domínio de transativação (Bertheau P et al, 2008). MDM2 é um alvo transcricional e um supressor da função da p53, criando assim uma auto-regulação negativa (Levine AJ, Oren M, 2009).

A p53 é estabilizada na célula sob vários tipos de estresse, principalmente eventos genotóxicos, através de modificações pós-traducionais que permitem o seu escape da degradação, aumentando o seu nível intracelular (Olivier M et al, 2009) (**FIGURA 5**).

No caso de danos no DNA, as proteínas quinases, ATM e CHK2, irão fosforilar a p53 e a MDM2, impedindo a interação MDM2-p53 e ocasionando o acúmulo de p53 na célula para que a p53 realize a sua função supressora de tumor (Junttila MR, Evan GI, 2009).

Quando oncogenes estão ativados, a proteína ARF interage com a MDM2 e, consequentemente, a p53 é estabilizada (Polager S, Ginsberg D, 2009). Com isso, a p53 poderá regular a ativação ou inativação de vários genes envolvidos na parada do ciclo celular na fase G1 (*p21*) e G2 (*GADD45*), apoptose (*BAX*, *PUMA*) e reparo do DNA (*GADD45*). A escolha do tipo de resposta da p53 pode depender do tipo de sinal induzido, da célula e do tecido, porém mais de uma resposta pode ocorrer no mesmo tecido (Bouchet BP et al, 2006).

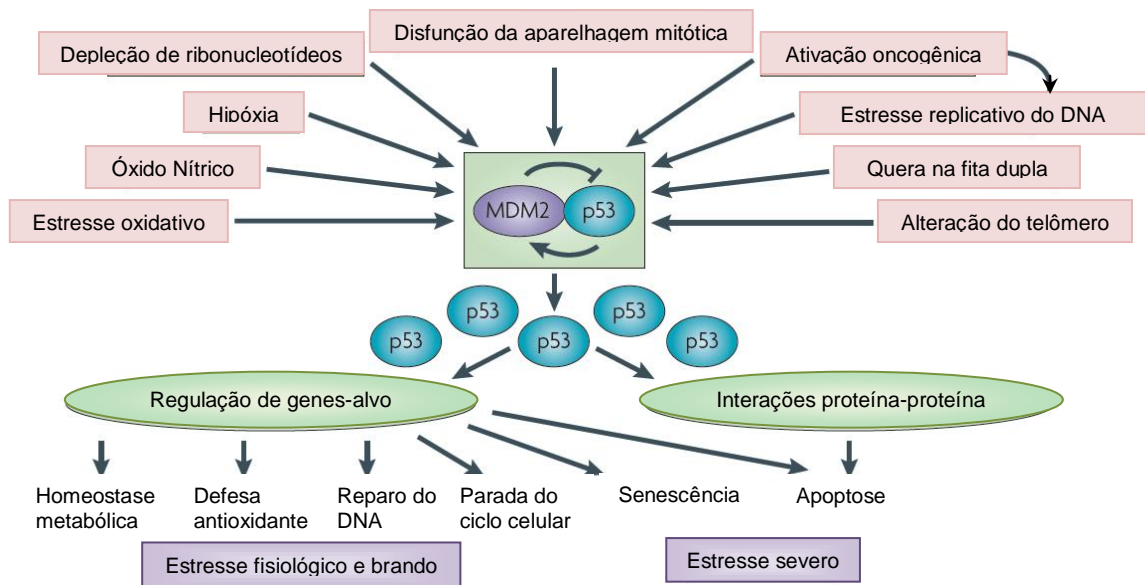


FIGURA 5 – Vias de ação da p53 (Fonte: Levine AJ, Oren M, 2009).

Novos estudos indicam que a p53 também apresenta um papel importante no ajuste do metabolismo celular em resposta a pequenas flutuações fisiológicas, incluindo o nível de glicose e outros nutrientes, acesso ao oxigênio e os níveis de espécies reativas a oxigênio (Vousden KH, Ryan KM, 2009).

Quando a p53 está mutada, dependendo do sítio onde se encontra a mutação, a proteína perde a sua função, não realizando a parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Além disso, pode atuar como um dominante negativo sobre a p53 selvagem e também pode ocorrer um ganho de função oncogênica pela mudança do repertório dos genes, cuja expressão é controlada, predispondo as células ao rápido acúmulo de múltiplas alterações genéticas, podendo ocasionar o câncer (**FIGURA 6**).

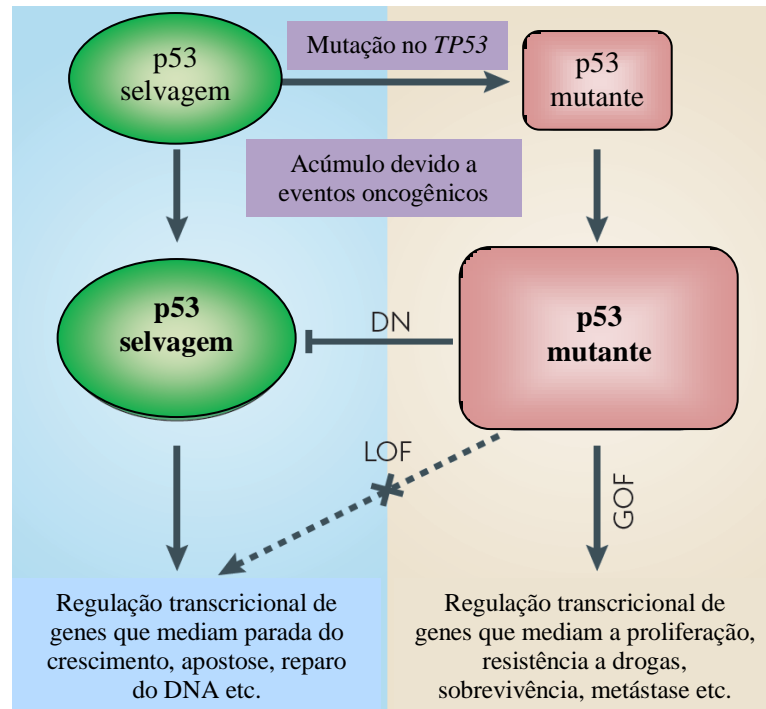


FIGURA 6 – Esquema mostrando as ações da p53 mutante. DN – dominante negativo, LOF – perda de função, GOF – ganho de função oncogênica (Fonte: Brosh R, Rotter V, 2009).

O gene *TP53* faz parte de uma família de genes altamente conservados, provavelmente oriundos de um gene ancestral comum, a qual inclui dois outros membros, o *TP63* e o *TP73*, que codificam, respectivamente, as proteínas p63 e p73 (Strano S et al, 2001). Estas duas proteínas compartilham estruturas e funções homólogas com a p53, principalmente com o domínio de ligação ao DNA, permitindo a transativação de genes-alvo da p53, podendo ocasionar a parada do ciclo celular ou apoptose (**FIGURA 7**). Apesar disso, a p53, p63 e p73 não realizam exatamente as mesmas funções, desempenhando cada uma suas próprias funções (Khoury MP, Bourdon JC, 2010). Além disso, a família do gene *TP53*, como a maioria dos genes humanos, expressa múltiplas variantes de mRNA devido a múltiplos sítios de “splicing” e promotores alternativos (Bourdon JC, 2007).

Um dos membros da família, o gene *TP63*, está localizado no cromossomo 3q27, e o seu produto proteico parece ter um papel essencial no desenvolvimento e na diferenciação de determinados tecidos (Little NA, Jochemsen AG, 2002). A p63 é encontrada normalmente superexpressa em certos carcinomas humanos, mas mutações nesta proteína são muito raras. Em tumores como, por exemplo, o câncer de mama, a p53 mutante pode ativar as funções da p63 de sobrevivência da célula e inibir as de apoptose, ocasionando o desenvolvimento do tumor (Hrstka R et al, 2009).

Já o gene *TP73* está localizado no cromossomo 1p36, que é normalmente deletado em vários carcinomas (DeYoung MP, Ellisen LW, 2007). A sua proteína p73 tem como função a diferenciação de tecidos e, em resposta à lesão no DNA, ela pode bloquear o ciclo celular e desencadear a apoptose por um mecanismo paralelo e independente ao do p53 (De Laurenzi V, Melino G, 2000). Ela também pode interagir e parcialmente compensar a perda de atividade da p53 (Ozaki T, Nakagawara A, 2005).

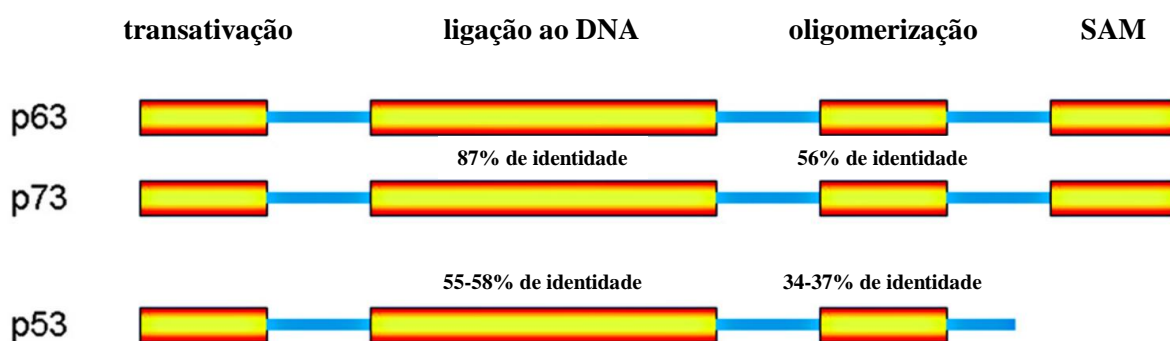


FIGURA 7 – As estruturas das proteínas da família p53. O domínio de ligação ao DNA apresenta uma maior identidade entre elas. Já o domínio SAM (sterile alpha motif) é encontrado apenas na p63 e na p73, ele confere a estabilidade da proteína (Fonte: Belyi VA, Levine AJ, 2009).

2.3 - A estrutura da p53

A p53 apresenta cinco domínios estruturais e funcionais: um domínio de transativação bipartido (TAD1- resíduos 20-40 e TAD2- resíduos 40-60) e um domínio rico em prolina com a função de ativadora da apoptose (resíduos 60-90) na região N-terminal; um domínio central de ligação ao DNA seqüência-específica (resíduos 100-300); um domínio de oligomerização responsável pela manutenção da proteína em tetrameros (resíduos 325-355); um domínio básico C-terminal envolvido na regulação da ligação ao DNA (Zupnick A, Prives C, 2006).

Na região N-terminal da p53, o domínio de ativação transcricional é requerido para que a proteína exerça sua atividade de transativação perfeitamente, além de também interagir com a proteína MDM2, reguladora negativa do gene *TP53*. O domínio rico em prolina contém

sítios envolvidos em interações proteína-proteína nas vias de transdução de sinal, sendo uma região importante na ativação da apoptose dependente de p53. A estrutura da região N-terminal é normalmente desenovelada, no entanto uma estrutura secundária é observada em locais com resíduos hidrofóbicos funcionalmente importantes. Quando ocorre a interação de proteínas no domínio de transativação, estes locais tornam-se totalmente enovelados (**FIGURA 8**) (Joerger AC, Fersht AR, 2008).

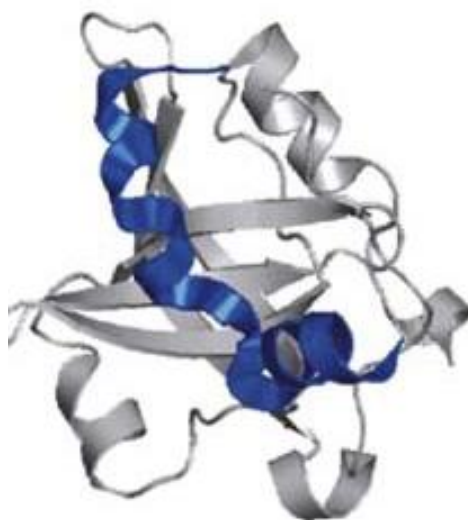


FIGURA 8 - Estrutura da região N-terminal da p53 (azul) ligada a uma proteína (cinza)
(Fonte: Okorokov AL, Orlova EV, 2009).

O domínio central da p53 é formado por um complexo composto de duas folhas β que permite um molde básico para a superfície de ligação ao DNA. Esta superfície é subdividida em duas estruturas: uma que se liga à fenda maior do DNA, que é formada por alça, folha β e α hélice e outra que se liga à fenda menor pelo resíduo arginina 248, formada por duas grandes alças que são estabilizadas pelo íon de zinco. A ausência de interação do zinco aos seus sítios de ligação na proteína irá ocasionar a desestabilização da p53, resultando em alterações estruturais locais e perda da especificidade na ligação ao DNA. Logo, o íon de zinco é necessário para a manutenção da estrutura conformacional da p53 e sua ligação ao DNA (**FIGURA 9**).

A maioria das mutações do gene *TP53* encontra-se no domínio central, podendo resultar na perda de contato do DNA com pouco efeito na estrutura da p53, como é o caso de mutações nos códons 248 e 273, e na alteração da estrutura de ligação ao DNA, no caso dos códons 175, 245, 249 e 282 (Joerger AC, Fersht AR, 2007).

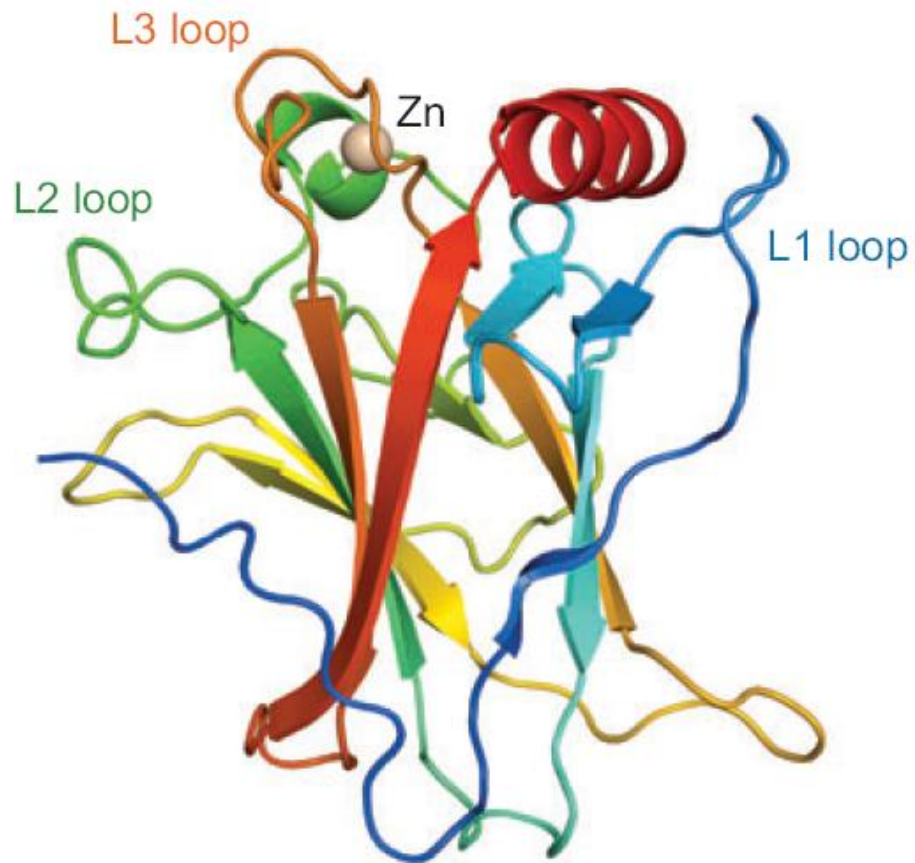


FIGURA 9 – Estrutura do domínio central da p53 sem estar ligada ao DNA (Fonte: Joerger AC, Fersht AR, 2008).

O domínio de oligomerização é o responsável pela apresentação da p53 na forma de tetrâmeros, que ocorre com a formação de dímeros de dímeros. Ele consiste de uma folha β e α hélice ligada por uma pequena dobra em cada monômero. Dois monômeros formam um dímero que é estabilizado via folha β antiparalela intermolecular e α hélice antiparalela. A formação de tetrâmeros ocorre através de uma associação antiparalela das suas hélices. Estes monômeros são mantidos juntos por interações hidrofóbicas (**FIGURA 10**) (Okorokov AL, Orlova EV, 2009).

