

**INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE PROTEICA,
TRANSCRICIONAL E GENÔMICA DE *TP53* E
SEU IMPACTO EM ADENOCARCINOMAS
COLORRETAIS**

LIGIA PETROLINI DE OLIVEIRA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Renata de Almeida Coudry
Co-Orientador: Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi**

**São Paulo
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Ligia Petrolini de

Investigação da diversidade proteica, transcricional e genômica de TP53 e seu impacto em adenocarcinomas colorretais / Ligia Petrolini de Oliveira - São Paulo, 2012.

139p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Renata de Almeida Coudry

Descritores: 1. PROTEÍNA SUPRESSORA DE TUMOR p53.
2. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 3. GENES TP53. 4. RNA *SPLICING*.
5. MUTAÇÃO

DEDICATÓRIA

À minha linda filha Luiza, que me alegra todos os dias. Minha riqueza, minha herança, minha vida...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo alívio das minhas angústias e por me dar força para seguir em frente, sempre.

Agradeço ao meu marido Beto, pela nossa linda família e por caminhar ao meu lado todos esses anos. Desculpe pelas minhas ausências enquanto eu trabalhava. Pensei em você em todos os momentos que estive longe.

Agradeço ao fruto mais precioso do meu doutorado, minha princesa Luiza. Com você minha vida se tornou mais leve, mais feliz e mais prazerosa. “Mamãe, você trabalha muito...” Sim filha, na próxima vez você vai junto com a mamãe... Faço tudo por você!

Agradeço aos meus pais Lizete e Vitor, por toda a compreensão, toda a ajuda e todo o amor. Obrigada por cuidarem da minha filha quando não posso estar com tanto zelo, carinho e cuidado. Agradeço por aceitarem meus horários confusos sem questionamentos e sem entender porque minha vida é tão caótica. As minhas vitórias são frutos dos seus sonhos e investimentos.

Agradeço aos meus irmãos, Valéria e Ivan, pela companhia, pelas conversas, pelas brigas e pela nossa infância maravilhosa.

Agradeço as minhas lindas vovós, Quitita (*in memorian*) e Vanda pelo carinho quando cuidavam de mim, por me ensinarem a ter humildade e valorizar o próximo, independente de qualquer estratificação social. Eu com certeza era uma criança feliz graças a vocês. Vózinha, você sabe... Nunca vou te esquecer!

Agradeço aos meus tios e primos, por todas as festas, passeios e risadas. Tenho muito orgulho da união da nossa família. Agradeço especialmente a minha Tia Luzia, que sempre abdicou da própria vida em favor dos sobrinhos.

Agradeço ao meu eterno cãozinho Godofredo, por ter feito de mim a criança mais feliz do mundo.

Agradeço as minhas amigas, Tata e Raquel, por acreditarem em mim, partilharem meus sonhos e sempre me incentiavarem a querer e conseguir mais.

Agradeço as minhas amigas de faculdade, Alê, Bru, Dri, Ju, Mari e Ro pelos anos de faculdade e pela amizade que nunca terminará.

Agradeço a minha amiga Mila, que mesmo de longe sempre se preocupou com meu estado físico e emocional, sempre perguntando como eu estava e ouvindo meus desabafos.

Agradeço especialmente a minha amiga Kátia Cândido Carvalho, que prontamente me ajudou quando eu mais precisava, lendo minha tese com a atenção que ela teria com sua própria tese. Muito obrigada, de coração! Você tem um pedaço do céu reservado pra você, com certeza!

Agradeço a todos os meus amigos do CIPE, aos que ainda estão trabalhando e aos que já seguiram outros caminhos. Cada almoço, reunião, ideias, besteiras... Juntos a gente sempre consegue mais e melhor!

Agradeço aos amigos da Anatomia Patológica e da Biologia Molecular, pela companhia em todos os dias de trabalho. Foram tantas coisas compartilhadas... Problemas de trabalho, pessoais, de saúde... De tanto ficarmos juntos nós acabamos nos conhecendo mais, aumentou a cumplicidade e nos tornamos uma família. Vou sentir muita falta de todos vocês!

Agradeço a todos os funcionários do Banco de Macromoléculas, da Imunoistoquímica, da Técnica, do SAME, do CEP, do Arquivo, da Pós-Graduação e da Biblioteca por toda a ajuda.

Agradeço aos funcionários e amigos Carla, Carlinhos, Gilmara, Ivanildo, Kelly, Larissa, Liliane e Severino por toda amizade e auxílios prestados.

Agradeço a FAPESP, pela bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro indispensável ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos membros de qualificação, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas e Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz por me acompanharem durante esse projeto e pela valiosa contribuição com suas sugestões.

Agradeço aos membros da banca examinadora desta tese, por aceitarem o convite e pela disposição em ler e argüir este trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Soares, em nome de todo o departamento de Anatomia Patológica, onde realizei todos os meus experimentos e ao Dr. Samuel Aguiar Junior, em nome de todo o departamento de Cirurgia Pélvica, onde são tratados todos os pacientes que se tornaram fonte dos meus estudos.

Agradeço a Dra. Erika, por toda ajuda que sempre me deu em todos os meus projetos e por colaborar comigo nos seus. Obrigada pela amizade e pela confiança.

Agradeço a todos os pacientes, que voluntariamente ajudaram a contribuir para a pesquisa científica deste país.

E por fim, agradeço aos meus orientadores, Renata de Almeida Coudry e Benedito Mauro Rossi, por me aceitarem como aluna, por acreditarem em mim e por confiarem no meu trabalho.

Esta conquista é para todos vocês! Mais uma vez!

RESUMO

Oliveira LP. **Investigação da diversidade proteica, transcricional e genômica de TP53 e seu impacto em adenocarcinomas colorretais.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer colorretal (CCR) é resultado da interação de fatores ambientais com múltiplos fatores genéticos. O gene *TP53* regula muitas funções celulares e apresenta-se mutado na maioria dos casos de CCR. Mutações, polimorfismos e variações de expressão gênica fornecem a base genética para a diversidade humana e podem ter um papel crucial na variabilidade fenotípica e susceptibilidade às doenças. O estudo analisou as alterações em *TP53* encontradas e buscou associações entre os achados com a expressão imunohistoquímica e os dados clinicopatológicos. Foram realizadas análises da proteína, do cDNA e gDNA de *TP53* em 101 pacientes com CCR submetidos à cirurgia no Hospital AC Camargo, no período de 2000-2006. Foram encontradas mutações em *TP53* em 54,5% dos tumores. As mutações foram mais frequentes no grupo de pacientes que apresentaram reação imunohistoquímica positiva para p53 (48,5%) do que no grupo negativo (51,5%) ($p < 0,001$). Foram encontradas três (3%) mutações sinônimas, o que corresponde a 8,8% das mutações pontuais; uma (33,4%) delas levando à ruptura do sítio de *splicing*. Foram encontradas oito inserções/deleções (7,9%), quatro (50%) delas descritas pela primeira vez e três (37,5%) delas levando à ruptura do sítio de *splicing*. O polimorfismo PIN2 (c.74+38C>G) foi encontrado em 89,1% dos pacientes. A frequência do alelo G foi de 0,72. O polimorfismo PIN3 (c.96+41_96+56del16) foi encontrado em 21,8% dos pacientes. A frequência do alelo A2 foi de 0,12. O polimorfismo 72Pro>Arg foi encontrado em 85,4% dos pacientes. A frequência do alelo Pro72 foi de 0,26 para o cDNA e 0,23 para o gDNA, diferença encontrada devido a expressão preferencial de um dos alelos em 40,7% dos heterozigotos. A expressão de p53, a mutação de *TP53*, a

presença do alelo A2 e expressão do alelo Pro72 foram associadas significativamente às características clinicopatológicas que conferem pior comportamento tumoral e prognóstico adverso. Assim, a análise do cDNA de *TP53* foi importante para determinar seu padrão de alteração e a contribuição específica do alelo expresso. Os dados obtidos foram congruentes com a forte associação que existe entre a mutação de *TP53* e o seu acúmulo proteico, ainda que este acúmulo tenha sido verificado na minoria das amostras. Existe envolvimento de mutação sinônima com o mecanismo de *splicing*. As associações com os dados clinicopatológicos indicam que os polimorfismos em *TP53* podem ter um papel na agressividade do CCR.