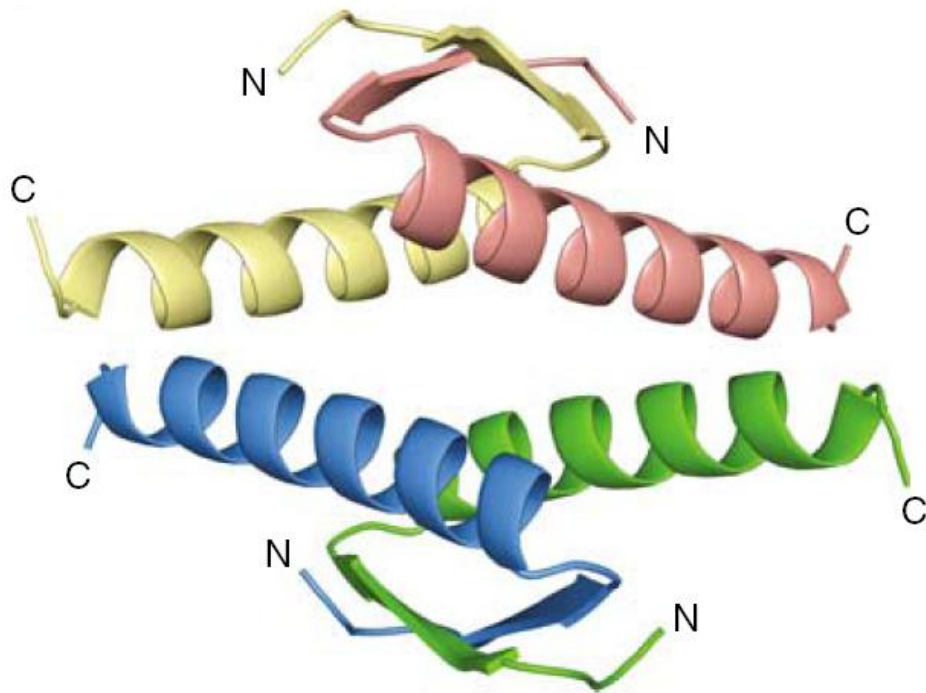


FIGURA 10 – Estrutura do domínio de oligomerização. A p53 está reunida em tetrâmeros através da a formação de dímeros de dímeros. N – posição N-terminal, C – posição C-terminal (Fonte: Joerger AC, Fersht AR, 2007).

O domínio C-terminal é altamente básico e capaz de interagir com o DNA de uma maneira não sequência-específica, reconhecendo principalmente danos na molécula de DNA. A ausência deste domínio promove um aumento na ligação específica da p53 ao DNA, o que evidencia seu papel regulador negativo. Acredita-se que este domínio seja responsável pela sua manutenção em estado latente. A sua conformação, igualmente ao N-terminal, é desenovelada e adquire uma estrutura secundária estável quando se liga inespecificamente com o DNA ou com outras proteínas (**FIGURA 11**) (Viadiu H, 2008).

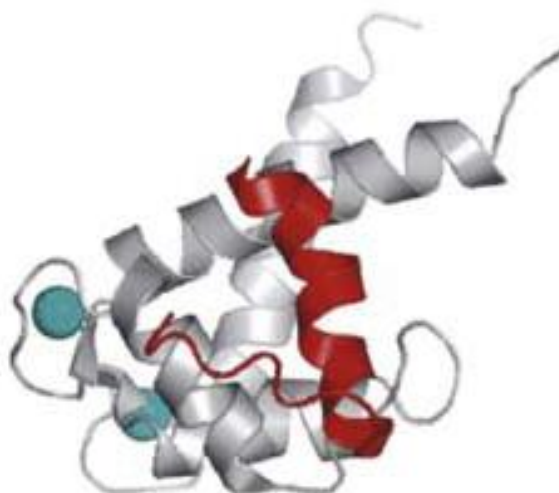


FIGURA 11 – Estrutura do domínio C-terminal da p53 (vermelho) ligado com uma proteína (Fonte: Okorokov AL, Orlova EV, 2009).

2.4 - A p53 mutante

Mutações somáticas no gene *TP53* são encontradas em 50% dos carcinomas humanos. Mais de 75% das mutações neste gene são do tipo “missense” e 80% delas estão localizadas nos exons 5 a 8 que correspondem à região da p53 de ligação ao DNA. A região N-terminal, que apresenta o domínio de transativação, e a região C-terminal, a qual contém sítios de regulação, são locais raramente mutados onde se observa menos de 2% das mutações no *TP53* (Bouchet BP et al, 2006).

Aproximadamente 30% das mutações afetam códons “hotspot” (175, 245, 248, 249, 273 e 282) (**FIGURA 12**). Cinco destas seis mutações “hotspot” ocorrem em citosinas localizadas em ilhas CpG. Estas citosinas estão geralmente metiladas e, por se tornarem menos estáveis, elas estão sujeitas à desaminação espontânea e sua consequente conversão para timina, sendo uma causa comum para a ocorrência de mutações. Além disso, por estarem localizados no domínio de ligação ao DNA, eles apresentam um papel importante no contato proteína-DNA (248 e 273) ou na conformação da proteína (175, 245, 249 e 282). Portanto, mutações nestes códons não irão permitir à p53 reconhecer seus genes-alvo (Guimaraes DP, Hainaut P, 2002; Li Y, Prives C, 2007).

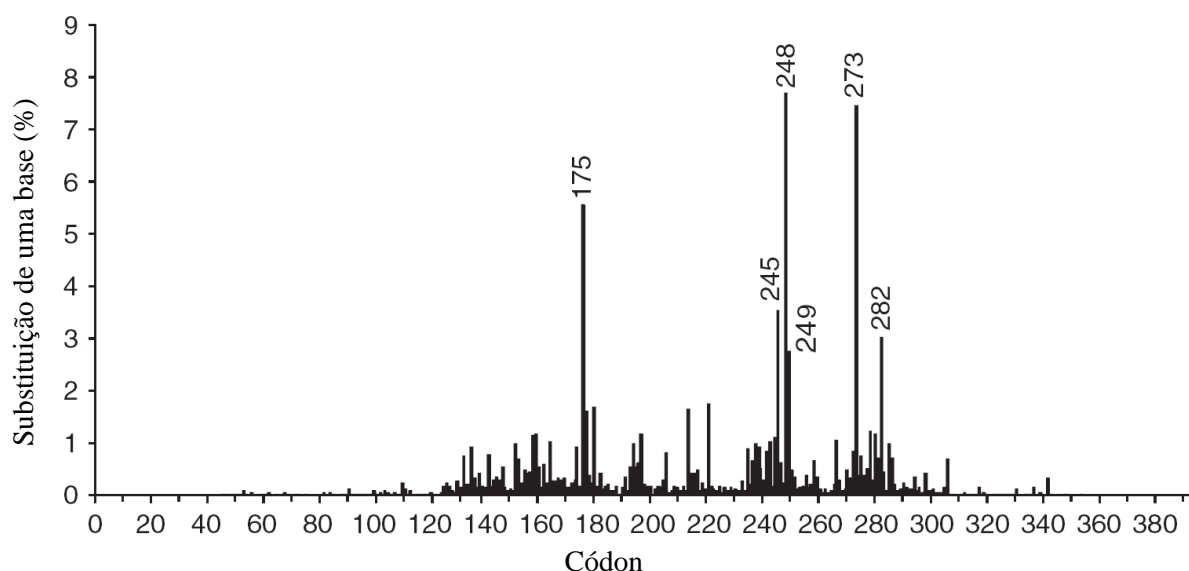


FIGURA 12 – Histograma mostrando as posições das mutações somáticas por substituição de base no *TP53* com destaque para os códons “hotspot” (Fonte: Olivier M et al, 2010).

A maioria das mutações no *TP53* observadas nos carcinomas humanos impede a ativação da transcrição de genes-alvo, ocasionando a perda parcial ou total da função supressora de tumor da p53, comprometendo seriamente a habilidade da célula em responder ao estresse. A perda da função é frequente em mutações “missense”, porém este efeito ocorre principalmente em mutações “nonsense” e em deleções no gene (Brosh R, Rotter V, 2009). No caso das mutações “hotspot”, todas apresentam perda de função, o grau da perda porém, é variável e alguns mutantes podem manter a atividade parcial de transcrição de genes-alvos (Olivier M et al, 2010).

A mutante R337H, localizada no domínio de oligomerização, apresenta perda parcial de função e a oligomerização é prejudicada devido a alterações na ligação de hidrogênio entre dois monômeros (Petitjean A et al, 2007b). Esta mutação germinativa foi relatada no Sul do Brasil e está relacionada com a Síndrome de Li-Fraumeni. Ela apresenta uma frequência de 10 a 20 vezes maior que outras mutações no gene *TP53* associadas à Síndrome de Li-Fraumeni (Palmero EI et al, 2008).

Além da perda de função, as mutações também podem atribuir à p53 mutante a atividade de dominante negativo, o que irá causar a inativação da p53 selvagem expressa pelo alelo selvagem remanescente. Este efeito ocorre devido à oligomerização das proteínas selvagens e mutantes, formando um heterotetrâmero com atividade comprometida na ligação ao DNA (Brosh R, Rotter V, 2009). Algumas mutantes podem ter este efeito de dominante

negativo como, por exemplo: R249S, R175H, R248W/Q e R273H (Brachmann RK et al, 1996; Petitjean A, 2007a).

Algumas mutações são capazes de ganhar função oncogênica, ocasionando a transativação de genes que, por exemplo, irão atuar na proliferação celular e/ou a inativação de genes com atividade supressora de tumor. Alguns dos genes afetados são: o *EGFR* e o *c-MYC*, que promovem a proliferação, o *MDR1* e o *BAG-1*, envolvidos na sobrevivência celular e o *VEGF*, associado com a angiogênese (Cadwell C, Zambetti GP, 2001). Além disso, as p53 mutantes podem formar complexos com a p63 e p73, inibindo a capacidade de transativação destas proteínas que poderiam impedir a formação do câncer (Guimaraes DP, Hainaut P, 2002). As mutantes R175H, R248W e R273H estão associadas a este fenótipo, pois ao serem expressas em linhagens de células que não apresentam p53, foi observado um aumento do potencial tumorigênico (van Oijen MG, Slootweg PJ, 2000; Donehower LA, Lozano G, 2009).

Ensaio experimentais têm sido realizados em leveduras e células humanas para se analisar o efeito das mutações no *TP53* como: na atividade de transativação; na capacidade de induzir a parada do ciclo celular ou apoptose; na habilidade de exercer um efeito dominante negativo nas p53 selvagens; nas atividades não relacionadas com as das p53 selvagens. Estes ensaios estão disponíveis nos dados do IARC (www-p53.iarc.fr).

2.5 – Agregados de proteínas: agregados de p53

Doenças associadas ao envelhecimento de proteínas podem ser divididas em dois grupos. Um grupo é relacionado às doenças amiloides, no qual uma grande quantidade de proteínas com a conformação alterada forma agregados de fibrilas amiloides, ocasionando a destruição de células do cérebro e de outros tecidos. Este grupo inclui: Alzheimer, Parkinson, Huntington, diabetes tipo II e outras doenças. O outro grupo que inclui vários tipos de câncer, fibrose cística e enfisema, pode estar relacionado com pequenos erros genéticos, geralmente alterando um aminoácido, podendo ocasionar uma alteração da conformação de proteínas, tornando-as funcionalmente defeituosas ou suscetíveis a proteases. Algumas proteínas que não estão associadas com nenhuma doença amiloide conhecida, podem se agregar de forma semelhante a fibrilas amiloides em condições especiais (Ishimaru D et al, 2003a).

Vários carcinomas apresentam um acúmulo da proteína p53 selvagem ou mutante no citoplasma e/ou no núcleo celular, que pode ocorrer devido a alterações na conformação da proteína (Silva JL et al, 2010). Este acúmulo de proteínas poderia originar a agregação da p53, a partir de proteínas de conformação intermediária, parcialmente enoveladas ou, raramente, de proteínas desenoveladas (Ishimaru D et al, 2004). A formação de agregados do tipo amiloide foi relatada nos domínios de transativação, central e de tetramerização, quando a proteína foi submetida a condições amenas de desnaturação. Portanto, a formação de agregados de p53 pode estar atuando no desenvolvimento do câncer (Ishimaru D et al, 2003a; Lee AS et al, 2003; Rigacci S et al, 2008).

Mutações “hot-spot” no domínio central da p53 normalmente desestabilizam a sua conformação, podendo esta apresentar uma grande tendência à agregação. Este é o caso da mutação R248Q, onde foi observada uma tendência a agregação em experimentos “in vitro” (Ishimaru D et al, 2003a). Além disso, os agregados de p53 mutantes podem propagar a conformação alterada e inativa às moléculas de p53 selvagem, devido ao efeito de dominante negativo (**FIGURA 13**). Isto também pode ser causado pelas moléculas de p53 selvagem com conformação alterada a outras moléculas de p53 selvagem, corretamente enoveladas (Rigacci S et al, 2008).

Estudos que verifiquem a formação de agregados de p53 mutantes “in vivo” são necessários para que possamos analisar os efeitos das mutantes de p53 no câncer.

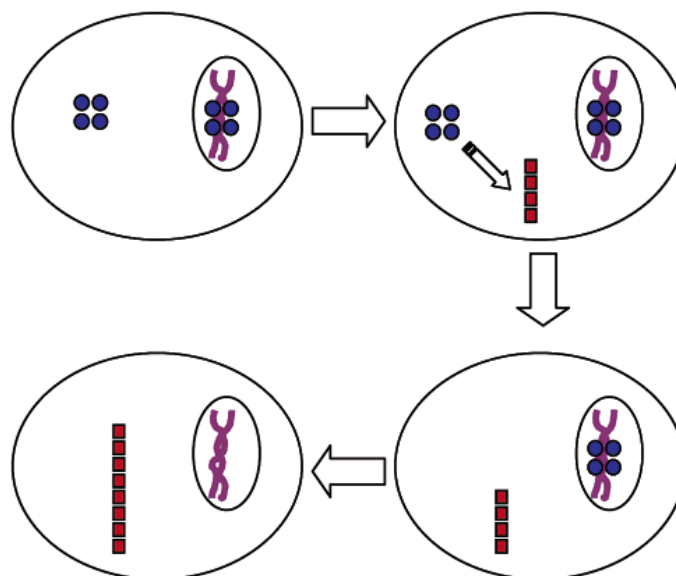


FIGURA 13 - Modelo de agregação de p53. Conversão da p53 selvagem e ativa (círculos azuis) em agregados (quadrados vermelhos) no citoplasma. Proteínas do núcleo também seriam dirigidas a conformação de agregados, tornando inativas as proteínas selvagens. DNA está representado em roxo (Fonte: Silva JL et al, 2010).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a análise das mutantes de p53 em casos de câncer de mama. Estas mutantes foram estudadas quanto ao seu comportamento na formação de agregados em tumores de mama, já que até o momento foram realizados apenas estudos “in vitro”.

Objetivos específicos:

1 – Determinação de mutações em *TP53* em biópsias de câncer de mama, de mulheres residentes na cidade do Rio de Janeiro.

2 – Estudo da presença de agregados proteicos resultante de mutações, em cortes histológicos dos tumores de mama, através dos anticorpos A11, que reconhece oligômeros pré-fibrilares e DO-1, que reconhece a p53.

3 – Estudo da associação entre a proteína mutante e os aspectos clínico-patológicos das neoplasias.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – MATERIAL

1.1 - Amostras biológicas de pacientes com câncer de mama

Neste trabalho, foram analisadas amostras de biópsias de tumores de mama esporádicos obtidas de 88 pacientes submetidos à cirurgia no Instituto Fernandes Figueira (IFF - Fiocruz) entre os anos de 2006 e 2009. Para este estudo, foram obtidas amostras de tecido fresco e de tecido arquivado destes tumores. As amostras de tecido fresco foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após a cirurgia e posteriormente armazenados a -80°C. Já as amostras de tecido arquivado foram fixadas em formol e incluídas em parafina, fazendo parte do acervo do Departamento de Patologia, tendo sido cedidas para este estudo pela Dra. Elizabeth Avvad.

Os dados clínico-patológicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos do IFF. As análises imunohistoquímicas quanto à expressão de p53, receptores de estrogênio e progesterona foram realizadas pela Dra. Elizabeth Avvad. A obtenção das amostras ocorreu conforme designado pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP).

2 – MÉTODOS

2.1 – Extração de DNA genômico de biópsias de tecidos mamários frescos

A extração de DNA foi realizada pelo método de “salting-out” (Miller et al, 1988). Nesta técnica, o DNA foi extraído a partir de 0,1 g de amostra de tumor. A estas amostras foram adicionados 1,2 mL da solução de digestão (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8 e SDS 0,5 %) e o tecido foi macerado o máximo possível. Em seguida, adicionou-se 10 µL de proteinase K a 25 mg/mL. As amostras foram incubadas por 12 horas a

57°C. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm para a retirada dos pedaços que não foram digeridos (centrífuga EPPENDORF modelo 5417R). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e adicionou-se 300 µL de NaCl saturado (aproximadamente 5 M). Centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm e, com isso, transferiu-se o sobrenadante para tubos de ensaio onde se acrescentou 3 vezes o seu volume de etanol absoluto (MERCK) para precipitação do DNA. Uma vez precipitado, o DNA foi retirado com o auxílio de varinhas de vidro estéreis e lavado com etanol 70% (MERCK), para a remoção do excesso de sal. Após a secagem do DNA a temperatura ambiente, este foi ressuscitado em aproximadamente 500 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) e dissolvido a 37°C por aproximadamente duas horas.

2.2 – Verificação da qualidade do DNA extraído e quantificação

Para se verificar a qualidade do DNA genômico extraído foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% (INVITROGEN), corado com brometo de etídeo 0,5 µg / µL em solução de agarose dissolvida em TAE 1x (0,04 M de Tris-base; 1 M de ácido acético glacial; 50 mM de EDTA pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram misturadas com tampão de aplicação concentrado 6x (azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 %, glicerol 50 %) e a eletroforese foi realizada em cuba horizontal (GIBCO BRL – HORIZON 58), a 70V por aproximadamente 20 minutos. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20).

Para a quantificação das amostras, uma alíquota foi diluída 14 vezes e o DNA foi quantificado através da absorbância medida em 260 nm (detecção de ácidos nucleicos) e 280 nm (detecção de proteínas) em espectrofotômetro (Eppendorf Biophotomer). Os resultados foram obtidos em ng/ µL e a razão entre ácidos nucleicos e proteínas foi igual ou maior a 1,75, considerada adequada.

2.3 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi utilizada para amplificar regiões específicas do gene *TP53* (exons 5 a 10). Uma mistura de 50 μL foi feita para a PCR dos exons 5 a 8, composta de: 5 μL de Tampão 10x (Tris-HCl 75 mM pH 9,0, KCl 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM - BIOTOOLS), 4 μL de dNTP 2 mM, 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 1,5 μL do iniciador senso (10 pmol/ μL), 1,5 μL do iniciador antisenso (10 pmol/ μL), 1 μL de DNA polimerase (1 U/ μL), água ultra-pura estéril e DNA genômico (100 a 200 ng). Para os exons 9 e 10, a mistura da PCR foi semelhante a anterior com as seguintes alterações: no exon 9, 3 μL de MgCl_2 50 mM e no exon 10, 2 μL de iniciador senso e antisenso (10 pmol/ μL) e 2 μL de MgCl_2 50 mM. A **TABELA 2** mostra os iniciadores utilizados.

A reação dos exons 5 a 8 foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial; 34 ciclos divididos em 3 etapas, desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. No caso do exon 9, as condições foram semelhantes, sendo que a temperatura de anelamento era de 54°C. No exon 10, foi utilizado 1 ciclo a 94°C por 10 minutos para a desnaturação inicial; 50 ciclos divididos em 3 etapas, desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de anelamento a 58.5 - 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

TABELA 2 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR do gene *TP53*.

Exon	Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento
5	236 Senso	5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3'	310 pb
	270 Antisenso	5' AGCAATCAGTGAGGAATCAG 3'	
6	234 Senso	5' TGGTTGCCCCAGGGTCCCCAG 3'	224 pb
	256 Antisenso	5' CGGAGGGCCACTGACAACCA 3'	
7	333 Senso	5' CTTGCCACAGGTCTCCCCAA 3'	237 pb
	313 Antisenso	5' AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA 3'	

8	314 Senso	5' TTGGGAGTAGATGGAGCCT 3'	313 pb
	320 Antisenso	5' AGAGGCAAGGAAAGGTGATA 3'	
9	318 Senso	5' CCAAGGGTGCAGTTATGCCT 3'	184 pb
	315 Antisenso	5' AGTGTTAGACTGGAAACTTT 3'	
10	E10Li Senso	5' CAATTGTAACCTGAACCATC 3'	260 pb
	562 Antisenso	5' GGATGAGAATGGAATCCTAT 3'	

2.4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%

A eletroforese em gel de agarose foi realizada para se verificar a amplificação dos produtos de PCR. O gel de agarose 1,5% foi preparado com 0,60 g de agarose (INVITROGEN), dissolvido em 30 mL de TAE 1x e corado com brometo de etídeo (0,5 µg / µL). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (GIBCO BRL – HORIZON 58) com TAE 1x a 70V por 20 minutos. Foram analisados no gel 5 µL do produto de PCR, com o auxílio de um padrão de peso molecular (Gene Ruler TM 50 bp DNA Ladder - Fermentas). O produto foi misturado com 1 µL de tampão de aplicação concentrado 6x. O resultado foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20).

2.5 – Purificação das amostras

Para a remoção de resíduos provenientes da PCR, foi realizada a purificação das amostras a serem sequenciadas com o Kit AccuPrep® PCR Purification - Bioneer. Inicialmente adicionou-se 5 volumes de PCR Binding Buffer ao produto de PCR e misturou-se pelo vortex. Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo coletor contendo uma coluna e foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto (centrífuga EPPENDORF modelo 5417R), sendo o sobrenadante descartado após a centrifugação. Posteriormente, adicionou-se 500 µL do Buffer 2, para eliminar as impurezas do produto, centrifugou-se a 13000 rpm por 1

minuto e descartou-se o sobrenadante. Novamente, repetiu-se o passo anterior. A seguir, centrifugou-se a 13000 rpm por 1 minuto, para remover o restante de etanol do produto. Com isso, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 μ L de Buffer 3 para a eluição do produto, incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a 13000 rpm por 1 minuto. Os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20° C.

2.6 – Sequenciamento

Para se analisar a presença de alterações no gene TP53 foi realizado o sequenciamento das amostras tumorais. Antes de se iniciar o preparo das reações de sequenciamento foi feita a quantificação dos produtos de PCR purificados no espectrofotômetro (Eppendorf Biophotomer). As alíquotas dos produtos foram diluídas 14 vezes e quantificadas a 260 nm e 280 nm. Com isso, se iniciou o preparo das reações de sequenciamento, onde, quando o tamanho do produto de PCR era de 100 a 200 pb, colocou-se de 1 a 3 ng de amostra e quando era de 200 a 500 pb colocou-se de 3 a 10 ng de amostra. A seguir, adicionou-se a reação 1 μ L de iniciador a 3,2 pmol/ μ L, para cada produto de PCR foram realizadas duas reações, cada uma com iniciador senso ou antisenso. Então, acrescentou-se 1,5 μ L de BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5X) e 1 μ L do Ready Reaction Premix do kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Finalmente, colocou-se água ultra-pura estéril para completar o volume final de 20 μ L. A reação foi, então, levada para o termociclador Veriti (Applied Biosystems) onde foram realizados 35 ciclos divididos em 3 etapas: desnaturação a 96° C por 15 segundos, anelamento a 50° C por 10 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos; 1 ciclo a 14° C por 30 minutos.

Após a PCR, foi realizada a precipitação da reação de sequenciamento. Inicialmente, adicionou-se ao tubo da reação 64 μ L de etanol absoluto gelado e este conteúdo foi transferido para um eppendorf novo de 0,5 mL. Em seguida, acrescentou-se 16 μ L de água ultra-pura estéril e misturou-se em vortex por 15 segundos. As amostras, então, foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos (centrífuga EPPENDORF modelo 5417R), sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, colocou-se 250 μ L de Etanol 70% gelado, misturou-se pelo vortex por 15 segundos e centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com muito cuidado,

com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, os tubos foram deixados abertos em uma estante envolvida por papel alumínio com perfurações, para permitir a evaporação do etanol, dentro de um isopor fechado até a secagem do conteúdo dos tubos. Com a secagem do conteúdo, os tubos foram fechados e armazenados a -20°C até o momento de desnaturação. Para a desnaturação dos produtos, adicionou-se $10\ \mu\text{L}$ de formamida deionizada (Hi-Di, Applied Biosystems), misturou-se e desnaturou-se a 95°C por 5 minutos no termociclador. Com isso, as amostras foram mantidas no gelo até o momento de se colocar no sequenciador 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems da Plataforma Genômica da UERJ.

2.7 – Imunohistoquímica

Após a análise de mutações no gene *TP53*, foi feita a imunohistoquímica para se verificar a presença de agregados de p53 nos tecidos de mama incluídos em parafina com o kit Mach1 Universal HRP – Polymer Detection (Biocare Medical). Primeiramente, foram feitos cortes histológicos de $5\ \mu\text{m}$ de espessura e colocados na estufa a 58°C por 20 minutos. Em seguida, foram desparafinizados com 3 banhos de xilol e hidratados com 3 banhos de álcool a 100%, 90% e 70%, respectivamente, e 1 banho de água destilada (20 imersões cada banho). Então, os cortes foram imersos no tampão Citrato $10\ \text{mM}$ pH 6,0 a 95°C por 20 minutos para a recuperação antigênica e imediatamente colocados na água destilada. Após, para se bloquear a peroxidase endógena, foi aplicado $200\ \mu\text{L}$ de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 5 minutos e lavados em água destilada e em tampão Tris-HCl $0,1\ \text{M}$ pH 7,4. Então, foi adicionado $200\ \mu\text{L}$ da solução Background Sniper (do kit Mach1 Universal HRP – Polymer Detection) por 15 minutos, esta solução foi utilizada para bloquear os sítios inespecíficos. Com isso, os cortes foram incubados por 20 horas com os anticorpos primários para p53 (DO-1, anticorpo monoclonal de camundongo; 1:2000; Invitrogen) ou agregados proteicos (A11, anticorpo policlonal de coelho; 1:2000; Chemicon) (Glabe, 2004). Posteriormente, eles foram lavados com tampão Tris-HCl $0,1\ \text{M}$ pH 7,4 por 2 minutos e, a seguir, os cortes tratados com o anticorpo A11 foram incubados com Mach 1 Universal HRP-Polimer por 30 minutos. Já os cortes tratados com DO-1 foram, primeiramente, incubados por 10 minutos com Mach 1 Mouse probe (apenas detecta anticorpos monoclonais de camundongo), lavados com tampão Tris-HCl $0,1\ \text{M}$ pH 7,4 por 5 minutos e, posteriormente, incubados com Mach 1 Universal HRP-Polimer por 30 minutos. Depois, foram revelados com

Betazoid DAB Chromogen (1 gota de Betazoid DAB Chromogen a cada 12 mL de Betazoid DAB substrate Buffer), lavados em água destilada e contrastados com hematoxilina por 15 segundos.

2.8 - Imunofluorescência

Também foi realizada a imunofluorescência dos tecidos incluídos em parafina, para se visualizar a co-localização dos anticorpos da p53 e agregados de proteína. Logo, foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura e colocados em lâminas silanizadas. A seguir, foram colocados em estufa a 58°C por 20 minutos, desparafinizados com 3 banhos de xilol (5 minutos cada banho) e hidratados com 3 banhos de álcool a 100%, 90% e 70%, respectivamente, e 1 banho de água destilada (2 minutos cada banho). Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos no tampão Citrato 10 mM pH 6,0 a 55°C por 20 minutos e ambientalizados por 30 minutos. Então, foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS 1x pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄) e colocados em PBS/BSA 5% por 1 hora para bloquear ligação inespecífica. Com isso, os tecidos foram, primeiramente, incubados “overnight” com o anticorpo primário para agregados proteicos (A11, anticorpo policlonal de coelho; 1:2000; Chemicon), mantidos em PBS/BSA 5% por 20 minutos e lavados 5 vezes por 5 minutos com PBS 1x. Estes foram incubados com o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa (anti-coelho com Alexa 555 obtido em burro; 1:2000; Molecular Probes) por 1 hora, lavados 5 vezes por 5 minutos com PBS 1x e colocados em PBS/BSA 5% por 1 hora. Após esta etapa, estes foram incubados por 20 horas com anticorpo primário para p53 (DO-1, anticorpo monoclonal de camundongo; 1:200; Invitrogen). Em seguida, foram mantidos em PBS/BSA 5% por 20 minutos e lavados 5 vezes por 5 minutos com PBS 1x. Então, foram incubados com o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa (anti-camundongo com Alexa 488 obtido em burro; 1:200; Molecular Probes) por 1 hora, lavados 5 vezes por 5 minutos com PBS 1x e 3 vezes por 2 minutos com água destilada. Com isso, os tecidos foram visualizados no Microscópio Confocal 510 Meta Zeiss do LABMEL – Laboratório de Microscopia Eletrônica/ UERJ.

2.9 - Mutação sítio-dirigida

A técnica da mutação sítio-dirigida permite que os iniciadores induzam a mutação sítio específica no plasmídeo contendo o fragmento correspondente ao domínio central da p53 (pET11a) ou a p53 inteira (pRSETb e pcDNA), através de PCR. Estes iniciadores apresentam as seguintes mutações desejadas: R248W, R248P, R282P, R337H, R72 e P72 (**TABELA 3**). Os plasmídeos pET11a e pRSETb foram cedidos pelo Dr. Jerson Lima (IBQ/UFRJ) e o plasmídeo pcDNA foi cedido pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC). Para uma reação de 50 μ L foram utilizados: 5 μ L de Tampão 10x, 5 μ L de dNTP 2 mM, 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 5 μ L de iniciador senso e antisenso (10 pmol/ μ L), 1 μ L de Pfu DNA polimerase (1 U/ μ L), água ultra-pura estéril e DNA plasmidial (50-100 ng). A reação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) com as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo a 95°C por 30 segundos para a desnaturação inicial; 12 ciclos divididos em 3 etapas, desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido de anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 74°C por 13 minutos; 4°C por 10 minutos.

TABELA 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR sítio dirigida.

Iniciador	Sequência
R248W Senso	5' GCA TGA ACT GGA GGC CCA TCC TCA CC 3'
R248W Antisenso	5' GGT GAG GAT GGG CCT CCA GTT CAT GC 3'
R248P Senso	5' GCA TGA ACC CGA GGC CCA TCC TCA CC 3'
R248P Antisenso	5' GGT GAG GAT GGG CCT CGG GTT CAT GC 3'
R282P Senso	5' TGG GAG AGA CCC GCG CAC AGA GGA AGA G 3'
R282P Antisenso	5' CTC TTC CTC TGT GCG CGG GTC TCT CCC A 3'
R337H Senso	5' TCC GTG GGC GTG AGC ACT TCG AGA TGT TC 3'
R337H Antisenso	5' GAA CAT CTC GAA GTG CTC ACG CCC ACG GA 3'

R72 Senso	5' AGA GGC TGC TCC CCG CGT GGC CCC TGC 3'
R72 Antisenso	5' GCA GGG GCC ACG CGG GGA GCA GCC TCT 3'
P72 Senso	5' AGA GGC TGC TCC CCC CGT GGC CCC TGC 3'
P72 Antisenso	5' GCA GGG GCC ACG GGG GGA GCA GCC TCT 3'

2.10 – Análise Estatística

Para se correlacionar os dados clínico-patológicos e os resultados do estudo da presença ou não de mutações no gene *TP53* foram realizados o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher no software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

1- Análise de mutações no gene *TP53* e o câncer de mama

Para este estudo foram analisados 88 casos de câncer de mama de pacientes do Instituto Fernandes Figueira (IFF) quanto à presença ou não de mutação nos exons 5 a 10 do gene *TP53*. As características clínico-patológicas das amostras utilizadas neste trabalho estão apresentadas na **TABELA 4**.

TABELA 4 - Características clínico-patológicas das amostras analisadas. *: Tumores onde normalmente não se aplica a graduação histológica de Elston; RP: expressão do receptor de progesterona; RE: expressão do receptor de estrogênio; P53: expressão da proteína P53; +: proteína expressa em altos níveis; -: proteína expressa em baixos níveis. X: Não foi possível realizar a imunohistoquímica nas amostras.