SUMMARY

Oliveira LP. **[Investigation of protein, transcriptional and genomic diversity of TP53 and its impact on colorectal adenocarcinomas]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Colorectal cancer (CRC) is the result of the interaction of environmental factors with multiple genetic factors. The TP53 gene regulates many cellular functions and is presented mutated in the majority of CRC cases. The mutations, polymorphisms and variations in gene expression provide the genetic basis for human diversity and may have a crucial role in the phenotypic variability and disease susceptibility. The study examined the TP53 alterations and sought associations between the findings with the immunohistochemical expression and clinicopathological data. We studied 101 patients, who underwent surgery at AC Camargo Hospital in the 2000-2006 period, through analysis of the protein, cDNA and gDNA of TP53. We found 54.5% of tumors with mutations in TP53. The mutations were significantly more frequent in the group of patients with positive immunohistochemistry reactions for p53 than in the negative group ($p < 0.001$). Synonymous mutations were found in three tumors, one of them leading to disruption of the splicing site. We found eight insertions/deletions, four of them described for the first time and three of them leading to the rupture of the splicing site. The PIN2 (c.74+38C>G) polymorphism was found in 89.1% of patients. The frequency of the G allele was 0.72. PIN3 (c.96+41_96+56del16) polymorphism was found in 21.8% of patients. The frequency of the A2 allele was 0.12. The polymorphism 72Pro>Arg was found in 85.4% of patients. The frequency of allele Pro72 was 0.26 for the cDNA and 0.23 for the gDNA. This difference was found because it was noticed the preferential expression of one allele in 40.7% of heterozygotes. The expression of p53, the TP53 mutation, the presence of the A2 allele and the allele Pro72 expression were significantly associated with tumor

characteristics that confer worse tumor behavior and unfavorable prognosis. The analysis of TP53 cDNA is important to determine the pattern of alteration and the specific contribution of the allele expressed. This approach is consistent with the strong association that exists between TP53 mutation and its protein accumulation. Synonymous mutations are involved with splicing. The associations with clinicopathological characteristics indicate that TP53 polymorphisms may play a role in the aggressiveness of CRC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de Carcinogênese do CCR.....	5
Figura 2	Figura representativa dos domínios do gene <i>TP53</i> . TAD – domínio de transativação.....	6
Figura 3	Vias de ação de p53. Diagrama representativo das interações, reações e relações moleculares de p53.....	9
Figura 4	Controle da extração de RNA.....	29
Figura 5	Controle da extração de DNA.....	30
Figura 6	Representação da localização dos iniciadores.....	31
Figura 7	Gráficos representativos das calibrações de HRM, amplificação da placa comercial (esquerda) e a curva de dissociação derivada (direita).....	36
Figura 8	Gráficos representativos das análises de HRM para o MeltDoctor™ HRM Positive Control Kit (Life Technologies, Estados Unidos).....	37
Figura 9	Fotomicrografias de tecidos tumorais representando os perfis de coloração obtidos para p53 nas reações de IHC.....	45
Figura 10	Mutação sinônima c.672G>A (p.E224E) que causou a ruptura do sitio de splicing, levando a retenção de cinco bases do intron em heterozigose.....	50
Figura 11	Deleção c.159delG presente na amostra LC78T.....	54

Figura 12	Deleção c.792_796del5 presente na amostra LC199T.....	55
Figura 13	Inserção c.398_399ins4 presente na amostra LC20T.....	55
Figura 14	Inserção c.217insC presente na amostra LC34T.....	56
Figura 15	Inserção c.455insC presente na amostra LC188T.....	56
Figura 16	Variantes de <i>splicing</i>	59
Figura 17	Mutação no intron 5 c.559+1G>A que causou a ruptura do sitio de <i>splicing</i> , levando a deleção de 46 bases do exon 5 (c.514_559del46).....	60
Figura 18	Mutação no intron 4 c.376-2A>G que causou a ruptura do sitio de <i>splicing</i> , levando a deleção de 21 bases do exon 5 (c.376_396del21).....	60
Figura 19	Distribuição das alterações ao longo dos domínios de <i>TP53</i>	61
Figura 20	Representação gráfica da presença da duplicação de 16 pb no intron 3 (alelo A2).....	63
Figura 21	Padrão de expressão do polimorfismo 72Pro>Arg.....	67
Figura 22	Associações entre o polimorfismo 73Pro>Arg e as variáveis clinicopatológicas estatisticamente significativas.....	73
Figura 23	Curvas de sobrevida global da análise univariada para estadiamento TNM (agrupados I-II e III-IV).....	76

Figura 24	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 2.....	78
Figura 25	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 3.....	80
Figura 26	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 4.....	81
Figura 27	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 5.....	82
Figura 28	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 6.....	83
Figura 29	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 7.....	84
Figura 30	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 8.....	84
Figura 31	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 10.....	85
Figura 32	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 9.....	86
Figura 33	Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 11.....	86
Figura 34	Frequência dos tipos de mutações já descritas em CCR (IARC).....	88
Figura 35	Dados dos tipos de mutações em CCR (IARC).....	92
Figura 36	Frequência de mutações missense em relação à sua atividade e funcionalidade (IACR).....	95
Figura 37	Distribuição das mutações encontradas nos códons do gene <i>TP53</i>	102

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Tipos de mutação missense e nonsense encontradas.....	53
Quadro 2	Depósitos das indels identificadas.....	57
Quadro 3	Características das amostras com genótipo A2/A2.....	65
Tabela 1	Associação entre a frequência das alterações encontradas com a expressão por IHC.....	48
Tabela 2	Relação entre 72Pro>Arg e PIN3.....	64
Tabela 3	Associação entre os polimorfismos 72Pro>Arg e PIN3.....	65
Tabela 4	Associação entre a presença do alelo A2 e o alelo Pro72.....	66
Tabela 5	Associação entre a expressão de p53 e <i>budding</i>	69
Tabela 6	Associação entre a expressão de p53 (graduada) e o tipo histológico.....	69
Tabela 7	Associação entre a expressão de p53 e o tipo histológico.....	70
Tabela 8	Associação entre a expressão de p53 e necrose.....	70
Tabela 9	Associação entre a expressão de p53 (graduada) e necrose...	70
Tabela 10	Associação entre a mutação de TP53 e a idade ao diagnóstico do paciente.....	71
Tabela 11	Associação entre a mutação de TP53 e desmoplasia.....	71

Tabela 12	Associação entre a mutação de <i>TP53</i> e tipo histológico.....	72
Tabela 13	Associação entre a mutação de <i>TP53</i> e padrão de crescimento do tumor (borda).....	72
Tabela 14	Associações entre o polimorfismo 73Pro>Arg e as variáveis clinicopatológicas estatisticamente significativas.....	74
Tabela 15	Análise multivariada para sobrevida global e recidiva do tumor.....	75
Tabela 16	Associação entre o alelo A2 e recidiva do tumor.....	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Arg72	Alelo contendo o aminoácido Arginina no códon 72 de <i>TP53</i>
AGVGD	<i>Align-Grantham Variation/Grantham Deviation</i>
CCR	Câncer Colorretal
cDNA	DNA complementar
DAE	<i>Differential Allele-specific Expression</i>
DNE	<i>Dominant Negative Effect</i>
FFEP	Fixado em Formalina e Embebidos em Parafina (tecido)
GD	<i>Grantham Deviation</i>
gDNA	DNA genômico
GL	<i>Germline</i>
GV	<i>Grantham Variation</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HSF	<i>Human Splicing Finder</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IHC	Imunoistoquímica (do inglês, <i>immunohistochemistry</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAE	<i>Monoallelic Expression</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
NNSPLICE	<i>Splice Site Prediction by Neural Network</i>
NS	Não Significativo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIN2	Polimorfismo no intron 2 de <i>TP53</i> (c.74+38C>G)
PIN3	Polimorfismo no intron 3 de <i>TP53</i> (c.96+41_96+56del16)
Pro72	Alelo contendo o aminoácido Prolina no códon 72 de <i>TP53</i>
PRR	<i>Proline Rich Domain</i>
p53C	<i>p53 DNA binding domain</i>
SE	Sem Estudos
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Tumor
TAD	<i>Transactivation Domain</i>
TET	<i>Tetramerization Domain</i>
TNM	Estadiamento (<i>Tumor, lymph Nodes, Metastasis</i>)
WT	<i>Wild-Type</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer colorretal	1
1.2	Carcinogênese colorretal.....	2
1.3	O gene <i>TP53</i>	5
1.4	<i>Splicing</i> Alternativo	16
1.5	HRM	18
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Seleção dos casos	25
4.1.1	Crerérios de inclusãõ	25
4.1.2	Crerérios de exclusãõ	25
4.2	Imunoistoquímica (IHC).....	27
4.3	Extração de RNA e DNA	28
4.4	Desenho dos iniciadores para sequenciamento	30
4.5	Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do cDNA	31
4.6	Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gDNA.....	32
4.7	Sequenciamento direto.....	33
4.8	HRM	34
4.9	Análise das alterações	39
4.10	Análise estatística.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Expressão proteica de p53	44

5.2	Análise mutacional de <i>TP53</i> do cDNA.....	46
5.2.1	Mutações sinônimas x <i>Splicing</i>	48
5.2.2	Mutações <i>Nonsense</i> e <i>Missense</i>	51
5.2.3	Inserções, Deleções e <i>Splicing</i>	54
5.2.4	Localização das alterações	60
5.2.5	Polimorfismos	61
5.2.6	Mutações e polimorfismos - gDNA	62
5.2.7	Expressão diferencial	66
5.3	Correlações clinicopatológicas	68
5.3.1	Expressão de p53.....	68
5.3.2	Mutação de <i>TP53</i>	71
5.3.3	Polimorfismo 72Pro>Arg.....	72
5.3.4	Polimorfismo PIN3.....	77
5.4	<i>High resolution melting</i>	77
6	DISCUSSÃO	87
6.1	Mutações sinônimas.....	87
6.2	<i>Splicing</i>	91
6.3	Mutações <i>Missense</i>	93
6.4	Mutações <i>Nonsense</i>	95
6.5	Polimorfismos	96
6.6	Localização das alterações	100
6.7	Expressão proteica.....	102
6.8	Associações clinicopatológicas	105
6.8.1	Características tumorais.....	105
6.8.2	Polimorfismos	106
6.9	Expressão diferencial	114
6.10	HRM	119
7	CONCLUSÕES	121
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ANEXOS

- Anexo 1** Ficha de coleta de dados - CCR
- Anexo 2** Protocolo para imunistoquímica
- Anexo 3** Extração de RNA por Trizol - *Precellys*
- Anexo 4** Extração de DNA – Tecido congelado
(Fenol/clorofórmio)
- Anexo 5A** Quadro das sequências dos iniciadores utilizados para sequenciamento do cDNA
- Anexo 5B** Quadro das sequências dos iniciadores utilizados para HRM e sequenciamento do gDNA
- Anexo 6A-J** Gráficos representativos das análises de HRM
- Anexo 7** Tabela da descrição das mutações encontradas no estudo
- Anexo 8** Artigo publicado na Gene 2012 May 10;499(1):81-7.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é uma das causas mais frequentes de morte por câncer nos países industrializados, tanto para homens quanto para mulheres, com uma incidência anual de 800.000 novos casos no mundo, representando 8,5% de todos os novos tumores (GATALICA e TORLAKOVIC 2008). Estima-se que o CCR seja responsável por 13% das mortes relacionadas ao câncer (ASHKTORAB et al. 2008). No mundo, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em homens - depois de pulmão e próstata, e o segundo mais comum em mulheres - depois de mama (FERLAY et al. 2010).

De acordo com as estimativas brasileiras do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de CCR para o ano de 2012 foi de 14,75 casos novos a cada 100 mil homens e 15,94 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011).

O CCR é dividido nas formas esporádicas e hereditárias. Análises de correlação entre os fenótipos de gêmeos monozigóticos com CCR sugerem que a susceptibilidade herdada é responsável por apenas 35% de todos os casos de CCR. Entretanto, apenas 6% dos CCRs ocorrem no contexto de genes de alta penetrância que já são conhecidos por serem a causa de síndromes familiares, como a Polipose Adenomatosa Familiar e a Síndrome

de Lynch (DA SILVA et al. 2010; VALENTIN et al. 2011), de forma que a maior parte do risco genético para o CCR permanece desconhecido (STADLER et al. 2010). Assim, a maior parte dos casos de CCR é esporádica.

Nos últimos anos, a incidência de CCR tem aumentado em áreas antes consideradas de baixo risco. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento da população, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e a um aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis, baseadas em gordura animal, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, bem como excessivo consumo de álcool e tabaco (FRANCO e FRANCO 2005).

O fator prognóstico isolado mais importante para o CCR ainda é o estadiamento. O estadiamento do CCR é realizado através do sistema de estadiamento do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union Internationale Controle Cancer (UICC)*, baseados no sistema TNM, que classifica os tumores colorretais com base na extensão da invasão local na parede do órgão (estádio T), número de linfonodos loco-regionais comprometidos (estádio N), e a presença ou ausência de metástases à distância (estádio M).

1.2 CARCINOGENESE COLORRETAL

FEARON e VOGELSTEIN (1990) propuseram um modelo de desenvolvimento de CCR onde o carcinoma colorretal surgiria e progrediria

através de estágios histológicos devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes críticos que controlam a proliferação e a morte celular. Estes eventos ocorrem de maneira ordenada e sequencial, demonstrando uma estreita correlação entre as alterações e os aspectos morfológicos de cada estágio.

No modelo proposto, a tumorigênese envolve uma série de alterações genéticas envolvendo a ativação de oncogenes (*RAS*) e a inativação de genes supressores de tumores, particularmente aqueles nos cromossomos 5q (gene *APC*), 17p (gene *TP53*) e 18q (gene *DCC*). A alteração inicial envolve o gene *APC*, cuja perda ou mutação é responsável pelo estado hiperproliferativo encontrado no epitélio das lesões iniciais. Em seguida a hipometilação levaria a aneuploidia, resultando em perda de alelos de genes supressores.

Os três estágios de adenoma apresentam alterações de aumento de tamanho, displasia e alterações na morfologia das vilosidades. A mutação de *KRAS* ocorre em uma célula do adenoma já existente e através de expansão clonal produz um tumor maior e mais displásico.

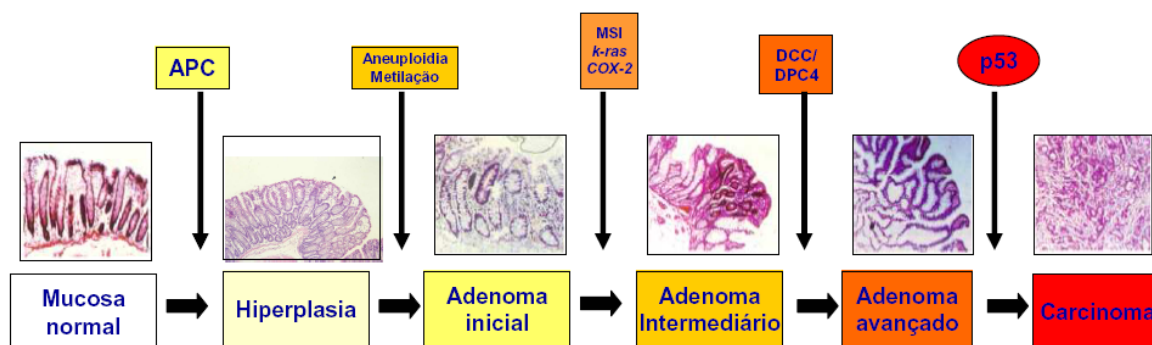
As perdas cromossômicas mais frequentes estão representadas pelo possível alvo do evento de perda, assim como o tempo de perda na progressão. As deleções do segundo alelo dos genes supressores em 17p e 18q ocorrem em um estágio mais tardio da tumorigênese do que as deleções na região do cromossomo 5q ou as mutações no gene *RAS*. Entretanto, a ordem dessas alterações não é invariante, de forma que o acúmulo destas alterações, ao invés da ordem de acometimento, parece ser

mais importante na determinação das propriedades biológicas dos tumores. Os tumores continuariam a progredir assim que os carcinomas fossem formados, e o acúmulo de perdas de genes supressores em cromossomos adicionais se correlacionaria com a habilidade de metastatização dos tumores (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

Outras alterações, como a perda significativa de grupos metil, também foram encontradas entre os eventos precoces da tumorigênese colorretal. O estudo de pequenos adenomas revelou que aproximadamente um terço das regiões estudadas apresentavam perdas de grupos metil que estavam presentes na mucosa colônica normal, sugerindo assim, que existe uma perda de 10 a 20 milhões de perdas de grupos metil por célula (GOELZ et al. 1985; FEINBERG et al. 1988).

Apesar perda da metilação do DNA foi associada à inibição da condensação dos cromossomos e pode levar a não disjunção mitótica (SCHMID et al. 1984), resultando na perda ou ganho de cromossomos. Assim, a hipometilação pode contribuir para a instabilidade genômica tumoral e alterar a taxa com a qual alterações como as perdas alélicas acontecem.

Um estágio particular da progressão do adenoma avançado para o adenocarcinoma envolve o gene *TP53*. A mutação do gene *TP53* parece demarcar a transição de adenoma, que é uma lesão benigna, para um tumor maligno, sendo observada em 70% dos carcinomas colorretais esporádicos (DONEHOWER et al. 1992). O modelo de carcinogênese descrito acima se encontra demonstrado na Figura 1.



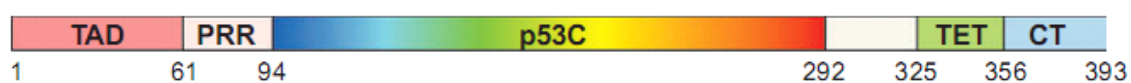
Fonte: MUTO et al. (1975); FEARON e VOGELSTEIN (1990).

Figura 1 - Via de Carcinogênese do CCR. A figura mostra a seqüência de alterações genéticas atribuídas à via de progressão adenoma-carcinoma.

1.3 O GENE *TP53*

O gene *TP53* é um gene supressor tumoral (MIM#191170) localizado na região 17p13.1 e é responsável pela codificação de uma fosfoproteína de 53 kDa, que é o fator de transcrição para vários genes que regulam o funcionamento celular. O tamanho aproximado do gene *TP53* é de 20 Kb e é composto por onze exons, sendo o primeiro deles não codificante. A seqüência codificante contém cinco domínios caracterizados por funções específicas (MAY e MAY 1999). O domínio de transativação compreende os aminoácidos 1 ao 61, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína MDM2 (do inglês, *murine double minute 2*), que regula a expressão da proteína p53. O domínio seguinte é composto por uma região rica em resíduos de prolina, entre os aminoácidos 61 e 94, e é seguida pela região central, que contém o domínio de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 94 a 292, uma região de alta frequência de mutações. A região entre os aminoácidos 292 e 325 possui o sinal de localização nuclear. O domínio de

oligomerização (aminoácidos 325 a 356) é de fundamental importância na configuração tridimensional de p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá formando um tetrâmero. O domínio final é o de regulação, entre os aminoácidos 356 e 393. A estrutura do gene *TP53* encontra-se representada na Figura 2.



Fonte: JOERGER e FERSHT (2008).

Figura 2 - Figura representativa dos domínios do gene *TP53*. TAD – domínio de transativação. PRR: região rica em prolínas. p53C: domínio de ligação ao DNA. TET: domínio de tetramerização. CT: região carboxi-terminal. Entre os aminoácidos 292 e 325 fica o sinal de localização nuclear (*NLS – nuclear localization signal*).

A proteína p53 regula muitas funções celulares, incluindo progressão do ciclo celular, reparo do DNA, senescência, apoptose e metabolismo celular (EL-DEIRY et al. 1994; HOLLSTEIN e HAINAUT 2010).