Tumor	Idade	Diagnóstico	Grau de Elston	RP	RE	P53
T1	68	Ductal Infiltrante	II	-	-	+
T2	54	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T4	51	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T5	56	Intraductal	II	X	X	X
T6	58	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T8	51	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T9	63	Lobular Infiltrante	*	-	+	-
T10	46	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T11	29	Papilífero Intracístico	*	+	+	-
T14	56	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T15	44	Ductal Infiltrante	II	-	+	+
T16	50	Ductal Infiltrante	I	-	+	-
T17	48	Ductal Infiltrante	II	-	-	-
T18	57	Ductal Infiltrante	III	+	+	-
T19	52	Mucinoso	I	+	+	-
T21	41	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T22	63	Ductal Infiltrante	II	-	-	-
T23	57	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T24	47	Ductal Infiltrante	II	-	+	-
T25	48	Ductal Infiltrante	II	-	+	-
T26	61	Ductal Infiltrante	III	-	-	-

T27	74	Papilífero Infiltrante	II	-	+	-
T28	47	Ductal Infiltrante	II	-	+	-
T29	70	Papilífero Infiltrante	I	+	+	-
T31	38	Micropapilífero infiltrante	II	-	-	-
T32	50	Ductal Infiltrante	I	-	+	-
T33	57	Ductal Infiltrante	III	-	+	-
T34	46	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T35	49	Ductal Infiltrante	II	+	-	-
T36	54	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T37	48	Mucinoso	III	-	+	-
T38	61	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T39	51	Ductal Infiltrante	I	-	-	+
T40	67	Ductal Infiltrante	III	-	+	+
T41	28	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T42	42	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T43	53	Intraductal	*	-	-	-
T44	59	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T45	72	Lobular Infiltrante	*	+	+	-
T46	45	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T47	72	Ductal Infiltrante	II	+	+	+
T48	40	Ductal Infiltrante	II	-	-	+
T49	36	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T50	42	Lobular Infiltrante	*	+	+	+
T52	40	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T53	60	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T55	41	Apócrino Infiltrante	II	-	+	-
T56	74	Ductal Infiltrante	II	-	+	-
T58	71	Lobular Infiltrante	*	+	+	-
T59	46	Apócrino Infiltrante	II	-	-	+
T60	58	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T61	44	Ductal Infiltrante	II	+	+	+
T62	76	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T63	71	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T64	53	Mucinoso	II	X	X	X
T65	53	Papilífero Infiltrante	II	-	+	-
T67	70	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T68	59	Micropapilífero Infiltrante	III	-	-	+
T69	72	Lobular Infiltrante	*	+	+	+
T70	50	Ductal Infiltrante	III	+	+	-
T71	63	Lobular Infiltrante	*	+	+	+
T72	68	Ductal Infiltrante	III	-	-	+
T73	63	Papilífero Infiltrante	III	-	-	-
T74	75	Ductal Infiltrante	III	-	-	+

T75	41	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T76	60	Micropapilífero Infiltrante	II	+	+	-
T77	47	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T78	67	Ductal Infiltrante	I	+	+	-
T79	49	Ductal Infiltrante	II	-	+	-
T80	28	Intraductal	*	X	X	X
T81	47	Ductal Infiltrante	II	+	+	-
T82	69	Micropapilífero Infiltrante	II	+	+	-
T83	49	Infiltrante Misto	II	+	+	-
T85	61	Apócrino Infiltrante	II	X	X	X
T86	49	Ductal Infiltrante	II	-	-	+
T87	47	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T88	42	Intraductal	*	X	X	X
T89	44	Lobular Infiltrante	*	X	X	X
T90	60	Ductal Infiltrante	III	X	X	X
T91	59	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T92	50	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T93	61	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T94	45	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T95	53	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T96	48	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T97	48	Ductal Infiltrante	II	X	X	X
T98	43	Ductal Infiltrante	I	X	X	X
T99	73	Ductal Infiltrante	I	X	X	X

A partir do sequenciamento destas amostras foram encontradas 17 mutações no gene *TP53*, representando 19% dos casos analisados (**TABELA 5 e FIGURA 14**). Destas, foram encontradas 5 mutações “hotspot” (2 R175H, 1 G245S, 1 R248Q e 1 R273H). A maioria das mutações ocorreram na região de ligação ao DNA (exon 5 a 8), ocasionando a perda da capacidade da p53 de transativação de genes-alvo, e apenas duas mutações estão localizadas no domínio de oligomerização (exon 10). Todas as alterações apresentaram efeito deletério.

TABELA 5 – Mutações encontradas no gene *TP53* e o efeito na função da proteína (baseado nos dados apresentados pelo IARC).

Tumor	Tipo histológico	Grau de Elston	Mutação	Tipo de mutação	Efeito
T2	Ductal Infiltrante	I	G245S	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
T6	Ductal Infiltrante	III	H193L	“Missense”	Perda de função
T10	Ductal Infiltrante	III	R248Q	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
T18	Ductal Infiltrante	III	R175H	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
T19	Mucinoso	I	H168P	“Missense”	Perda de função
T21	Ductal Infiltrante	III	R273H	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
T31	Micropapilifero Infiltrante	II	16888delC	Deleção	Perda de função
T33	Ductal Infiltrante	III	16897-16911del	Deleção	Perda de função
T34	Ductal Infiltrante	III	Y234C	“Missense”	Perda de função, dominante negativo
T40	Ductal Infiltrante	III	I195L	“Missense”	Perda de função
T55	Apócrino Infiltrante	II	W146X	“Nonsense”	Perda de função
T59	Apócrino Infiltrante	II	P278A	“Missense”	Perda de função
T64	Mucinoso	II	12444-12445 insT	Inserção	Perda de função
T67	Ductal Infiltrante	II	R213X	“Nonsense”	Perda de função,
T72	Ductal Infiltrante	III	R175H	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
T76	Micropapilifero Infiltrante	II	D259V	“Missense”	Perda de função, dominante negativo

T90	Ductal Infiltrante	III	Y205C	“Missense”	Perda de função, dominante negativo, ganho de função oncogênica
-----	--------------------	-----	-------	------------	---

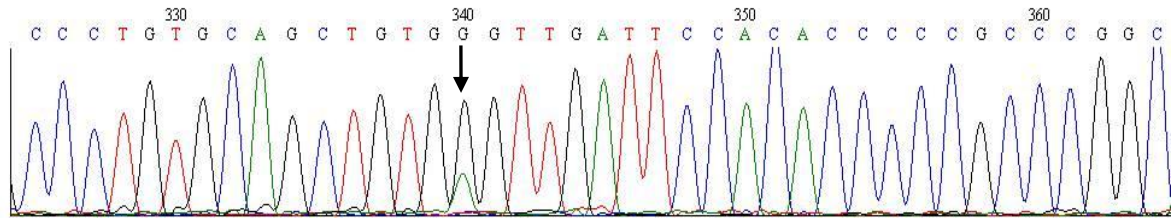


FIGURA 14 - Eletroferograma mostrando o sequenciamento de um dos tumores. Neste caso observa-se a mutação “nonsense” W146X na amostra T55. A seta vertical indica a mutação no gene *TP53*.

A **TABELA 6** apresenta a correlação entre as características clínico-patológicas das amostras e a análise da presença ou não de mutações no gene *TP53*. Nesta correlação foi observado que os tumores com mutações no gene *TP53* apresentavam uma maior agressividade. Já as outras características analisadas não obtiveram significância estatística.

TABELA 6 - Correlação entre as características clínico-patológicas das amostras de câncer de mama e a análise da presença ou não de mutações no gene *TP53*. N: número de amostras; GE: grau de Elston; RE: expressão do receptor de estrogênio; RP: expressão do receptor de progesterona; p53: expressão da proteína p53; ND: número de amostras sem dados; *: amostras com tipos histológicos onde normalmente não se aplica a graduação de Elston não foram incluídas. Foi realizado o teste de Fisher ou Qui-quadrado, sendo o valor de $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

	N	%	P53 Mutada		
			Não	Sim	
Idade					
< 45	17	19,3	14	3	p = 1,0000
≥ 45	71	80,7	57	14	
GE*					
I	15	17	13	2	p = 0,0011
II	46	52,3	40	6	
III	16	18,2	7	9	
I + II	61	69,3	53	8	p = 0,0008
III	16	18,2	7	9	
RP					
+	35	39,8	31	4	p = 0,1336
-	34	38,6	24	10	
ND	19	21,6			
RE					
+	49	55,7	42	7	p = 0,0951
-	20	22,7	13	7	
ND	19	21,6			
p53					
+	20	22,7	13	7	p = 0,0951
-	49	55,7	42	7	
ND	19	21,6			

Para melhor entender o papel das p53 mutantes, realizamos a análise apenas nos subtipos CDI encontrados em 61 dos casos analisados. Nesta análise foi observada uma associação entre a presença de mutações e a agressividade tumoral ($p < 0,0001$) e também

uma relação entre a expressão da p53 e a presença de mutações ($p=0,0184$), conforme mostra a TABELA 7.

TABELA 7 - Correlação entre as características clínico-patológicas de amostras de câncer de mama apenas de subtipo CDI e a análise da presença ou não de mutações no gene *TP53*. N: número de amostras; GE: grau de Elston; RE: expressão do receptor de estrogênio; RP: expressão do receptor de progesterona; p53: expressão da proteína p53; NI: número de amostras sem dados; Foi realizado o teste de Fisher ou Qui-quadrado, sendo o valor de $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

		P53 Mutada				
		N	%	Não	Sim	
Idade						
< 45	10	16,4	9	1	$p = 0,6726$	
≥ 45	51	83,6	41	10		
GE						
I	13	21,3	12	1	$p < 0,0001$	
II	35	57,4	34	1		
III	13	21,3	4	9		
I + II	48	78,7	46	2	$p < 0,0001$	
III	13	21,3	4	9		
RP						
+	24	39,3	22	2	$p = 0,1365$	
-	24	39,3	17	7		
ND	13	21,4				
RE						
+	33	54,1	29	4	$p = 0,1147$	
-	15	24,6	10	5		
ND	13	21,3				
p53						
+	15	24,6	9	6	$p = 0,0184$	
-	33	54,1	30	3		
ND	13	21,3				

2 – Estudo da presença de agregados de p53 em tumores de mama

Para esta análise foram selecionados 15 amostras de tecidos de mama que apresentavam a p53 selvagem e mutada, neste caso foram estudados principalmente tecidos do tipo CDI e com mutações “missense”. A partir da imunohistoquímica (**FIGURA 15**) destes tecidos, observamos uma marcação no citoplasma apenas para o A11 no tecido normal e no tecido tumoral com mutação verificamos a marcação para p53 principalmente no núcleo e para o A11 no citoplasma. Devido a dificuldade para analisar a co-localização, foi realizado o ensaio por imunofluorescência, já que esta técnica é mais sensível para esse tipo de estudo. Neste ensaio foi confirmada a co-localização de agregados de p53 (**TABELA 8 e FIGURAS 16 e 17**).

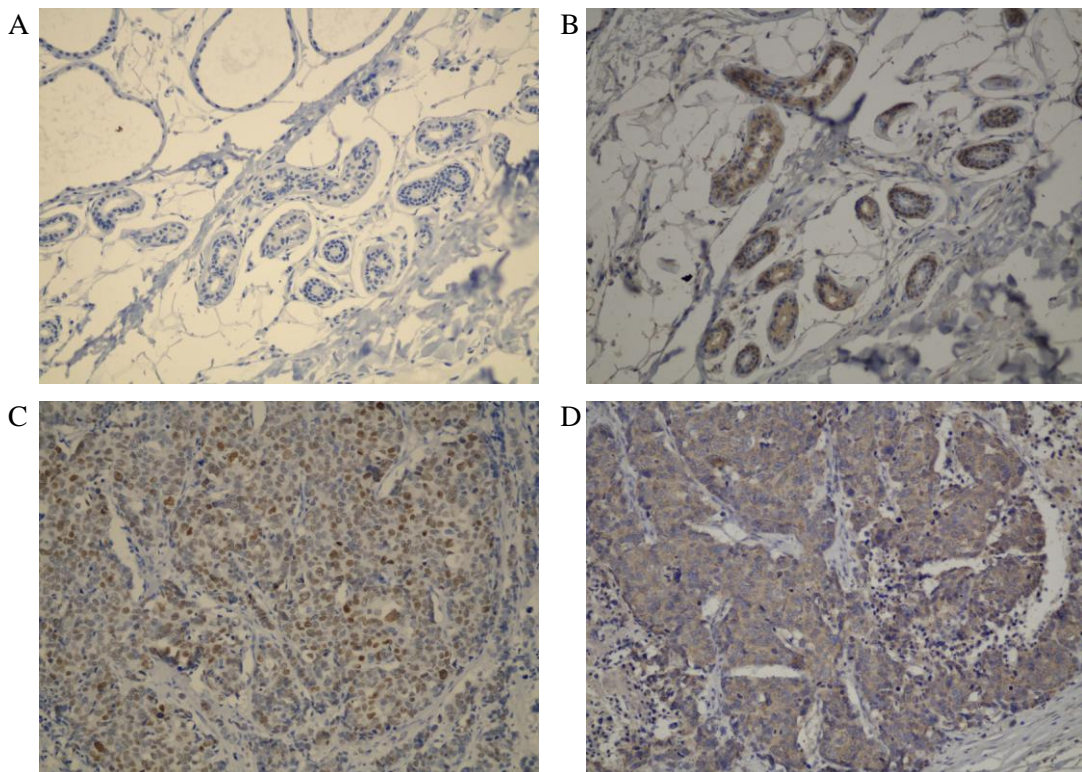


FIGURA 15 – Imunohistoquímica para p53 e A11(aumento de 200x). (A) tecido normal marcado para p53; (B) tecido normal marcado para A11; (C) tecido tumoral mutado (T6 - H193L) marcado para p53; (D) tecido tumoral mutado (T6 - H193L) marcado para A11;

TABELA 8 – Análise da presença de agregados de p53. T: tecido tumoral; N: tecido normal; RP: expressão do receptor de progesterona; RE: expressão do receptor de estrogênio; +: co-localização encontrada em várias células ao longo do tecido; +/-: co-localização encontrada em poucas células ao longo do tecido; -: nenhuma co-localização encontrada ao longo do tecido.; *: não apresenta classificação.

Amostra	Tipo histológico	Grau de Elston	Estado da p53	Expressão da p53	RP	RE	Co-localização
T2	Ductal Infiltrante	I	Mutada G245S	-	+	+	+/-
T6	Ductal Infiltrante	III	Mutada H193L	+	-	-	+/-
T10	Ductal Infiltrante	III	Mutada R248Q	+	-	-	+/-
T18	Ductal Infiltrante	III	Mutada R175H	-	+	+	+/-
T19	Mucinoso	I	Mutada H168P	-	+	+	-
T21	Ductal Infiltrante	III	Mutada R273H	+	-	-	+
T34	Ductal Infiltrante	III	Mutada Y234C	+	-	-	+/-
T36	Ductal Infiltrante	III	Selvagem	+	-	-	-
T39	Ductal Infiltrante	I	Selvagem	+	-	-	+/-
T40	Ductal Infiltrante	III	Mutada I195L	+	-	+	+/-
T48	Ductal Infiltrante	II	Selvagem	+	-	-	-
N55	*	*	Selvagem	*	*	*	-
T59	Apócrino Infiltrante	II	Mutada P278A	+	-	-	+
T72	Ductal Infiltrante	III	Mutada R175H	+	-	-	-
T74	Ductal Infiltrante	III	Selvagem	+	-	-	-