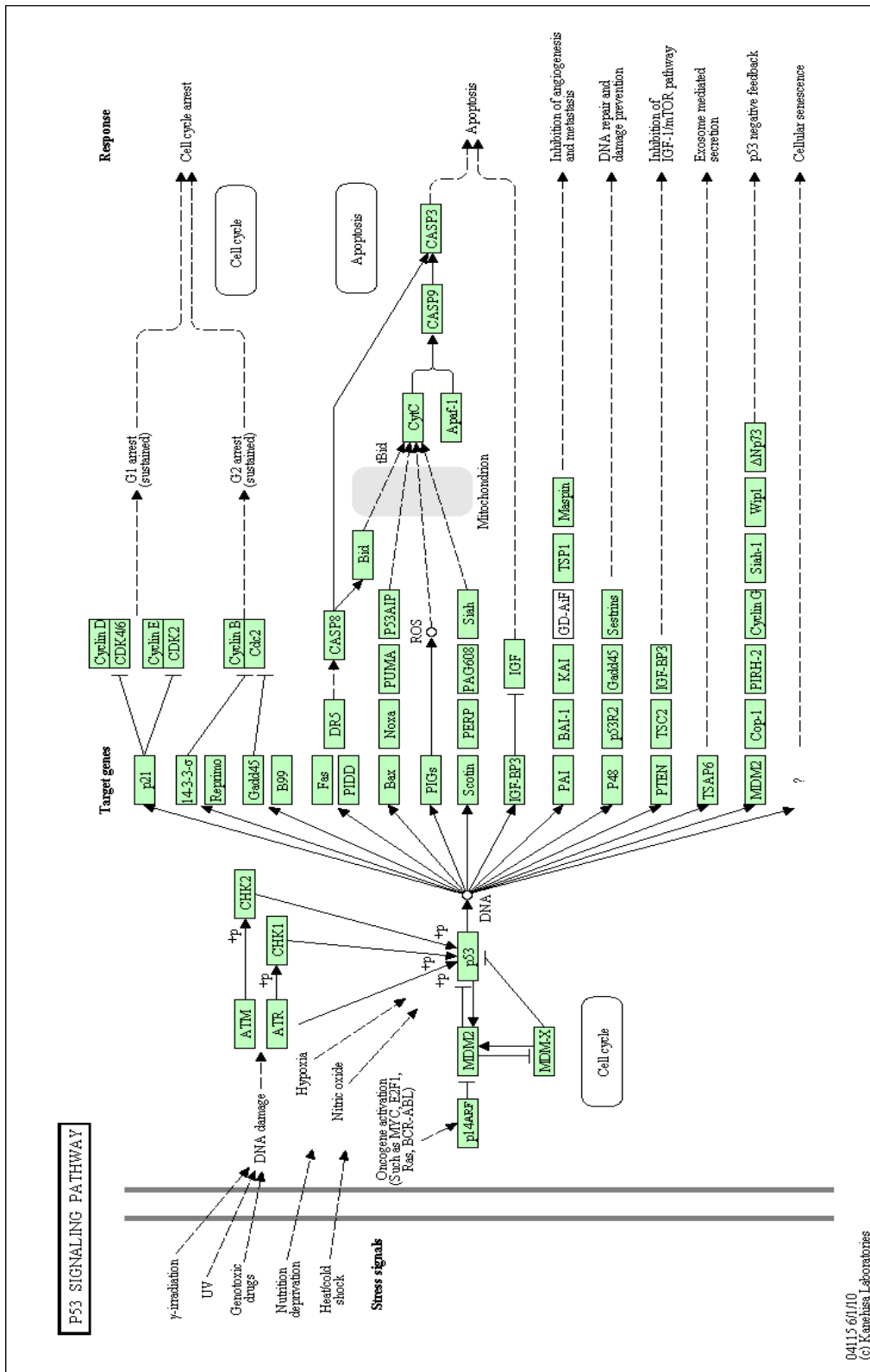
A indução de p53 pode ter três principais consequências: parada do ciclo celular e reparo ao DNA; direcionamento para morte celular programada (apoptose); ou parada permanente na replicação celular (senescência). Tais programações alternativas são direcionadas pela mesma proteína através da indução da transcrição de genes alvos, e fundamentalmente por modificações covalentes nos resíduos de aminoácidos da proteína, funcionando como um “código de barras” que especifica qual promotor gênico será reconhecido para estimulação ou repressão, e também direcionando a proteína para diferentes localizações

dentro da célula (LEVINE et al. 1991; LANE 1992; HAINAUT 1995; O'FARRELL et al. 2004).

Quando ocorre um dano no DNA, a proteína p53 torna-se estável e então ativa genes como o *p21* e o *GADD45*, que levam a parada do ciclo celular em G1 permitindo o reparo do DNA, antes que a célula se dirija para fase S. Se o dano for irreparável, p53 medeia a ativação de genes que resultam na morte da célula. Estudos mostram que a ativação do gene *TP53* não é apenas decorrente do dano no DNA, mas também decorrentes de genotoxicidade, hipoxia, hiperoxia, citocinas, fatores de crescimento, estresse oxidativo, alterações metabólicas, contato entre as células, ativação de oncogenes e vários outros fatores (PRIVES e HALL 1999).

A proteína p53 pode se localizar no citoplasma, mitocôndria ou núcleo, ligada ou não a outras proteínas que determinam suas funções, interações ou taxa de degradação. As modificações em p53 podem influenciar na sua localização celular, e assim, ter importante impacto na especificidade de sua função, já que dependendo da localização, esta proteína pode ter distintos, ou algumas vezes opostos mecanismos de ação ou efeitos na fisiologia ou no crescimento celular. No núcleo, o principal efeito é a ativação ou repressão de genes que controlam o destino celular. No citoplasma e mitocôndria, os mecanismos pelos quais p53 influencia o comportamento celular são mais diversos e menos estudados. A influência de p53 na autofagia (processo que, dependendo das circunstâncias, pode aumentar a sobrevivência celular reciclando macromoléculas em condições de depleção) é um exemplo disso. O efeito na autofagia parece ser mais

inibitório quando p53 é sequestrado no citoplasma, mas potencialmente estimulatório quando p53 está concentrado no núcleo, onde tem atividade transcricional (PRIVES e HALL 1999). Um diagrama representativo das funções já descritas de p53 encontra-se na Figura 3.



Fonte: JOERGER e FERSHT (2008).

Figura 3 - Vias de ação de p53. Diagrama representativo das interações, reações e relações moleculares de p53.

A ligação com MDM2 também induz a exportação de p53 do núcleo para o citoplasma (LJUNGMAN 2000). O dano ao DNA e os sinais de estresse induzem modificações pós-traducionais em p53 que desregulam o complexo p53/MDM2, levando ao acúmulo proteico. A ubiquitinação de p53 por MDM2 produz vários efeitos. Enquanto a poli-ubiquitinação essencialmente serve como alvo para a degradação, a mono-ubiquitinação regula as funções de p53 independentemente de processos de degradação, talvez por aumentar a exportação nuclear de p53 (LJUNGMAN 2000).

Os diversos parâmetros que determinam a expressão, modificação, acúmulo e localização das proteínas p53 podem explicar como um único gene pode apresentar um extensivo repertório de atividades. Além do controle pós-traducional da degradação de p53 em resposta ao estresse, a expressão de p53 é alvo de múltiplas regulações, no nível transcricional e pós-transcricional e ainda traducional.

Vários mecanismos podem alterar a função de *TP53*, dentre eles, a perda de heterozigose (LOH), a metilação do DNA, os miRNAs, os polimorfismos e as mutações. As mutações são as principais alterações verificadas na carcinogênese, no entanto, outros mecanismos que levam à inativação da p53 podem ocorrer nas células neoplásicas. Estas alterações incluem a perda de um alelo ou mesmo de todo o cromossomo, o sequestro e destruição da proteína ativa por proteínas celulares ou virais, repressão transcricional, degradação proteica acelerada, modificação da conformação da proteína, inativação proteica e alteração na distribuição celular da proteína (HAINAUT 2005; HOLLSTEIN e HAINAUT 2010). Sua inativação

resulta na perda de função da proteína p53 e tem papel importante na tumorigênese e progressão de vários tumores, incluindo o CCR.

A mutação no gene *TP53* é a alteração genética mais comumente encontrada em tumores humanos, evidenciando que suas funções limitam o crescimento tumoral. Inúmeros estudos envolvendo o gene *TP53* têm revelado uma complexa rede de fatores que regulam o seu desempenho. O gene tem vários promotores, formas alternativas de *splicing* e sítios alternativos de iniciação da tradução. Mais de 10 isoformas de p53 têm sido identificadas. No nível pós-traducional, a atividade de p53 depende da sua concentração celular, nas mudanças qualitativas em sua estrutura, localização intracelular, atividade de ligação ao DNA e de interações com outras proteínas (HAINAUT 2005; HOLLSTEIN e HAINAUT 2010).

Nos últimos anos um número crescente de mutações somáticas foi identificado por diferentes grupos, levando à geração de banco de dados mutacionais, como, por exemplo, o da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) denominado *IARC p53 Mutation Database* (<http://www-p53.iarc.fr/index.html>).

Dentro desse levantamento de mutações, um grupo importante de mutações pontuais em *TP53* são mutações sinônimas, caracterizadas por alterações que não resultam em alteração do aminoácido e, portanto, não resultaria em alterações proteicas. Entretanto, o número de mutações sinônimas depositado no banco do IARC é muito maior do que o esperado se essas mutações fossem realmente neutras (LAMOLLE et al. 2006). E além, acredita-se que este tipo de mutação ocorra em maior frequência do

que tem sido reportado até o momento (CHAO et al. 2001). A explicação mais comumente aceita da ocorrência das mutações sinônimas nos tumores seria uma consequência da mutabilidade que afeta as células neoplásicas. Entretanto, um grupo no Uruguai tem estudado a distribuição espacial deste tipo de mutações no gene *TP53* e tem observado, por meio de diferentes abordagens estatísticas, que a distribuição das mutações sinônimas não é um fenômeno ao acaso. Especificamente, as mutações sinônimas se encontram localizadas nos códons que codificam aminoácidos relevantes no ponto de vista funcional, e também tendem a se localizar em prováveis regiões reguladoras de *splicing* (LAMOLLE et al. 2006).