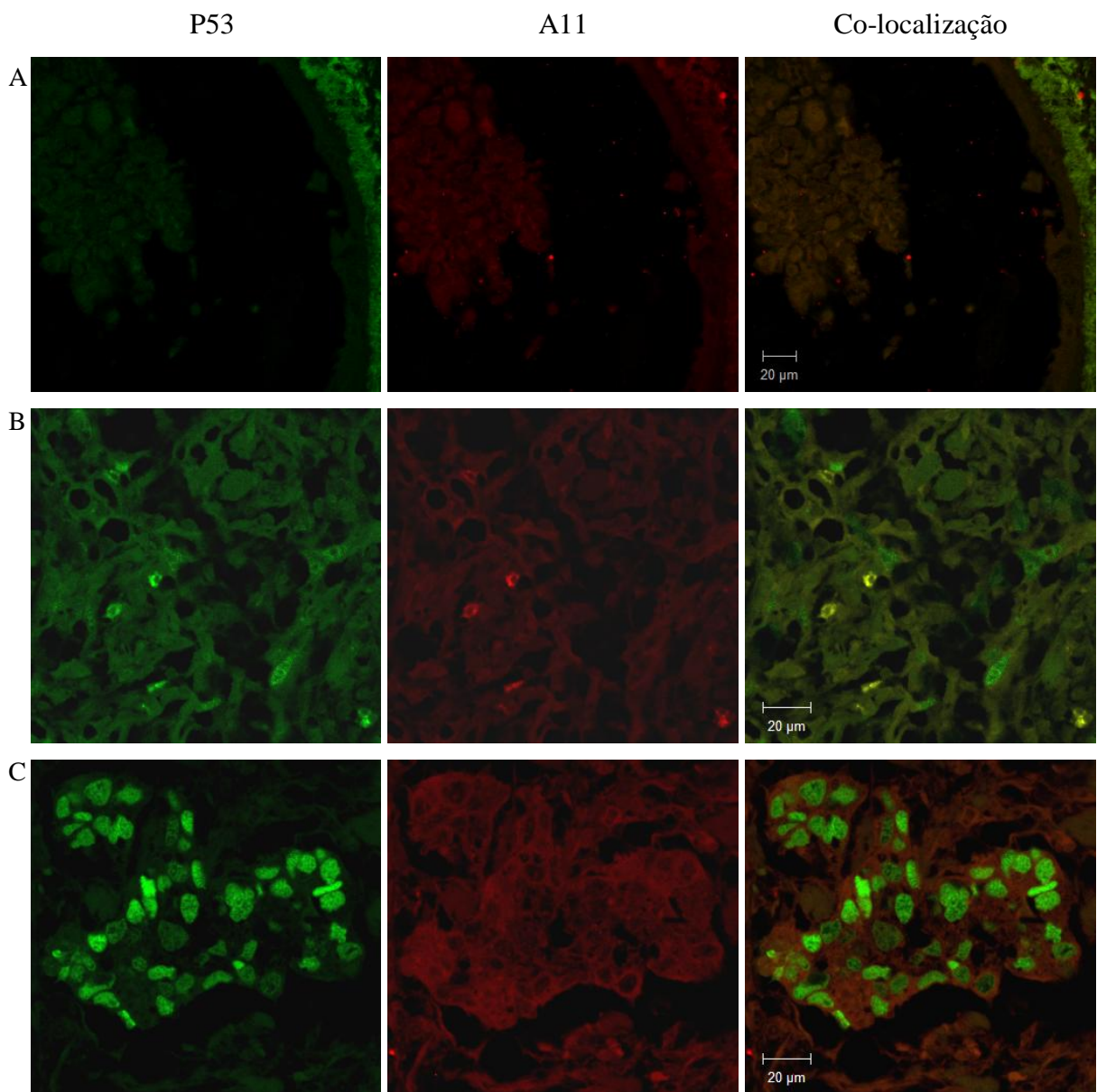
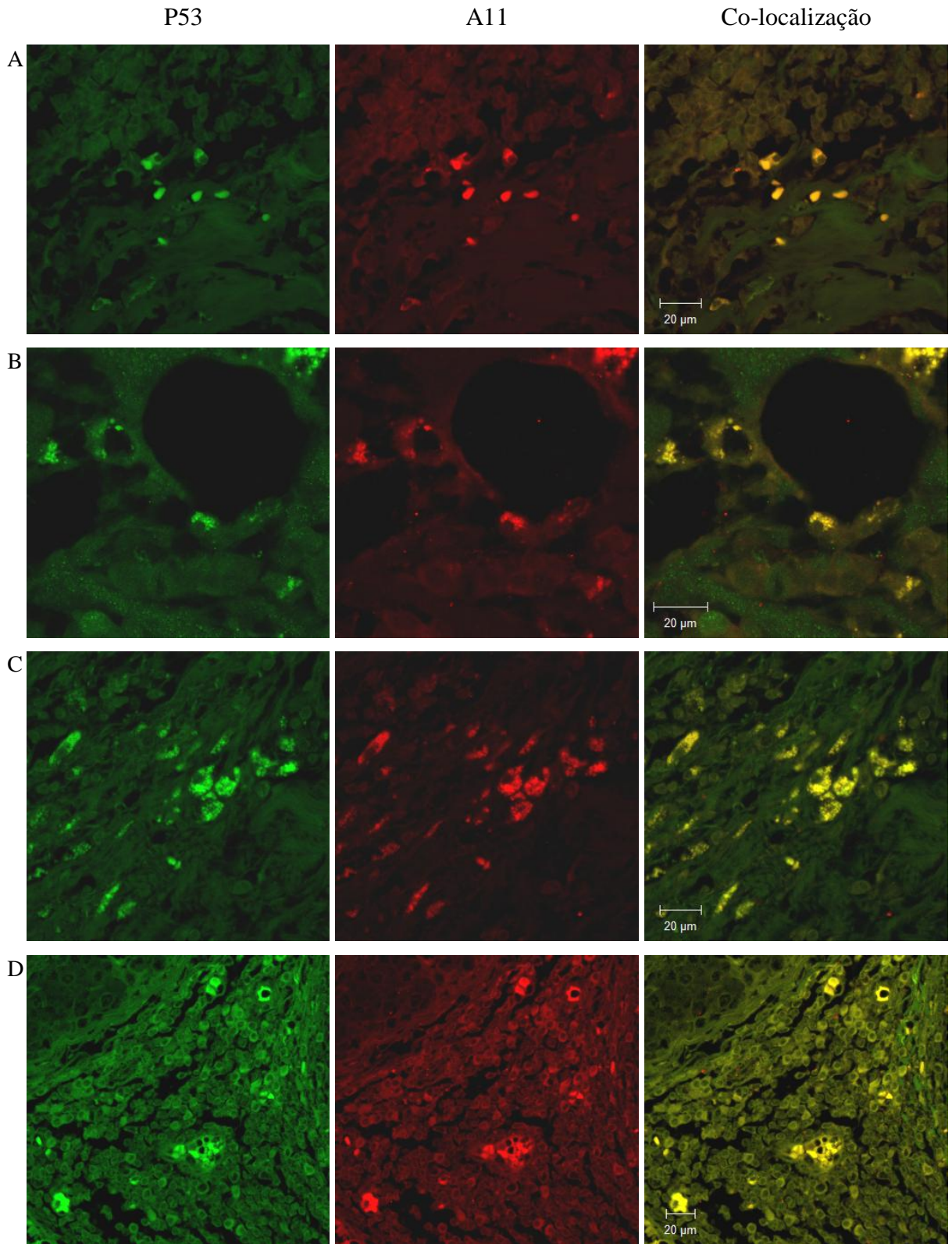
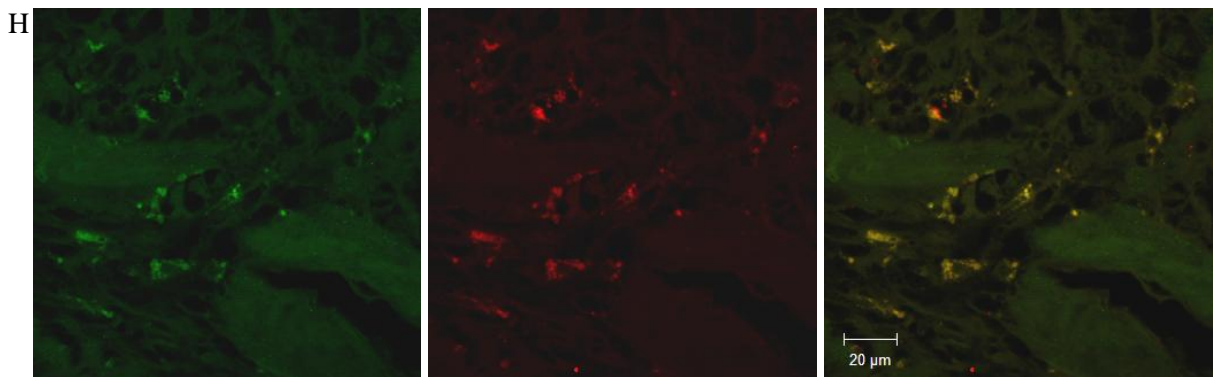
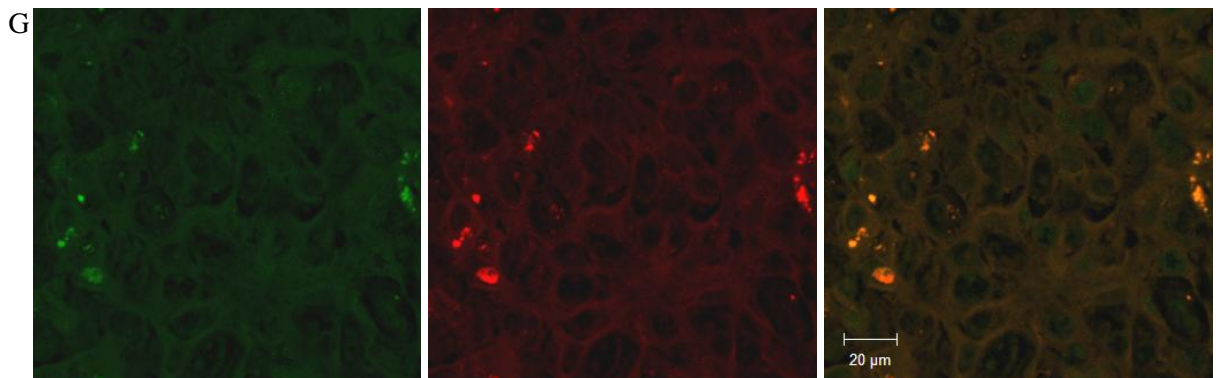
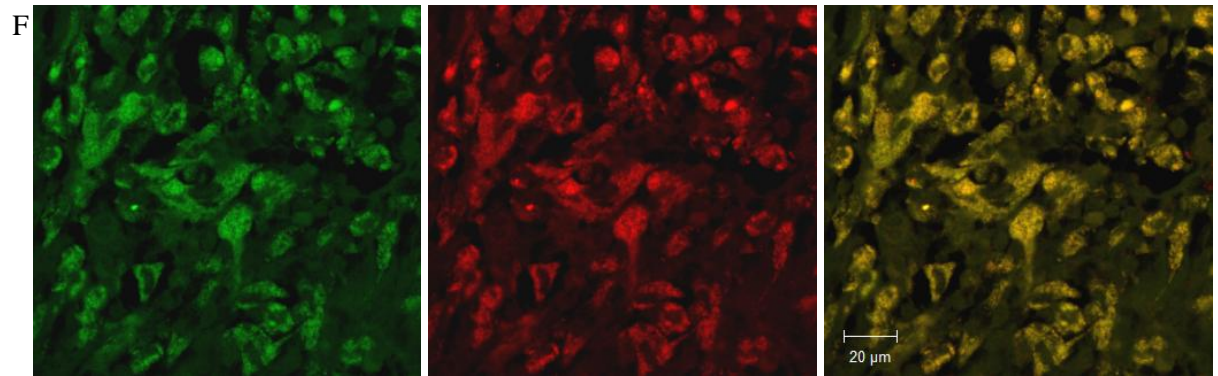
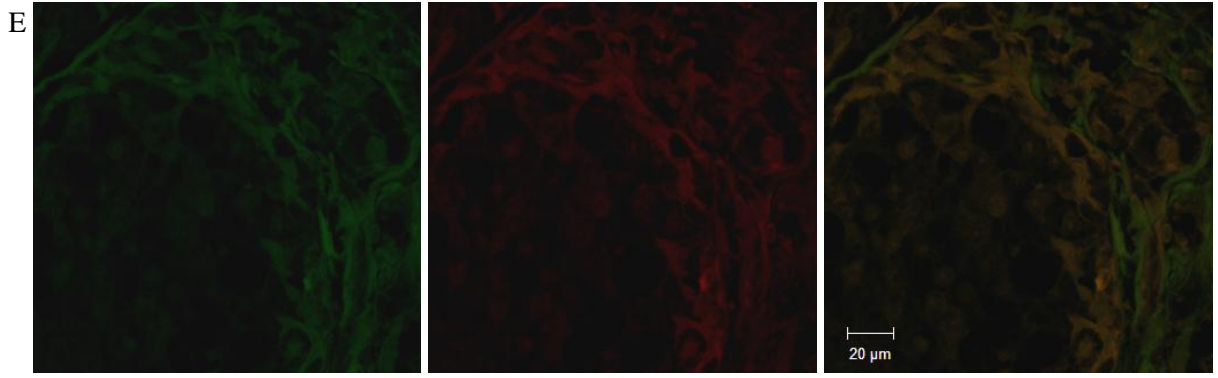


FIGURA 16 – Imunofluorescência mostrando o ensaio de co-localização da p53 selvagem e de agregados proteicos. (A) N55 – tecido normal mostrando a região de ducto mamário; (B) T39 – tecido tumoral com p53 selvagem; (C) T74 – tecido tumoral com p53 selvagem;





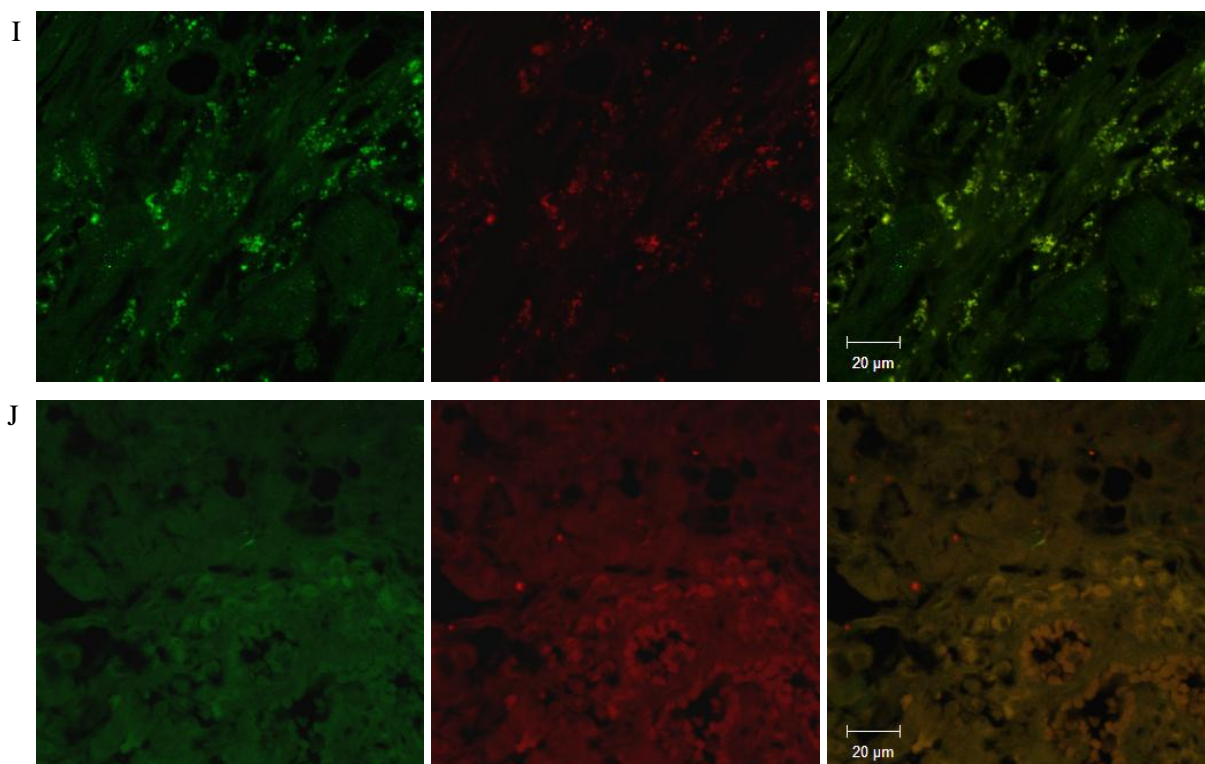


FIGURA 17 – Imunofluorescência mostrando o ensaio de co-localização da p53 mutante e de agregados proteicos. (A) T2 – tecido tumoral com p53 mutante (G245S); (B) T6 – tecido tumoral com p53 mutante (H193L); (C) T10 – tecido tumoral com p53 mutante (R248Q); (D) T18 – tecido tumoral com p53 mutante (R175H); (E) T19 – tecido tumoral com p53 mutante (H168P); (F) T21 – tecido tumoral com p53 mutante (R273H); (G) T34 – tecido tumoral com p53 mutante (Y234C); (H) T40 – tecido tumoral com p53 mutante (I195L); (I) T59 – tecido tumoral com p53 mutante (P278A); (J) T72 – tecido tumoral com p53 mutante (R175H);

Ao se analisar o ensaio de co-localização, a ausência de agregados no tecido normal de mama foi observada, já em uma das amostras de tecido tumoral com p53 selvagem verificou-se a presença de agregados de p53 em poucas células e nas outras a ausência. No caso dos tecidos tumorais mutados notou-se um padrão diferente na co-localização da p53 e agregados proteicos para cada mutante. As mutantes G245S, H193L, R248Q, R175H, Y234C e I195L apresentaram, igualmente, agregados em poucas células, sendo encontrados basicamente no citoplasma. A R175H também apresentou co-localização negativa em outro tumor analisado. Além dessa mutante, a H168P obteve, de mesmo modo, co-localização negativa. Já as mutantes R273H e P278A mostraram-se positivas para co-localização, sendo que a R273H ocorreu principalmente no citoplasma, mas também foi encontrada no núcleo celular e a P278A apenas no citoplasma. Logo, um comportamento diferente de cada p53 mutante foi observado na co-localização.

3 – Mutação sítio-dirigida

Para se estudar a conformação da p53 mutada, foram construídos plasmídeos contendo a região do gene *TP53* correspondente à proteína inteira e ao domínio central, contendo as mutações desejadas (**TABELA 9 e FIGURA 18**).

TABELA 9 – Plasmídeos construídos com as mutações desejadas no gene *TP53*.

Mutação	Plasmídeo		
	pcdna	pRSETb	pet11a
282P	sim	sim	sim
248P	sim	sim	sim
248W	sim	sim	sim
337H	sim	sim	-
P72	sim	sim	-
R72	sim	sim	-

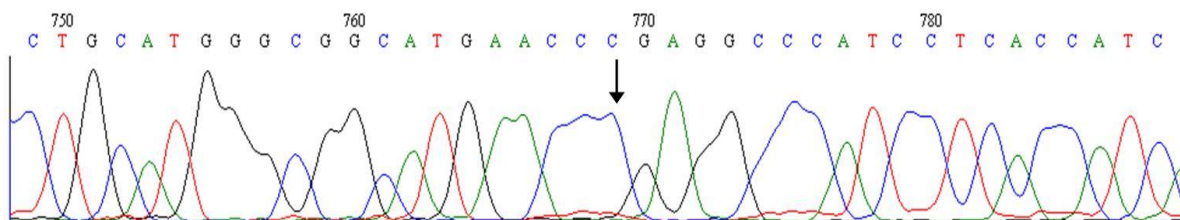


FIGURA 18 - Eletroferograma mostrando a inserção da mutação R248P no plasmídeo com a p53 inteira. A seta vertical indica a mutação.

DISCUSSÃO

O câncer de mama é considerado um problema de Saúde Pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, já que é a malignidade mais comum entre as mulheres, com 1 milhão de novos casos por ano no mundo. Além disso, esta doença está associada a 16% das mortes por câncer em mulheres, sendo a causa mais frequente de mortalidade por câncer (World Health Organization, 2008). Aproximadamente 90% dos casos de câncer de mama são esporádicos, apesar de a história familiar ser considerada um fator de risco, sendo responsável por 5 a 10% dos casos (Tsezou A et al, 2008).

Fatores genéticos podem ser responsáveis para o surgimento do câncer de mama. Um dos mais estudados é a mutação no gene *TP53*. Este gene atua em várias vias controlando a proliferação celular, sobrevivência da célula e integridade genômica (Olivier M et al, 2006). Mutações somáticas neste gene são as mais frequentes alterações encontradas nos carcinomas humanos (Petitjean A et al, 2007b). No câncer mama, a frequência das mutações no *TP53* é em torno de 20 a 50% (Zhou W et al, 2009). A maioria das mutações tendem a se localizar principalmente nos exons 5 a 8, que correspondem ao domínio central de ligação ao DNA. As mutações podem alterar a conformação da proteína, prejudicando sua função de transcrição de genes alvo, logo, perdendo a sua função. De forma interessante, a p53 mutante pode adquirir funções oncogênicas, isto é, passa a ativar genes que anteriormente não eram ativados pela proteína selvagem. Ainda, devido ao efeito dominante negativo, a p53 mutante pode se ligar à p53 selvagem na célula, impedindo a sua atividade normal (Olivier M et al, 2010). Sendo assim, cada mutante pode apresentar um comportamento diferente na célula, o que poderá ocasionar no processo de tumorigênese.

Neste trabalho, estudamos a presença de mutações no gene *TP53* em tumores de mama e analisamos o comportamento das mutantes encontradas nos tecidos tumorais. A pesquisa de mutações foi realizada em 88 amostras de tumores de mama nos exons 5 a 10 deste gene, abrangendo a região de ligação ao DNA e de tetramerização da proteína.

A maioria das pacientes (80,7%) apresentaram idade maior ou igual a 45 anos, sendo compatível ao descrito na literatura por Rudder et al (2008). Neste trabalho, os autores relataram que em 80% dos casos de câncer de mama, as mulheres apresentavam idade maior do que 50 anos, sendo assim a idade avançada um fator de risco para o câncer de mama.

A partir da análise destas amostras, foram encontradas 17 mutações no gene *TP53* (**TABELA 5**), representando 19% dos casos analisados, sendo este valor próximo ao

observado na literatura (20 – 50%) (Zhou et al, 2009). A maioria das mutações encontradas foi do tipo “missense”, conforme observado por Petitjean A et al (2007a). Neste estudo, foi mostrado que 75% das mutações encontradas nos dados do IARC eram “missense”. Olivier M e Hainaut P (2001) relataram que a maioria das mutações (90%) encontradas em tumores de mama ocorre na região de ligação ao DNA (exon 5 a 8). O semelhante foi visto em nosso trabalho (88,2%). Dentre estas mutações, 5 eram “hotspot” (2 R175H, 1 G245S, 1 R248Q e 1 R273H). Estas alterações podem ser mutações de contato (R248 e R273), por alterarem o resíduo de aminoácido de contato com o DNA, tornando muito fraca a afinidade pela ligação ao DNA, e mutações estruturais (R175 e G245), por modificarem a conformação da superfície de ligação ao DNA. Além disso, a mutação R175H, a mais frequente mutante, ocasiona a introdução de um resíduo de histidina, causando distorções que interferem com a ligação ao zinco. Estas modificações na p53 irão levar à sua perda de função (Olivier M et al, 2010).

Ao analisarmos o efeito de cada mutação encontrada nos dados fornecidos pelo IARC, observamos que todas apresentaram efeito deletério, como perda de função, dominante negativo e/ou ganho de função oncogênica. Logo, estas mutantes poderão levar ao acúmulo de alterações genéticas, que poderiam ser impedidas pela ação normal da p53, e podendo ocasionar a formação do câncer.

Para a melhor compreensão dos resultados ao associarmos as características clínico-patológicas das amostras analisadas com a presença de mutações no gene *TP53* (**TABELA 6 e 7**), foi necessário realizarmos a análise estatística em todos os 88 casos, assim como também apenas nas amostras que apresentavam o subtipo carcinoma ductal infiltrante (CDI). O CDI é o subtipo mais comum, representando de 70 a 80% dos casos de câncer de mama e neste estudo, a predominância deste subtipo também foi observada. Além disso, cada subtipo histológico apresenta aspectos clínico-patológicos distintos (Tsuda H, 2009).

Nas análises realizadas, não observamos associação quanto à expressão de receptores de estrogênio e progesterona e a presença de mutação em *TP53*. Berns EM e col (2000), ao analisar 265 casos de câncer de mama, verificou uma correlação entre a expressão negativa de receptores de estrogênio e progesterona com a presença de mutações no *TP53*. O mesmo foi encontrado em um trabalho realizado com 1794 pacientes com câncer de mama na Europa (Olivier M et al, 2006). A presença destes receptores em células tumorais é importante para a resposta a terapias. Tumores com receptor de estrogênio negativo não respondem a terapias como o uso do tamoxifeno. Portanto, tumores que não expressam estes receptores tendem a obter um pior prognóstico (Cleary MP et al, 2010). Provavelmente não observamos estas associações devido ao pequeno número de amostras analisadas.

Já quanto à expressão de p53, notamos significância estatística somente na análise com as amostras de subtipo CDI, onde observamos relação entre a expressão positiva de p53 e a presença de mutação ($p= 0,0184$). Alsner J et al (2008) relataram em seu estudo com 630 pacientes com câncer de mama que a maioria das mutações “missense” apresentavam acúmulo da p53.

Neste trabalho também observamos uma correlação entre a presença de mutações e tumores classificados histologicamente como grau de Elston III, sendo esta graduação relacionada a um tumor mais agressivo. Olivier M et al (2006) igualmente relatou a correlação entre mutações e a graduação histológica dos tumores de mama, e, em trabalho realizado em nosso laboratório (Simão et al, 2002) esta mesma observação foi feita. Olivier M et al (2006) também encontraram uma relação entre a taxa de mortalidade e mutações no gene *TP53*. Logo, mutações no gene *TP53* estão associadas a um pior prognóstico no câncer de mama.

Mutações no *TP53* são mais frequentes em tumores de estágio mais avançado. Além do câncer de mama, mutações no *TP53* em outros tipos de câncer como colo-retal, leucemia, cabeça e pescoço também têm sido associadas com um pior prognóstico (Olivier M et al, 2010).

As mutações no gene *TP53* podem alterar a conformação da proteína e, com isso, apresentar tendência à agregação (Ishimaru D et al, 2003a). Vários trabalhos relatam a formação de agregados fibrilares nos domínios de transativação, central e de oligomerização da p53 em experimentos “in vitro” (Lee AS et al, 2003; Ishimaru D et al, 2003a; Rigacci S et al, 2008). Portanto, neste trabalho, após a determinação das amostras que apresentam mutação, realizamos o estudo para se verificar o comportamento das diversas mutantes quanto à formação de agregados de p53 nos tumores de mama analisados.

Inicialmente, a técnica de imunohistoquímica (**FIGURA 15**) foi utilizada para essa análise e observamos uma marcação inespecífica do anticorpo A11, isto ocorre devido a este anticorpo reconhecer qualquer tipo de oligômeros pré-fibrilares presente na célula. Além disso, notamos a necessidade de uma técnica mais sensível para esse tipo de estudo, já que apresentamos uma dificuldade na visualização da co-localização dos anticorpos para p53 e agregados. Portanto, utilizamos o ensaio de co-localização por imunofluorescência para a análise dos tecidos de mama quanto à presença de agregados de p53 (**FIGURAS 16 e 17**). Esta análise foi feita em toda a extensão dos tecidos de mama.

A partir deste estudo, não observamos a co-localização em tecido normal, já que normalmente a p53 não se apresenta estabilizada nestes tecidos devido a sua degradação ativada pela MDM2. No caso dos tecidos tumorais com p53 selvagem, notamos em um dos

casos analisados a co-localização em poucas células. Este resultado é esperado já que Ishimaru D et al (2003b) mostraram que as moléculas da p53 selvagem podem formar agregados ao serem submetidas a condições amenas de desnaturação tais como alterações na pressão, temperatura e pH. Eles também observaram que ela exibe um comportamento biofísico similar a uma mutante “hot-spot”, sendo neste caso a R248Q. Uma outra explicação para este resultado pode ser devido a origem multiclonal das células de câncer de mama, já que podem ser encontrados vários grupos de células com diferentes características no mesmo tumor. Sendo assim, é necessária a análise de diversas regiões do tumor, porém neste trabalho isto não foi possível. Portanto, pode ser que outras regiões do tumor apresentem células com mutações no *TP53* que não foram detectadas neste estudo.

Ao analisarmos as mutantes da p53 identificadas quanto à tendência a formação de agregados, notamos que a maioria das mutantes apresentavam uma pequena tendência à agregação (G245S, H193L, R248Q, R175H, Y234C e I195L), em algumas uma alta tendência (R273H e P278A) ou nenhuma (H168P). Uma das mutantes analisadas, a R248Q, foi estudada por Ishimaru D et al (2003a) que também relataram a tendência desta mutante a formar agregados fibrilares “in vitro”. Um caso especial que notamos foi o da mutante R175H que apresentou co-localização negativa ou em poucas células em diferentes tumores, sendo portanto uma mutante com pouca capacidade de formar agregados.

Com o estudo da associação dos dados de expressão de p53 com o resultado de co-localização (**TABELA 8**) observamos que algumas amostras que apresentavam expressão negativa de p53 demonstraram a co-localização em poucas células no tumor. Este fato pode ser devido aos parâmetros de análise histológica quanto à expressão de p53 realizada pela patologista, que pode ter classificado a expressão como negativa ao verificar muito poucas células marcadas para p53.

Também estudamos a localização celular dos agregados e observamos que eles estavam presentes principalmente no citoplasma das células. Uma explicação para isso pode ser que, apesar da p53 mutante normalmente acumular nos núcleos das células, em alguns casos ela pode se localizar no citoplasma, dependendo do tipo de mutante e de uma variedade de sinais de estresse que irão modular a localização da p53 e, sendo assim, este acúmulo pode propiciar a agregação (Brosh R, Rotter V, 2009).

Portanto, ao analisarmos a formação de agregados de p53, notamos que cada mutante apresenta um comportamento diferente à tendência a formar agregados e que a p53 selvagem em tumores pode estar na forma de agregados.

Para este estudo, foi utilizado o anticorpo A11 que faz parte de um grupo de anticorpos conformacionais-dependentes que reconhecem epítomos genéricos em todos os tipos de oligômeros e fibrilas amilóides, independente das suas sequências de aminoácidos. No caso do A11, ele reconhece um epítomo comum aos oligômeros pré-fibrilares, ou seja, uma estrutura genérica aos oligômeros. No entanto, este anticorpo apenas detecta o estado intermediário dos agregados, sendo necessária a análise dos tecidos de mama com outros anticorpos que reconheçam diferentes estágios de agregação, principalmente anticorpos que reconheçam especificamente o estado de fibrilas. Na literatura é encontrado o anticorpo OC que não é comercializado e, portanto, mais difícil de obter (Glabe CG, 2004; Kaye R et al, 2007).

Neste trabalho, também construímos plasmídeos com algumas das mutações mais frequentes no *TP53*, com o objetivo de se estudar a alteração da conformação da p53 que faz com que ela se agregue, “in vitro”, através de experimentos de transfecção e expressão das mutantes em linhagens de células mamárias. Esta parte do trabalho será desempenhada futuramente.

No nosso trabalho, observamos uma associação das mutações no gene *TP53* com o aumento da agressividade tumoral. Mutações podem ser selecionadas durante o desenvolvimento do tumor, ocasionando numa vantagem ao crescimento das células tumorais e na agressividade tumoral. Estas mutações têm sido associadas com um pior prognóstico, já que elas podem interferir na resposta à terapia e na sobrevivência dos pacientes (Olivier M et al, 2006). Por exemplo, as células que tenham perda da função do gene *TP53* não irão entrar em apoptose, sendo assim, resistentes a alguns tipos de terapias (Yamashita et al, 2006). Com isso, mutações no gene *TP53* apresentam um valor prognóstico, o que pode ser útil na escolha do tratamento mais adequado.

Além disso, observamos o diferente comportamento das mutantes de p53 quanto à tendência a formar agregados e que a p53 selvagem em tumores pode formar agregados, já que ela pode apresentar uma conformação alterada (Rigacci S et al, 2008). Estes agregados podem propagar a conformação alterada às moléculas de p53 corretamente enoveladas, devido ao efeito de dominante negativo, e também podem formar complexos com a p63 e p73, o que irá interferir nas funções destas proteínas e no controle contra a formação do câncer. Portanto, é necessária a pesquisa de moléculas que poderão impedir a formação da conformação alterada da p53 mutante, para que se possa prevenir o desenvolvimento do câncer.

CONCLUSÕES

- Mutações no gene *TP53* foram detectadas em 19% dos casos analisados de câncer de mama. Estas mutações estão associadas a um estágio mais tardio e agressivo de câncer.
- A formação de agregados de p53 selvagem e mutante foi observada em tumores de mama.
- As mutantes de p53 apresentam um padrão diferente quanto à tendência a agregação, tendo sido observado que as mutantes R273H e P278A são as que apresentam uma maior tendência.
- As mutações no gene *TP53* podem auxiliar no estabelecimento do tratamento adequado devido ao seu valor prognóstico.

PERSPECTIVAS

- Estudar os agregados de p53 utilizando o anticorpo que reconhece fibrilas, que é o mais adequado para a análise dos agregados fibrilares de p53.
- Estudar a conformação da p53 mutada, utilizando os plasmídeos construídos com as mutações desejadas.

REFERÊNCIAS

Alsner J, Jensen V, Kyndi M, Offersen BV, Vu P, Børresen-Dale AL, Overgaard J. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2008; 47 (4): 600-607.

Anderson BO, Yip CH, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, Carlson RW, Azavedo E, Harford J. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the breast health global initiative global summit 2007. *Cancer* 2008; 113(8 Suppl.): 2221–2243.

Belyi VA, Levine AJ. One billion years of p53/p63/p73 evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (42): 17609-17610.