Tem sido proposto que as variações em regiões reguladoras de *splicing* podem resultar em efeitos deletérios no processo de *splicing* dos precursores do RNA mensageiro (pré-mRNA). Estas mutações poderiam provocar a omissão completa de um *exon*, a retenção de um *intron* ou mesmo a introdução de novos sítios de *splicing* em *exons* ou *introns* (BARALLE e BARALLE 2005). Por este motivo, as mutações sinônimas ou mesmo as não sinônimas localizadas em regiões reguladoras de *splicing* poderiam ser implicadas no desenvolvimento e evolução do câncer (LAMOLLE et al. 2006). Em outros genes associados ao câncer, tais como o gene *MLH1* (AUCLAIR et al. 2006) e *BRCA1* (ORBAN e OLAH 2001), tem se mostrado que mutações sinônimas estão envolvidas com o processo carcinogênico devido ao fato que estas afetam sequências regulatórias e produzem *splicing* aberrante. Entretanto, para o gene *TP53* estas evidências experimentais não foram encontradas até o momento. Desta forma, o estudo

da presença de mutações sinônimas em tumores colorretais e sua correlação com a incidência de *splicing* aberrante é uma abordagem inédita. Os tumores colorretais são neoplasias propícias a este tipo de estudo já que a presença de mutações do gene *TP53* é muito frequente neste tipo de tumor.

Os eventos genéticos seqüenciais múltiplos envolvidos na tumorigênese resultam da ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor, o que permite escape das células da estrita regulação normal. Assim, a expressão de proteínas supressoras tumorais é finamente regulada, de forma que a expressão aberrante de um gene pode predispor indivíduos ao desenvolvimento de câncer (LIM e MAHER 2010).

Estima-se que 50% dos tumores humanos apresentam mutação no gene *TP53* sendo que a maioria das mutações são *missense*, levando a síntese de uma proteína completa (SOUSSE e BEROUD 2001), que perde a função de se ligar ao DNA, que tem sua degradação através da proteína MDM2 inibida e, então, se acumula no núcleo das células tumorais. A detecção do acúmulo intracelular da proteína p53 através da técnica de imunohistoquímica em tumores colorretais, como resultado de uma mutação *missense* é amplamente aceita, sendo que 80-90% destes casos apresentam positividade para a proteína p53. Este acúmulo pode não ser evidenciado em aproximadamente 10% dos casos, o que pode ser decorrente da deleção do gene em ambos os alelos, ou ainda, quando ocorre uma mutação que não afeta a meia-vida da proteína p53 (HARRIS e HOLLSTEIN 1993; HANSKI et al. 1996).

Assim, a divisão em grupos definidos pela presença ou não da expressão da proteína p53 deve-se a estreita correlação entre expressão desta proteína e a presença de mutação no gene *TP53* (SOUSSI e BEROULD 2001). Sabe-se que a proteína p53 selvagem apresenta uma vida média muito curta de aproximadamente 5 a 20 minutos (GIACCIA e KASTAN 1998). Em contraste, a proteína oriunda de um gene mutado apresenta uma vida média longa e por isso é facilmente detectada pela metodologia de imunistoquímica (COGGI et al. 1997).

Supõe-se que a variação na função de genes responsáveis pelos mecanismos de reparo ao DNA e de controle do ciclo celular, na presença de dano causado por carcinógenos, constitui-se em um mecanismo atrativo para explicar a variação interindividual de susceptibilidade (TANG et al. 2010).

O gene *TP53*, como um importante mediador contra insultos genotóxicos, representa um candidato para susceptibilidade ao CCR. Polimorfismos e diferenças de expressão gênica fornecem a base genética para a diversidade humana (PASTINEN et al. 2006; STOREY et al. 2007). A variação de expressão alélica, em particular, pode ter um papel crucial na variabilidade fenotípica e susceptibilidade às doenças.

Os polimorfismos de base única (SNPs) têm sido reportados por influenciar o risco a vários tumores (CHUNG e CHANOCK 2011). O gene *TP53* apresenta vários polimorfismos, sendo a maioria intrônicos. O SNP de transição CCC para CGC no códon 72 está localizado no exon 4 (rs1042522), levando à uma substituição do aminoácido prolina para

arginina. Muitos estudos caso-controle têm sido conduzidos para entender a associação entre este SNP e o CCR. Entretanto, os resultados ainda são inconsistentes.

Algumas linhas de estudo mostraram que as duas variantes do SNP 72Pro>Arg conferem diferentes propriedades para a proteína p53 (MARIN et al. 2000). As variantes não são bioquimicamente equivalentes, já que diferem na capacidade de indução da transcrição gênica, na interação com p73 e no direcionamento para o proteassomo. Além disso, este polimorfismo mostrou taxas diferentes de modulação da apoptose em diferentes sistemas experimentais (MAMMANO et al. 2009).

O alelo Pro72 é menos eficiente do que o alelo Arg72 na supressão da transformação celular e indução da apoptose. MARIN et al. (2000) sugeriram que o alelo Pro72 mostra uma diminuição na eficiência de ligação a p73 e conseqüentemente, inibindo a apoptose dependente de p73 nos mutantes.

Outro polimorfismo muito estudado em *TP53* é o polimorfismo de inserção de 16 pb no intron 3 (alelo A2; PIN3; rs17878362; c.96+41_96+56del16). Estudos sugerem que a inserção de 16 pb no intron 3 interfere no mecanismo normal de *splicing* e no processamento do mRNA, o que leva a uma diminuição da expressão de p53 (GEMIGNANI et al. 2004). Além disso, o polimorfismo PIN3 tem sido associado a um aumento de risco para muitos tumores (WANG-GOHRKE et al. 1998; WANG-GOHRKE et al. 1999; WESTON et al. 1997; COSTA et al. 2008; HU et al. 2010). A

frequência deste polimorfismo é de 0,2 para caucasianos (OLIVIER et al. 2010).

Além das alterações genéticas encontradas em *TP53*, as associações destas alterações com fatores clinicopatológicos podem fornecer dados relevantes para o melhor entendimento da carcinogênese colorretal. Um estudo recente, que avaliou o uso de folato e o risco de CCR, observou a associação de uma baixa ingestão de folato com aumento no risco de CCR, apenas nos tumores que apresentam mutação no gene *TP53* (SCHERHAMMER et al. 2008). No entanto, estes tipos de estudos foram realizados nos Estados Unidos e Europa e sabe-se que os fatores ambientais podem influenciar os diferentes tipos de tumores sob o aspecto molecular em populações diferentes, tornando a busca de correlações entre as alterações no gene *TP53* e os aspectos clinicopatológicos de fundamental importância.

1.4 *SPLICING* ALTERNATIVO

O *splicing* alternativo é o processo pelo qual um único gene pode produzir diferentes transcritos, que podem apresentar diferentes atividades e são responsáveis por grande parte da diversidade proteômica (CLANCY 2008).

O mecanismo bioquímico através do qual o *splicing* ocorre tem sido bem estudado em vários sistemas e atualmente está bem caracterizado. Os introns são removidos dos transcritos primários por clivagem através do

reconhecimento de sequências conservadas nas extremidades 5' e 3' dos introns. Comumente, a remoção do intron ocorre com o reconhecimento das bases GU na extremidade 5' e AG na extremidade 3' do intron. Outra sequência importante é o ponto de quebra, composto por uma base adenina, localizado de 18 a 40 nucleotídeos upstream da extremidade 3' do intron. Por fim, uma sequência importante para o reconhecimento é o trato de polipirimidina, região rica em bases timina e citosina, localizada cerca de 15 nucleotídeos upstream da extremidade 3' do intron. O *splicing* ocorre no spliceossomo, em várias etapas e é catalizado por pequenas ribonucleoproteínas (snRNPs), que reconhecem as bases dos sítios de quebra e removem o intron através da formação de um laço e ligam os exons covalentemente (CLANCY 2008).

Durante o curso das pesquisas sobre *splicing*, foram descobertos padrões alternativos de *splicing* através da mesma molécula de pré-mRNA, gerando diferentes mRNAs funcionais. O primeiro exemplo de *splicing* alternativo foi demonstrado em adenovírus, onde uma molécula de pré-mRNA resultava em diferentes moléculas de mRNA contendo diferentes combinações de exons (BERGET et al. 1977).

As isoformas de p53 foram identificadas em estudos sobre padrões de expressão. MATLASHEWSKI et al. (1984) clonaram a variante N-terminal do mRNA de p53 humano e WOLF et al. (1985) detectaram uma variante C-terminal de p53 de camundongo produzida por *splicing* alternativo e posteriormente isolada em células humanas.

Variantes de *splicing* de *TP53* de humanos e camundongos foram descritas a mais de 10 anos (MATLASHEWSKI et al. 1987, FLAMAN et al. 1996, ARAI et al. 1986), mas a existência e o significado destas variantes foram reconhecidos na última década (COURTOIS et al. 2002, GHOSH et al. 2004, BOURDON et al. 2005, BOURDON 2007). Um total de 10 isoformas humanas é atualmente caracterizado por ser produzido por *splicing* alternativo, uso alternativo de sítio de iniciação ou de promotor (MARCEL e HAINAUT 2008; MARCEL et al. 2011). O papel e a atividade destas isoformas ainda não são totalmente compreendidos.

1.5 HRM

A técnica de *High Resolution Melt* (HRM) é uma nova tecnologia que permite o rastreamento de alterações gênicas em fragmentos amplificados previamente ao sequenciamento. Trata-se de uma poderosa técnica para detecção de mutações, polimorfismos, diferenças epigenéticas em amostras de fita dupla de DNA. É uma metodologia que analisa a curva de dissociação de duplas-fitas de DNA, baseada na diferença da temperatura de *melting* (dissociação) e no formato da curva. Uma das vantagens na utilização de HRM é reduzir a quantidade de amostras a serem sequenciadas, rastreando as alterações não conhecidas no gene de forma rápida. Além disso, a técnica permite que os produtos de PCR sejam sequenciados após simples diluição, eliminando novos ciclos de PCR para gerar produtos para o sequenciamento.

A região de interesse é amplificada utilizando iniciadores específicos na presença de agentes fluorescentes intercalantes de DNA, que são incorporadas na formação da dupla fita de DNA. A análise de HRM é realizada aquecendo a amostra da dupla fita de DNA de 50°C até 95°C, de forma a atingir a temperatura de denaturação das fitas de DNA, que se separam, liberando o agente intercalante. Dessa maneira, no início da análise existe uma alta fluorescência incorporada nas duplas fitas, e à medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui com a denaturação das fitas de DNA. A temperatura de dissociação das fitas de DNA corresponde à temperatura onde metade do produto amplificado está dissociada (denaturada) e é dependente da sua sequência de bases, de forma que uma alteração de base na região amplificada provoca mudança na temperatura de dissociação, que pode ser identificada e analisada por *softwares* específicos, originando curvas de dissociação específicas. Assim, a técnica de HRM é um método eficiente, rápido, flexível e conveniente para a identificação (*screening*) da presença de mutações, reduzindo a quantidade de amostras que podem posteriormente ser investigadas pelo sequenciamento (VOSSSEN et al. 2009). A análise de HRM é realizada em equipamentos de PCR em tempo real, como o *7500 Fast ou 7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies, Estados Unidos)*.

Até o início do presente trabalho existiam, na literatura, apenas dois estudos avaliando o gene *TP53* através de HRM, um com tumores de mama e outro com tumores de ovário. Atualmente ainda existem pouquíssimos estudos que utilizam HRM para um rastreamento de alterações em *TP53*,

nenhum deles realizado com tumores colorretais. Alguns estudos demonstraram correlações e discrepâncias entre o acúmulo de p53 mutações em seu gene utilizando diferentes metodologias, como SSCP (*single strand conformation polymorphism*), DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) e sequenciamento direto, mas não utilizando o HRM (SZYBKA et al. 2009).

BALIC et al. (2009) conseguiram avaliar a metilação de DNA proveniente de 66 amostras de CCR de material parafinado utilizando HRM com consistentes resultados. A possibilidade de estudar material parafinado utilizando HRM torna a tecnologia ainda mais promissora.

2 JUSTIFICATIVA

O mal funcionamento da via de p53 é uma característica quase universal dos tumores humanos (VOGELSTEIN et al. 2000; VOUSDEN et al. 2007). Mutações somáticas em TP53 que resultam na perda de função de p53 é um dos mecanismos mais comuns na tumorigênese. A perda direta do funcionamento apropriado de p53 é frequentemente associada com um prognóstico desfavorável em alguns tipos de câncer (PETITJEAN et al. 2007).

As mutações associadas aos tumores esporádicos surgem nas células somáticas tanto espontaneamente, quanto como consequência de um dano ao DNA. As mutações relacionadas ao câncer são usualmente substituições de base única que resultam em trocas do aminoácido, e na maioria das vezes, concentradas na região de ligação ao DNA. Tipicamente, tais mutações associadas aos tumores culminam com a perda da função normal de p53 (WHIBLEY et al. 2009).

Mais de 200 polimorfismos foram identificados em *TP53*. Ao contrário das mutações associadas aos tumores, espera-se que a maioria dos polimorfismos sejam fenotipicamente silenciosos. Poucas variantes comprometem as atividades normais de p53, ainda que estes efeitos sejam mais sutis do que os causados pelas mutações. Devido à importância das proteínas p53 na supressão dos tumores, polimorfismos que alterem a

função de p53 podem afetar o risco de câncer, a progressão ou ainda a resposta ao tratamento (WHIBLEY et al. 2009).

Além disso, a combinação dos efeitos causados pelas alterações em *TP53* e as exposições ambientais pode influenciar no risco de câncer e no curso da doença.

Enquanto existem evidências de que tanto os polimorfismos codificantes quanto os reguladores contribuem para a variação observada nos complexos traços humanos, suas contribuições relativas ainda precisam ser determinadas. As diferenças de expressão entre alelos do mesmo gene têm sido observadas em várias espécies, incluindo os humanos. Tais diferenças de expressão dos alelos são interessantes devida à possibilidade que elas possam contribuir para uma variação fenotípica entre indivíduos (PANT et al. 2006).

Em contraste com o progresso elucidando a regulação da função de p53 selvagem, o controle da atividade das proteínas mutantes de p53 ainda é pouco conhecido.

Este trabalho apresenta fundamental importância para um melhor entendimento da carcinogênese colorretal. O CCR é uma doença heterogênea, na qual vários mecanismos moleculares estão relacionados com seu desenvolvimento e progressão. Na tentativa de estabelecer regimes de quimioprevenção e tratamentos personalizados, é necessário entender melhor os achados moleculares.

Adicionalmente, este estudo visa não somente verificar achados prévios em literatura, mas também ampliar o conhecimento atual e

proporcionar novos resultados para linhas de investigação futuras, visando contribuir para o conhecimento científico. Em suma, o projeto proposto pretendeu coletar, analisar, interpretar e disseminar as informações resultantes do estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel das alterações encontradas no gene *TP53* em tumores colorretais e buscar associações com os dados clinicopatológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar alterações das sequências de mRNA (cDNA) do gene *TP53* e a expressão proteica de p53 por imunistoquímica;
- 2) Verificar a frequência das alterações em *TP53* encontradas em CCR;
- 3) Verificar a frequência de mutações sinônimas relacionadas ao mecanismo de *splicing*;
- 4) Analisar as sequências de gDNA para verificar se existe diferença entre as alterações encontradas através do sequenciamento do cDNA e do gDNA;
- 5) Buscar associações entre as alterações encontradas e os dados clinicopatológicos;
- 6) Padronizar e avaliar a utilização da técnica de *High Resolution Melting* para rastrear as alterações em *TP53*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS CASOS

O estudo utilizou amostras biológicas de pacientes com CCR esporádicos submetidos à cirurgia no Hospital A.C. Camargo no período de 2000-2006. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo, com o número de parecer CEP 1042-08. Trata-se de um estudo observacional transversal, que, apesar de não envolver uma intervenção ativa, contempla a avaliação de um importante potencial de risco.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram selecionados casos que apresentaram tumores colorretais congelados pareados com tumores que tenham sido fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP), com:

- Confirmação diagnóstica de adenocarcinoma;
- Confirmação do estadiamento.

4.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes que receberam tratamento cirúrgico ou quimioterápico prévio em outra instituição;

- Pacientes que receberam tratamento neoadjuvante com radio ou quimioterapia;
- Pacientes que tiveram outra neoplasia primária, com exceção de neoplasias de pele não melanoma;
- Pacientes portadores de síndromes associadas à predisposição de tumores colorretais.

Foram levantados dados de 396 casos de CCR que se encontravam armazenados no Banco de Tumores do Hospital AC Camargo, excluindo 77 pacientes com tumores prévios, 10 com tumores sincrônicos, 31 que fizeram neoadjuvância, 15 operados do tumor primário em outra instituição, 1 com prontuário incompleto, 1 com retocolite ulcerativa, 5 com polipose familiar, 17 com síndrome de Lynch e 8 por falta de material em parafina ou congelado para análise. Amostras com menos de 60% de células tumorais ou com material diminuto foram descartadas.

Foram levantados os dados clínicos dos pacientes em fichas padronizadas, como: sexo, idade, hábito de fumar, idade do diagnóstico, localização do tumor colorretal, uso de adjuvância pós-cirurgia, recidiva do tumor e situação do paciente ao final do seguimento. Dados como: estadiamento TNM, grau de diferenciação do tumor, presença de embolização vascular sanguínea ou linfática, invasão perineural, presença de necrose suja, presença de reação Crohn's-like, tipo histológico, presença de budding e padrão de crescimento de borda tumoral foram revistos pelo

patologista gastrointestinal (RAC). A ficha utilizada para coleta e organização dos dados encontra-se no Anexo 1.

Deste levantamento foram selecionadas 101 amostras de CCR. Os dados foram revistos nos prontuários individuais. A avaliação imunohistoquímica (IHC - *immunohistochemistry*) foi realizada no tecido tumoral FFEP arquivado. Já a avaliação do RNA e do DNA foi realizada no tecido congelado pareado que se encontrava no Banco de Tumores.

Foram estudadas amostras de DNA proveniente de sangue de 97 pacientes sem CCR e sem história familiar de CCR até o 2º grau de parentesco, que foram utilizados como controles. Foram avaliados 46 homens e 51 mulheres, com média de idade de 49 anos (20-80 anos).

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA (IHC)

O estudo imunohistoquímico foi realizado em todos os tumores selecionados, em cortes de 3 µm dos blocos de parafina dos tumores, utilizando anticorpo contra a proteína p53 (clone DO7, diluição 1:100, DAkoCytomation cat#M3701, Glostrup, Dinamarca), seguindo protocolo anteriormente estabelecido (Anexo 2).

A leitura das lâminas foi realizada utilizando microscópio óptico comum e a extensão da positividade das células foi analisada em toda extensão do tumor em porcentagem de células malignas positivas.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA E DNA

O RNA e DNA das amostras foram extraídos do tecido fresco congelado correspondente ao tecido FFEP.

Foram realizados cortes de 5 µm em creostato à -20°C dos tumores selecionados que se encontram congelados em lâminas de vidro em temperatura ambiente. Estas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum, e nas lâminas que apresentaram mais que 60% de tecido tumoral foram realizadas microdissecção manual total ou parcial para a subsequente extração dos ácidos nucleicos.