Berns EM, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen-Logmans SC, van Staveren IL, van Putten WL, Inganäs M, Meijer-van Gelder ME, Cornelisse C, Claassen CJ, Portengen H, Bakker B, Klijn JG. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60 (8): 2155-2162.

Bertheau P, Espié M, Turpin E, Lehmann J, Plassa LF, Varna M, Janin A, de Thé H. TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathobiology* 2008;75:132–139.

Bouchet BP, de Fromental CC, Puisieux A, Galmarini CM. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2006; 58: 190 –207.

Bourdon JC. p53 Family Isoforms. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2007; 8: 332-336.

Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008*. Lyon, France: IARC Press; 2008.

Brachmann RK, Vidal M, Boeke JD. Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93 (9): 4091-4095.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(10):701-713.

Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 2001; 277(1-2): 15-30.

Cleary MP, Grossmann M E, Ray A. Effect of Obesity on Breast Cancer Development. *Vet Pathol* 2010; 47: 202.

Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. Detection of a common feature in several human tumor cell lines a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA* . 1981; 78(1):41-45.

De Laurenzi V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann NY Acad Sci* 2000; 926: 90-100.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1979, 76: 2420–2424.

DeYoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 2007; 26: 5169–5183.

Donehower LA, Lozano G. 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (11): 831-841.

Eliyahu D, Goldfinger N, Pinhasi-Kimhi O, Shaulsky G, Skurnik Y, Arai N, Rotter V, Oren M. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* 1988; 3: 313–321.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19: 403–410.

Farias RE, Souza AR, Aarestrup FM. Assesment of apoptosis in breast cancer: association with histological grade and prognostic factors. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(3): 209-218.

Fentiman IS, D'Arrigo C. Pathogenesis of breast carcinoma. *Int J Clin Pract*, January 2004; 58(1), 35–40.

Glabe CG. Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. *Trends in Biochem. Science* 2004; 29: 542-547.

- Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*. 2002; 84 (1):83-93.
- Hrstka R, Coates PJ, Vojtesek B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *J Cell Mol Med* 2009; 13(3): 440-453.
- Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38:103-116.
- Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade. *Pathobiology* 2008; 75:104–111.
- Ishimaru D, Andrade LR, Teixeira LS, Quesado PA, Maiolino LM, Lopez PM, Cordeiro Y, Costa LT, Heckl WM, Weissmüller G, Foguel D, Silva JL. Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry*. 2003a; 42 (30): 9022-9027.
- Ishimaru D, Maia LF, Maiolino LM, Quesado PA, Lopez PC, Almeida FC, Valente AP, Silva JL. Conversion of wild-type p53 core domain into a conformation that mimics a hot-spot mutant. *J Mol Biol*. 2003b; 333 (2): 443-451.
- Ishimaru D, Lima LM, Maia LF, Lopez PM, Ano Bom AP, Valente AP, Silva JL. Reversible aggregation plays a crucial role on the folding landscape of p53 core domain. *Biophys J*. 2004; 87(4): 2691-2700.
- Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem*. 2008; 77:557-582.
- Joerger AC, Fersht AR. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007;26 (15):2226-2242.
- Junttila MR, Evan GI. p53 — a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(11):821-829.
- Kayed R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Nacula M, Margol L, Wu J, Breydo L, Thompson JL, Rasool S, Gurlo T, Butler P, Glabe CG. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener* 2007; 2: 18-28.
- Khoury MP, Bourdon JC. The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a000927.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261–263.

Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, Jun B, Murti G, Ribeiro RC, Zambetti G, Schultz CP, Kriwacki RW. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *J Mol Biol.* 2003; 327 (3): 699-709.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9 (10):749-758.

Li Y, Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene.* 2007; 26 (15):2220-2225.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17: 43–52.

Little NA, Jochemsen AG. P63. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34: 6-9.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of Breast Diseases. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321:624-628.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215-19.

Ministério da Saúde/ INCA. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2009).

Okorokov AL, Orlova EV. Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19 (2):197-202.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2 (1): a001008.

Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromentel CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Therapy* 2009; 16, 1–12.

Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4): 1157-1167.

Olivier M, Hainaut P. TP53 mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 353-360.

Osuch JR. Breast Health and Disease Over a Lifetime. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2002; 45(4), 1140-1161.

Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 2005; 96: 729–737.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008; 261(1): 21-25.

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984, 312: 649–651.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74–108.

Parkin DM, Fernandez LMG. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 2006; 12(Suppl. 1):S70–80.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007a; 28 (6): 622-629.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007b; 26 (15): 2157-2165.

Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(10):738-748.

Porter P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med*. 2008; 358 (3): 213-216.

Rigacci S, Bucciantini M, Relini A, Pesce A, Gliozzi A, Berti A, Stefani M. The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates in vitro into cytotoxic amyloid assemblies. *Biophys J*. 2008; 94 (9): 3635-3646.

Ruder EH, Dorgan JF, Kranz S, Kris-Etherton PM, Hartman TJ. Examining Breast Cancer Growth and Lifestyle Risk Factors: Early Life, Childhood, and Adolescence. *Clin Breast Cancer*. 2008; 8(4): 334-342.

Sainsbury JRC, Anderson TJ, Morgan D. ABC of Breast Diseases. Breast cancer. *BMJ* 2000; 321:745-750.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Silva JL, Vieira TC, Gomes MP, Bom AP, Lima LM, Freitas MS, Ishimaru D, Cordeiro Y, Foguel D. Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc Chem Res*. 2010; 43 (2): 271-279.

Simão TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, Mendonça GA, de Moura-Gallo CV. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer* 2002; 101(1): 69-73.

Singletary SE, Allred C, Ashley P et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-3636.

Steiner E, Klubert D, Knutson D. Assessing Breast Cancer Risk in Women. *Am Fam Physician* 2008; 78(12):1361-1366.

Stewart B, Kleihues PE. *World Cancer Report*. Lyon, France: IARC Press; 2003.

Strano S, Rossi M, Fontemaggi G, Munarriz E, Soddu S, Sacchi A, Blandino G. From p63 to p53 across p73. *FEBS Lett*. 2001;490: 163-170.

Takahashi S, Moriya T, Ishida T, Shibata H, Sasano H, Ohuchi N, Ishioka C. Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. *Cancer Sci* 2008; 99 (2): 324–332.

Tsezou A, Tzetis M, Gennatas C, Giannatou E, Pampanos A, Malamis G, Kanavakis E, Kitsiou S. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta (ESR1, ESR2) and androgen receptor (AR) genes with the occurrence of breast cancer. *The Breast* 2008; 17: 159–166.

Tsuda H. Gene and chromosomal alterations in sporadic breast cancer: correlation with histopathological features and implications for genesis and progression. *Breast Cancer* 2009; 16 (3): 186-201.

van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res*. 2000; 6 (6): 2138-2145.

Viadiu H. Molecular architecture of tumor suppressor p53. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8 (15):1327-1334.

Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (10): 691-700.

World Health Organization. Breast Cancer: mortality and screening. *World Health Statistics* 2008

World Health Organization. Classification of Tumors, Tumors of the Breast and Female Genital Organs. 2nd edition. Lyon, France: IARC Press; 2003.

Xavier RG, Vilas-Boas AS, Scaldaferrri PM, Gobbi H. Carcinomas não palpáveis da mama: Avaliação e experiência com protocolo específico para estudo anatomopatológico. *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41(1), 51-60.

Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H. P53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006; 8 (4): R48.

Zhou W, Muggerud AA, Vu P, Due EU, Sorlie T, Borresen-Dale AL, Wörnberg F, Langerod A. Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution. *Molecular Oncology* 2009; 3: 214 – 219.

Zupnick A, Prives C. Mutational Analysis of the p53 Core Domain L1 Loop. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(29): 20464–20473.

ANEXO

Artigo submetido

Co-localization of mutant p53 and amyloid aggregates in breast tumors

Claudia B.Levy^{a, f}, Ana C.Stumbo^b, Ana P.D. Ano Bom^{c, f}, Elisabeth A. Portari^d, Yraima L.R.C.Machado^{e, f}, Jerson L.Silva^{c, f}, Claudia V. De Moura-Gallo^{a, f}

^aDepartamento de Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro, 20550-013, Brazil.

^bDepartamento de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro, 20550-013, Brazil.

^cCentro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil.

^dServiço de Patologia, Instituto Fernandes Figueiras-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^eFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil.

^fInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil

Running Title: Mutant p53 co-localizes with protein aggregates

&Address correspondence to: Claudia V. de Moura-Gallo; Address: Departamento de Genética/UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524/sala 525-6, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ 20 550-013, Brazil; Phone: 55 21 2334-0858; FAX: 55 21 2334-0309; E-mail: claudia.gallo@pq.cnpq.br

Keywords: p53; breast cancer; mutation; protein aggregate; antibody A11

Abstract

P53 is one of the most important tumor suppressor proteins in human cancers. Mutations in the *TP53* gene are common features of malignant tumors and normally correlate to a more aggressive disease. In breast cancer, these gene alterations are present in approximately 20% of cases and are characteristically of missense type. In the present work we describe *TP53* mutations in breast cancer biopsies and investigate whether wild and mutant p53 participates

in protein aggregates formation in these breast cancer cases. We analyzed 88 biopsies from patients residing in the metropolitan area of Rio de Janeiro, and performed *TP53* mutation screening using direct sequencing of exons 5 to 10. Seventeen mutations were detected, 12 of them were of missense type, 2 nonsenses, 2 deletions and 1 insertion. The presence of *TP53* mutation was highly statistically associated to tumor aggressiveness of IDC cases, indicated here by Elston Grade III ($p < 0.0001$). Paraffin embedded breast cancer tissues were analyzed for the presence of p53 aggregates through immunofluorescence co-localization assay, using anti-aggregate primary antibody A11, and anti-p53. Our results show that mutant p53 co-localizes with protein aggregates depending on mutation type. These results suggest that mutant p53 may form aggregates in breast cancer cells, *in vivo*, probably enhancing breast cancer evolution.

1. Introduction

P53 is a master regulator, modulating cell life and death. As a transcription factor, p53 exerts its functions mediating numerous cellular responses, mainly to genotoxic stresses (Volgstein et al., 2000). Inactivation of p53 regulated pathways appears to be a common step in almost every type of cancer (Olivier, Holstein and Hainaut, 2010). The *TP53* gene (OMIM #191117), differently from other tumor suppressor genes, is frequently altered in human cancers by single nucleotide substitutions leading to missense mutations. These mutations may cause three different effects in the protein function: loss of function, dominant negative effect and gain of function. They are not mutually exclusive and impose a positive selection of the p53 mutated cancer cells, increasing genomic instability (Oren and Rotter, 2010). Not surprisingly, tumors which bear mutant p53 generally have poor prognosis (Petitjean et al., 2007; Olivier et al., 2010). In breast cancer, the observed frequency of *TP53* mutations is approximately 20 to 30% and, as described in several papers, they are powerful prognostic markers (Olivier et al., 2006; Lagerød et al., 2007). p53 is a protein of 393 residues with a structural organization characteristic of transcription factors with (1) an acidic N-terminal domain containing a transcription activation domain (1-44) and a proline-rich regulatory domain (residues 62-94); (2) a central sequence-specific well-conserved DNA-binding domain (residues 110-292); (3) an oligomerization domain (residues 325-363); (4) a C-terminal domain that contains multiple regulatory signals (residues 363-393). Around 90% of the mutations are located at the central DNA-binding domain (Petitjean et al., 2007; Olivier et al., 2010). Another interesting feature of this protein is the possibility to form amyloid-like aggregates. Mainly *in vitro* data have shown that the central DNA-binding domain (Ishimaru

et al., 2003) as well as the tetramerization (Lee et al., 2003) and transactivation domains are prone to form aggregates (Rigacci et al., 2008). So far, no direct proof of *in vivo* p53 aggregation has been published. Thus, the present work was planned to collect evidences for *in vivo* observation of p53 aggregates. As a strategy, we performed immunofluorescence co-localization of p53 and protein aggregates in archived breast cancer tissues which had been screened for *TP53* mutations.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue samples

Frozen breast tissues were collected from 88 breast cancer cases of the Department of Pathology, from Fernandes Figueira Institute (IFF-FIOCRUZ), in Rio de Janeiro. The patient's data were obtained from the hospital records. Ethical approval for this study was obtained by local research ethics committees. Immunohistochemistry data for p53, estrogen and progesterone receptors expression was retrieved from the routine analysis of the Department of Pathology (IFF-FIOCRUZ).

2.2. TP53 mutation screening

Breast tissue was collected and immediately frozen in liquid nitrogen. The genomic DNA was prepared by proteinase K digestion according to standard methods. Exons 5-10 of the *TP53* gene were amplified using intronic primer pairs, sense and antisense, as described elsewhere (Simão et al., 2002) and Suppl. Table 1. Briefly, PCR was carried out with 200 ng of DNA, 10 pmoles of each primer, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 U *Tth* polymerase (BIOTOOLS, Madrid, Spain), in a final volume of 50 µL. PCR cycling conditions were carried out with an initial denaturation step for 5 min at 94°C, followed by 34 cycles consisting of three steps: 94°C for 30 sec, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR product was purified with the AccuPrep® PCR purification kit (BIONEER, Korea) and directly sequenced (ABI Prism System BigDye® Terminator v3.1, APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA) on FIOCRUZ-RJ.

2.3. Co-localization analysis of p53 and protein aggregates

Sections were incubated in citrate buffer pH 6.0 for 20 min at 55°C for antigen retrieval, and nonspecific antigenic sites were blocked with PBS/BSA 5% (phosphate- buffered saline/ bovine serum albumin). First, the sections were labeled with rabbit polyclonal anti-human amyloid oligomer (Chemicon International, Inc.) primary antibody (1:2000) and then incubated with donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 conjugated secondary antibody. On second step, these previous labeled sections were incubated with mouse monoclonal anti-human p53

protein DO-1 (Invitrogen Corporation) primary antibody (1:200) followed by incubation with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody. In both cases, primary antibodies were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies for 1h at room temperature in a moist and dark chamber. The samples were washed, mounted and analyzed using confocal laser scanning microscope (LSM 510 META Carl Zeiss Inc., Germany).

2.4. Statistical analysis

The statistical significance of differences between groups was calculated by the Fisher's exact test. These statistical analyses were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA).

3. Results

First, we screened for *TP53* mutations, exons 5 to 10, of a total of 88 breast tumor samples with different pathological diagnosis (tumor and patient's characteristics in Suppl. Table 2). The most common histological type was invasive ductal carcinoma (IDC), with 69 % of the cases. Table 1 presents the studied mutant p53 cases, their pathological characteristics, the mutation description and effects on protein. Overall there were seventeen mutations detected, including twelve missense, two nonsense, two deletions and one insertion. All of them were deleterious and the majority was located at the DNA binding domain. To better understand the effect of these mutations on tumor characteristics, we utilized only the IDC cases in an association study between the cases characteristics and the presence of *TP53* mutations. The results showed a strong positive association with Elston Grade III ($p < 0.0001$) and with p53 accumulation ($p = 0.018$). We did not find any association with patient's age, estrogen or progesterone receptors (Table 2). An interesting feature of the p53 protein variants is to assume different conformations and, as reported through *in vitro* experiments, to form protein aggregates. In order to investigate whether mutant p53 form aggregates in breast cancer cells, we performed immunofluorescence co-localization assay in archived samples of the previously analyzed breast cancer cases, using anti-aggregate primary antibody A11 and anti-p53. The A11 antibody recognizes generic epitopes of protein oligomers, regardless the aminoacid sequence, and the DO-1 antibody recognizes wild-type and mutant p53 of mouse and human origins. Here we use the term protein aggregates to nominate the oligomeric aggregate state recognized by A11 (Glabe, 2004). The obtained results are presented in Table 3 and tumor examples in Figure 1. The investigation of non tumoral breast samples was negative for the presence of p53 or aggregates (suppl.Figure). On the other hand, we have found a diverse and mutation dependent presence of protein aggregates co-localized to p53 in the twelve analyzed tumor samples. Eight of the nine cases with mutant p53 showed, in a

certain degree, to have p53 aggregation. In these samples, the mutant p53 was seen to co-localize moderately with protein aggregates, when few cancer cells were positive, or strongly, when almost all cancer cells were positive for both DO-1 and A11. In respect with the wild-type p53, only one of the four analyzed samples presented some co-localization (Table 3 and Figure 1 A). Among the mutant p53, the hotspot *TP53* mutations R273H and R175H, showed to have abundant aggregation in the former case and scarce, in the latter (Table 3 and Figure 1, B and C). Of note, R175H, which is present in two of our samples, was observed to present few co-localized aggregates in one sample (T18) and none in another sample (T72) (suppl.data). Other hotspot mutation R248Q, showed to be moderately aggregated. The rare mutation Y234C presented abundant aggregation in tumor sample and other mutants as G245S, H193L and I195L were moderately aggregated. The results obtained with the analyzed samples cited in this paper may be found also in Supplementary Figure. Another interesting observation of these data was that the co-localization appears to be predominantly found in the cytoplasm, although not exclusively (Figure 1 B and C).