O RNA foi extraído do material congelado utilizando-se reagente Trizol[®] (*Life Technologies*, Estados Unidos), seguindo protocolo padrão (Anexo 3). A quantificação e avaliação da qualidade foram realizadas utilizando-se 1µl de RNA no *Picochip 6000* no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent*, Estados Unidos), conforme exemplificado na Figura 4. Amostras com valores de índice de integridade (RIN) inferiores a 3 foram descartadas.

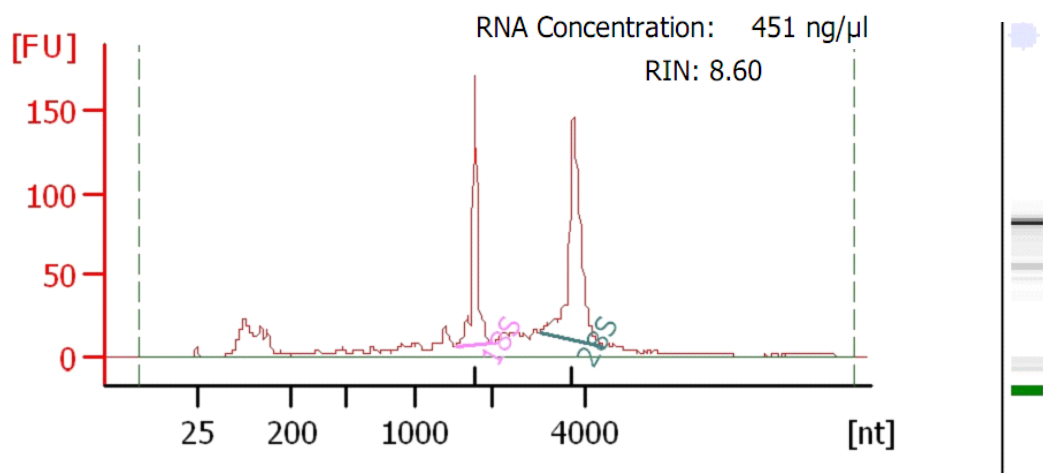


Figura 4 - Controle da extração de RNA. A figura representa o resultado da eletroforese do RNA de uma das amostras no Bioanalyzer. Os picos de RNA 18S e 28S estão evidenciados.

O DNA de todos os casos foi extraído utilizando-se fenol/clorofórmio (Anexo 4), quantificado utilizando-se 1 μ l de DNA no NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) e a seguir avaliado quanto a sua integridade através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos para a β -actina: *Foward* 5' - GTGTTGTGGGTGTAGGTAG- 3' e *Reverse* 5' - CATGTCACACTGGGGAAG - 3', contendo 211 pares de bases (Figura 5). A β -actina foi utilizada nas reações como controle de qualidade integridade do material obtido. O DNA foi armazenado a - 20°C.

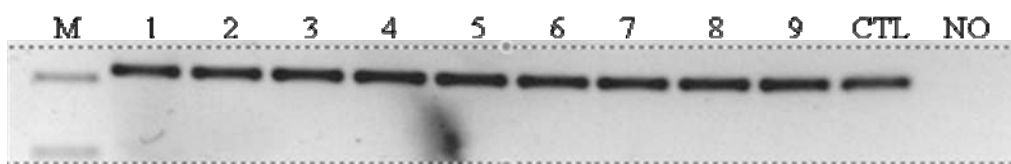


Figura 5 - Controle da extração de DNA. A figura representa o resultado da amplificação do DNA extraído utilizando iniciadores de *β-actina*. M- marcador de peso molecular; 1-9: amostras; CTL- controle positivo; NO- reação sem DNA.

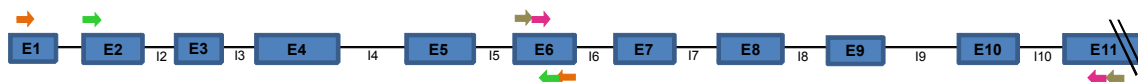
4.4 DESENHO DOS INICIADORES PARA SEQUENCIAMENTO

Foram desenhados iniciadores entre os exons 2 e 11 para amplificação e avaliação de *splicing* de toda a região codificante, tanto para o sequenciamento dos transcritos (cDNA) quanto para o sequenciamento do DNA genômico (gDNA). O gene *TP53* possui 11 exons com uma molécula codificadora de 1.182 pb.

Para o desenho dos iniciadores procurou-se seguir os seguintes critérios: composição de bases C e G dos iniciadores em torno de 50%; comprimentos de no mínimo 15 bases; temperatura média de anelamento de 55°C; e diferença de no máximo 2°C entre os pares de iniciadores. Para verificar a presença de estruturas secundárias entre os homo ou heterodímeros foi utilizado o programa OLIGOTECH versão 1.00 (Copyright© 1995), considerando como permitido a formação destas estruturas na temperatura de até 20°C. Todos os iniciadores foram diluídos a uma concentração estoque de 100 μM, de onde foram feitas alíquotas de trabalho na concentração de 10 μM.

A localização dos iniciadores estão demonstradas na Figura 6. As sequências dos iniciadores estão descritas nos Quadros 1 e 2 do Anexo 5.

A



B



Figura 6 - Representação da localização dos iniciadores. A: representação dos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA; B: representação dos iniciadores utilizados para amplificação do gDNA. Os pares de iniciadores estão indicados por cores.

4.5 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO cDNA

O RNA das 101 amostras foi convertido em cDNA por transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado 1 µg de RNA para cada reação de 20 µL. A reação foi incubada em termociclador seguindo as seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Desta reação, 1 µL do produto da transcrição reversa foi utilizado como molde para a reação de PCR.

A PCR foi realizada em um total de 25 µL, sendo: 0,2 mM de dNTPs (Life Technologies, Estados Unidos), 1,5 mM MgCl₂, 0,3 µM de iniciadores específicos e 1,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Estados Unidos).

O cDNA foi utilizado em duas reações de PCR diferentes, uma para o fragmento 5' do exon 2 ao 6 e outra para o fragmento 3', do exon 6 ao 11. Cada um deles foi amplificado com um par de iniciadores específicos (5' E2ForE/E6RevE, e 3' E6ForE/E11RevE). A reação foi incubada em termociclador utilizando as seguintes condições: 15 minutos a 95°C, e 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 52°C (fragmento 5') ou 51°C (fragmento 3'), e 2 minutos a 72°C. Finalmente uma extensão de 10 minutos a 72°C.

Após da amplificação, 10 µL do produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando *SyberSafe* (*Life Technologies*, Estados Unidos). Não foi necessário utilizar amplificação por *nested* PCR devido a um bom rendimento no primeiro *round* de amplificação, de forma que todos os produtos gerados foram amplificados utilizando-se apenas um par de iniciadores.

4.6 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO gDNA

Para amplificação dos exons 5 ao 11 do gDNA, a PCR foi realizada em um total de 25 µL, sendo: 60 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (*Life Technologies*, Estados Unidos), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM de iniciadores específicos e 0,7 U de *AmpliTaq Gold*[®] *DNA Polymerase* (*Life Technologies*, Estados Unidos).

Para amplificação dos exons 2 ao 4 do gDNA, a PCR foi realizada em um total de 20 μL , sendo: 60 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (*Life Technologies*, Estados Unidos), 1,5 mM MgCl_2 , 0,3 μM de iniciadores específicos e 0.5 U de *Platinum Taq Hi-Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen, Estados Unidos).

4.7 SEQUENCIAMENTO DIRETO

Para a reação de sequenciamento utilizou-se 1 μL de ExoSAP-IT (USB, Estados Unidos) para realizar a purificação de 7 μL do produto da PCR, para degradar o excesso de iniciadores e de dNTPs. A reação foi incubada 30 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas.

Em seguida, 3 μL do produto da PCR purificado foi utilizado para 10 μL de reação de amplificação para o sequenciamento com 0,3 μM de iniciador específico e 1 μL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Life Technologies*, Estados Unidos). A reação foi incubada 2 minutos a 95°C, mais 40 ciclos de 18 segundos a 95°C, 18 segundos a 52°C, e 4 minutos a 60°C.

Para o método de precipitação da reação de sequenciamento foi adicionado a reação 1 μL de EDTA 125 mM (pH 8,8) e Acetato de Sódio 3M (pH 5,2), além de 30 μL de etanol 100%. Em seguida, a reação foi deixada no escuro para precipitação do DNA, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a precipitação, a reação foi levada à centrífuga por 45 minutos a 4000

rpm e, em seguida o sobrenadante foi eliminado vertendo-se a placa e com uma rápida centrifugação da placa invertida para total eliminação do sobrenadante. Adicionou-se 30 µl de etanol 70% ao produto precipitado para lavagem, seguido de uma centrifugação de 45 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi eliminado vertendo-se a placa e a reação foi levada ao termociclador a 95°C por 20 minutos, para evaporação do etanol. As amostras foram ressuspensas em 13 µl de formamida *Hi-Di* (Life Technologies, Estados Unidos), denaturadas a 95°C em termociclador por 3 minutos e, imediatamente acondicionadas em gelo por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI PRISM 3130xl *Automated Genetic Analyser* (Life Technologies, Estados Unidos).

4.8 HRM

As reações de HRM foram feitas no *Real-Time Fast 7500* (Life Technologies, Estados Unidos), sendo necessárias três calibrações: Background (com água), que assegura o mínimo de variação de sinal do fundo da placa; *Pure Dye*, utilizando a placa comercialmente pronta *MeltDoctor™ HRM Calibration Plate*, que calibra o equipamento para reconhecer a fluorescência presente no *master mix*; e por fim, a calibração HRM, utilizando a mesma placa comercial, que calibra o *software* a quantificar a fluorescência durante a curva de dissociação. A curva de dissociação é gerada utilizando o “*expert mode*”, que coleta os dados apenas em um filtro, e, portanto, gera mais pontos de dados necessários

para a “alta resolução” necessária à técnica de HRM. Não é utilizada nenhuma referencia passiva.