4. Discussion

Protein misfolding and aggregation has been related to several human disorders, generally termed protein aggregation diseases. In cancer, so far, such mechanisms are largely unknown. p53, a critical tumor suppressor protein, has been described to form oligomeric-aggregates *in vitro*. Recent reports, including ours, demonstrate p53 amyloid-aggregates in the core domain (Ishimaru et al., 2003; Ishimaru et al., 2004; Ishimaru et al., 2009), for the tetramerization domain (Lee et al., 2003; Higashimoto et al., 2006) and for the transactivation domain (Rigacci et al., 2008). To investigate whether mutant p53 could form protein aggregates in breast cancer cells we firstly screened breast cancer samples for *TP53* mutations and secondly analyzed the co-localization of mutant p53 and protein aggregates.

TP53 mutations are the most common breast cancer genetic alteration. Moreover, it is emerging as an important biomarker for breast tumor prognosis (Langerød et al., 2007; Olivier et al., 2006; Olivier et al., 2010). Our results reinforce this statement. In IDCs we found a high statistical association between the presence of mutation and the Elston Grade III, which corresponds to the worst prognosis (Elston and Ellis, 1991).

We also found that p53 accumulation is statistically associated to the presence of mutant p53. Although it is well known that p53 overexpression in cancer cells is not a direct evidence of gene mutation (Langerød et al., 2007; Olivier et al., 2010), with our IDC samples we had a good correlation. The activated p53 is a homotetramer stabilized by a complex mechanism of post-translational modifications (Lavin and Guevin, 2006). However, with the advent of

mutations, malfunctioning of modification reactions, such as MDM2 ubiquitination, protein transportation, and changes in cellular milieu, the protein stability is compromised (Sanchez-Ruiz, 2010). P53 may then acquire different conformations mainly in the cytoplasm, where it is produced and should be transported to the nucleus (Lavin and Guevin, 2006). A local accumulation of p53 can be consequence of altered forms of the protein. Ano Bom et al, 2009 reported that the p53 molten globule like intermediate is able to aggregate with concentration-dependence (Ano Bom et al., 2009).

However, in two cases, T2 and T18, both with mutant p53 G245S and R175H, respectively, the p53 expression was negative and we could detect the presence of some aggregates. We suppose that even with poor p53 accumulation, not seen by immunohistochemistry, some p53 aggregation may occur. The immunofluorescence co-localization assay is more sensitive than the usual immunohistochemistry and, probably, in these two cases, the presence of poor p53 accumulation was not detected. Furthermore, co-localization assay through confocal microscope, in tumor tissues, is advantageous because one can observe the protein accumulation and aggregates in individualized cells. Here we performed co-localization assay using antibodies DO1, anti-p53 which recognizes the wild and mutant p53, and A11. Interestingly, A11 is described to recognize a peptide backbone epitope that is common to amyloid oligomers and protofibrils, but it is not found in native proteins, amyloidogenic monomer or mature amyloid fibrils (Glabe, 2004). Thus, A11 is a good tool to investigate the presence of protein aggregation in intermediate structures and not higher-order amyloidogenic fibrils (Glabe, 2004; Silva et al., 2010).

With regard to wild p53 samples, we have analyzed four samples and detected few cells with p53 aggregation in one case (T39). Evidences from our previous work show that, depending on conditions, wild type p53 may form amyloid-aggregates and consensus DNA binding appears to recover the promoted protein instability (Ishimaru et al., 2003; Ishimaru et al., 2009; Ano Bom et al., 2009). These observations suggest that once the protein stability is disturbed wild p53 may form amyloid-aggregates *in vivo*. The effect of crowded intracellular environment, as well as the presence of mutations in protein kinetic stability is discussed above and elsewhere (Sanchez-Ruiz, 2010). However, we cannot discard the possibility of the existence of multiclonality in the analyzed tumors and, the possibility of not detecting incipient cells with TP53 mutation due to genomic DNA dilution effect. The use of laser dissection and local mutation detection and, in parallel, the co-localization analysis would clarify these points. On the other side, tumor samples with p53 overexpression do not present any p53 aggregation, either mutant or wild type (see Figure 1 and complementary Figure).

This is an interesting observation which may indicate that, depending on the mutation type and conditions of the intracellular environment, p53 variants can be prone to aggregate or not. Nevertheless, this mutant protein aggregation, mainly in the form of amyloid oligomers, appears not to be toxic, but rather, it may impair wild p53 functions, promoting a growth advantage to the cancer cells. We may suppose that the principal consequence of this cellular event is a dominant-negative effect (Ishimaru et al., 2003; Silva et al., 2010). Besides, recently accumulated data suggest a complex interaction of p53 variants with different isoforms such as p53 family the proteins, p63 and p73, and with the multitude of products resultants of alternative splicing and alternative promoter (Courtois et al., 2004; Bourdon et al., 2005).

Here, we identified specific co-localization between mutant p53 and amyloid oligomers aggregates. These data strongly suggests that p53 molecules aggregate, forming structures recognized by antibody A11, in breast cancer cells and that this aggregation is dependent on p53 mutational status. Additional studies are necessary to confirm that p53 aggregation is a cause not a consequence of p53 inactivation but, overall, these findings raise the possibility of a natural mechanism through which p53 and isoforms could be trapped by excessive accumulation and/or altered conformation of the protein molecules, contributing to breast cancer evolution.

Acknowledgements

The authors thank the patients and the collaborative participation of the family in this study. The DNA sequencing of this study was supported by the “Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ” and “Plataforma Genômica IBRAG/UERJ”. Claudia Levy was recipient of a fellowship from CAPES/Brasil. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CNPq Millennium and National Institute Programs e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Ano Bom APD, Freitas MS, Moreira FS, Foguel D, Valente AP, Cordeiro Y, Silva JL. The p53 Core Domain is a Molten Globule at Low pH: Functional Implications of an Intrinsically, Partially Unfolded Structure *J Biol Chem* 2009; 285(4):2857–2866.
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005;19(18):2122-37.

- Courtois S, de Fromental CC, Hainaut P. P53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene* 2004;23(3):631-8.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307–310.
- Elston CW and Ellis IO, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5): 403-10.
- Glabe CG, Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. *Trends Biochem Sci* 2004;29(10):542-7.
- Higashimoto Y, Asanomi Y, Takakusagi S, Lewis MS, Uosaki K, Durell SR, Anderson CW, Appella E, Sakaguchi K. Unfolding, aggregation, and amyloid formation by the tetramerization domain from mutant p53 associated with lung cancer. *Biochemistry* 2006;45(6):1608–1619.
- Ishimaru D, Andrade LR, Teixeira LS, Quesado P.A, Maiolino L M, Lopez PM, Cordeiro Y, Costa LT. Heckl WM. Weissmuller, G, Foguel, D, and Silva, JL. Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. *Biochemistry* 2003;42(30):9022–9027.
- Ishimaru D, Lima LM, Maia LF, Lopez PM, Ano Bom AP, Valente AP, Silva JL Reversible aggregation plays a crucial role on the folding landscape of p53 core domain. *Biophys J* 2004;87(4), 2691–2700.
- Langerød A, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, Kåresen R, Børresen-Dale AL, Jeffrey SS. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast. *Breast Cancer Res* 2007;9(3):R30.
- Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006; 13(6):941-950.
- Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, Jun B, Murti G, Ribeiro RC, Zambetti G, Schultz CP, Kriwacki RW. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *J Mol Biol* 2003; 327(3):699–709.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(1):a001008.
- Oren M, Rotter V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(2):a001107.
- Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of

somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(4):1157-67.

-Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007;26(15):2157-65.

-Rigacci S, Bucciantini M, Relini A, Pesce A, Gliozzi A, Berti A, Stefani M. The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates in vitro into cytotoxic amyloid assemblies. *Biophys J* 2008;94(9):3635–3646.

-Sanchez-Ruiz JM. Protein kinetic stability. *Biophys Chem* 2010;148(1-3):1-15.

-Silva JL, Vieira TC, Gomes MP, Bom AP, Lima LM, Freitas MS, Ishimaru D, Cordeiro Y, Foguel D. Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor protein. *Acc Chem Res* 2010;43(2):271-279.

-Simao TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, Mendonca GAS, De Moura Gallo CV. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer* 2002;101(1):69-73.

Tables

Table 1 – Description of the breast cancer tumors with detected *TP53* mutations

Tumor	Histological classification	EG	TP53 Mutation	Structural Motif*
T2	IDC	I	G245S	L3 ; BD
T6	IDC	III	H193L	L2 ; BD
T10	IDC	III	R248Q	L3 ; BD
T18	IDC	III	R175H	L2 ; BD
T19	Mucinous	I	H168P	L2 ; BD
T21	IDC	III	R273H	S10 ; BD
T31	Invasive Micropapillary	II	16888delC	
T33	IDC	III	16897-16911del	

T34	IDC	III	Y234C	S8 ; BD
T40	IDC	III	I195L	S5 ; BD
T55	Invasive Apocrine	II	W146stop	S3 ; BD
T59	Invasive Apocrine	II	P278A	H2 ; BD
T64	Mucinous	II	12444-12445 insT	
T67	IDC	II	R213stop	L ; BD
T72	IDC	III	R175H	L2 ; BD
T76	Invasive micropapillary	II	D259V	L ; BD
T90	IDC	III	Y205C	S6 ; BD

IDC – Invasive Ductal Carcinoma; EG – Elston Grade; L – Loop motif; S - sheet motif; H – Helix motif; BD – DNA Binding

*Structural Motif data from IARC P53 mutation Database – Release 14

Table 2 – Association between the IDC characteristics and the presence of *TP53* mutation

				Mutant p53		
		N	%	No	Yes	
Age						
< 45	10	16,4	9	1	p = 0,672	
≥ 45	51	83,6	41	10		
EG						
I + II	48	78,7	46	2	p < 0,0001*	
III	13	21,3	4	9		
RP						
+	24	39,3	22	2	p = 0,136	
-	24	39,3	17	7		
NI	13	21,4				
RE						
+	33	54,1	29	4	p = 0,114	

	-	15	24,6	10	5	
	NI	13	21,3			
p53						
	+	15	24,6	9	6	p = 0,018*
	-	33	54,1	30	3	
	NI	13	21,3			

EG – Elston Grade ; PR – Progesterone Receptor ; RE – Estrogen Receptor

*Statistically associated (P < 0.05)

Table 3 – p53 mutation status, p53 expression and Immunofluorescence co-localization of p53 and protein aggregates (p53 aggregate) in the analyzed IDC cases

Tumor	p53 status (Aminoacid change)	p53 expression	p53 aggregate
T2	Mut (G245S)	-	+/-
T6	Mut (H193L)	+	+/-
T10	Mut (R248Q)	+	+/-
T18	Mut (R175H)	-	+/-
T21	Mut (R273H)	+	+
T34	Mut (Y234C)	+	+
T36	Wild	+	-
T39	Wild	+	+/-
T40	Mut (I195L)	+	+/-
T48	Wild	+	-
T72	Mut (R175H)	+	-
T74	Wild	+	-

p53 expression – (-) negative (+) positive

p53 aggregates – (-) no aggregate; (+/-) – few cells with protein aggregate; (+) – most cells with protein aggregate.

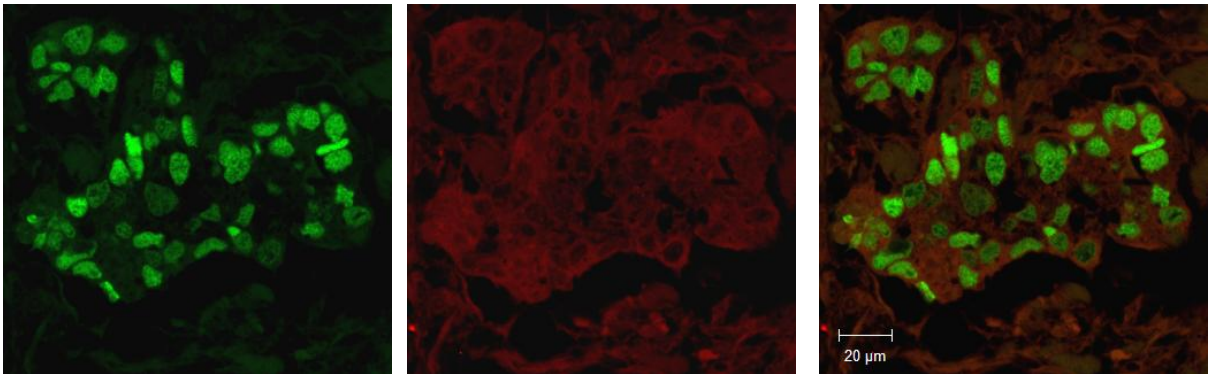
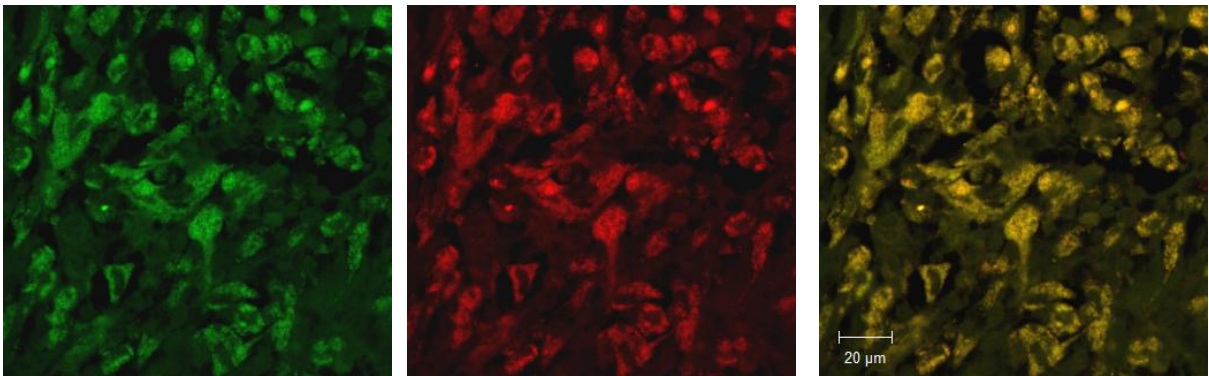
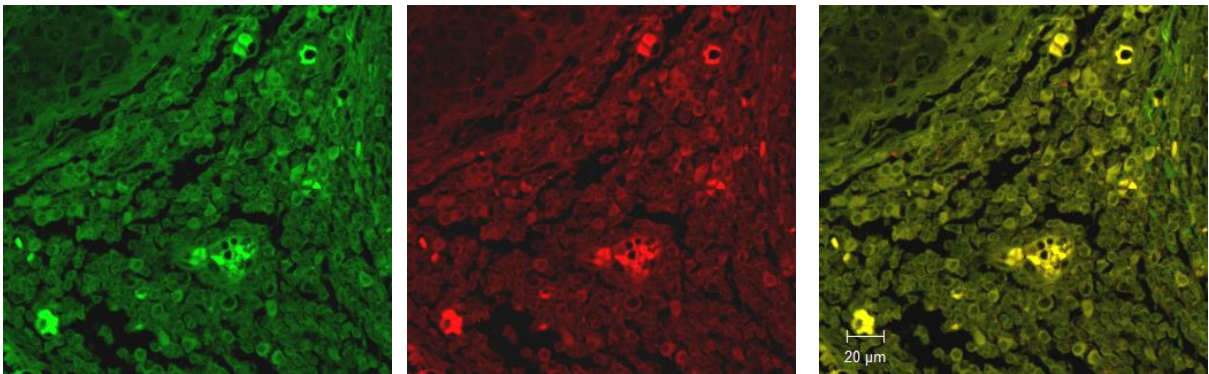
Figure 1**A****B****C****Legend of Figure**

Figure 1 – A – Co-localization of p53 (green) and protein aggregates (red) in a tumor sample (T74) with wild type p53; B - Co-localization of p53 (green) and protein aggregates (red) in a tumor sample (T21) with mutant p53 R273H; C - Co-localization of p53 (green) and protein aggregates (red) in a tumor sample (T18) with mutant p53 R175H;