Todas as calibrações do equipamento foram realizadas utilizando placas customizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados das curvas resultantes da calibração HRM estão demonstrados na Figura 7.

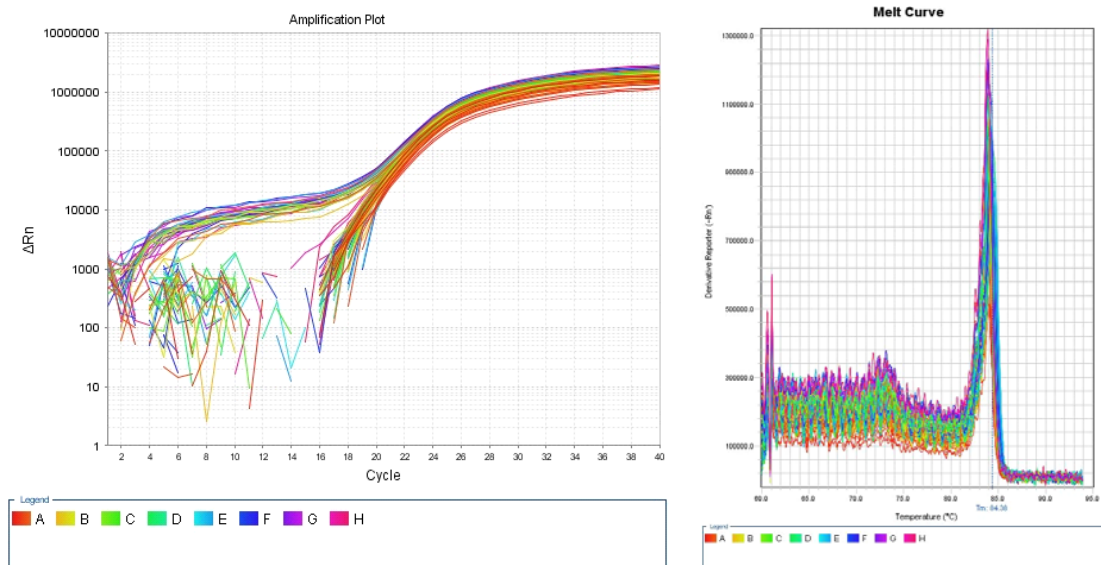


Figura 7 - Gráficos representativos das calibrações de HRM, amplificação da placa comercial (esquerda) e a curva de dissociação derivada (direita).

Além das calibrações, foi comprado um kit de controle positivo do fabricante, o *MeltDoctor™ HRM Positive Control Kit* (Life Technologies, Estados Unidos). Trata-se de um par de iniciadores e três amostras de DNA compostas por variantes homocigota dominante, heterocigota e homocigota recessiva. Serve para verificar se o software está sendo capaz de detectar as variantes corretamente. Assim, o kit de controle positivo foi utilizado antes das análises de HRM para o gene *TP53*, e apresentou os resultados esperados na detecção das três variantes, conforme demonstrado na Figura 8.

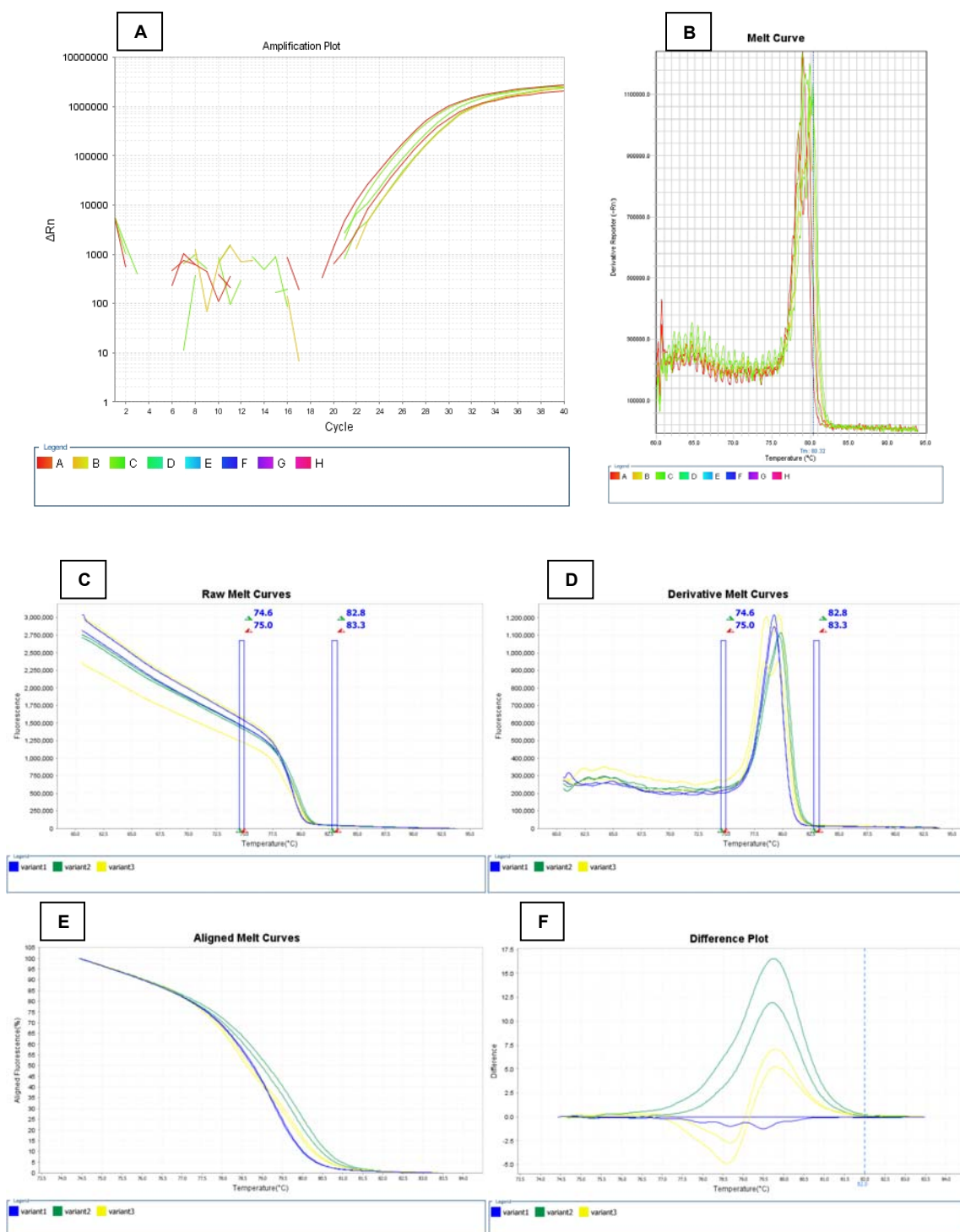


Figura 8 - Gráficos representativos das análises de HRM para o *MeltDoctor™ HRM Positive Control Kit* (Life Technologies, Estados Unidos). A: amplificação das amostras; B: curva de dissociação; C: dados brutos; D: derivados da curva de dissociação; E: alinhados da curva de dissociação; F: gráfico com a diferença relativa entre as amostras, mostrando a presença das três variantes esperadas.

Para todos os ensaios foi utilizado o master mix *MeltDoctorTM HRM Master Mix* (Life Technologies, Estados Unidos), que contém $MgCl_2$, *MeltDoctorTM HRM Dye* e a AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase. Todas as reações foram preparadas utilizando pipetador automático Qiagility (Qiagen, Alemanha).

Para as análises do gene *TP53* foram testadas três concentrações finais de iniciadores na reação: 0,1 μM , 0,2 μM e 0,3 μM , combinados um a um em uma matriz de diluição, totalizando 9 reações para cada ensaio (exon), realizados em duplicata. Os resultados revelaram que a concentração ótima para as reações foi a menor utilizada para todos os iniciadores, de 0,1 μM .

Em todas as reações foram utilizadas 40 ng de DNA, concentração ideal que foi encontrada nos testes de padronização. Todos os testes foram realizados em duplicatas, na mesma reação de amplificação e dissociação, incluindo-se o controle negativo na amplificação, que deve ser omitido na análise do HRM.

Para as corridas de quantificação absoluta para amplificar o DNA foram feitas reações em 20 μl , sendo: 10 μl de *MeltDoctorTM HRM Master Mix* (Life Technologies, Estados Unidos), 1 μl de cada iniciador (concentração final de 0,1 mM cada), 40 ng de DNA por reação e água para completar o volume final.

A reação foi realizada utilizando as seguintes condições: 10 minutos a 95°C para ativação enzimática; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para denaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão; e para a curva

de dissociação 10 segundos a 95°C para denaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento, 15 segundos a 95°C para o *high resolution melting* e 15 segundos finais para anelamento.

Características normais de amplificação são: níveis de fluorescência que ultrapassam o *threshold* (nível arbitrário de fluorescência estabelecido dentro da região de crescimento exponencial) entre os ciclos 8 e 35; aumento exponencial de fluorescência; e picos definidos na curva de dissociação.

As análises de HRM foram realizadas no *High Resolution Melt Software v3.0.1*. Nas curvas de *Derivative Melt* e *Raw Melt* são definidas as regiões de *pré-melt* (todos os amplicons estão em dupla-fitas), *active melt* (pico que indica a temperatura de anelamento onde metade dos amplicons está dissociada) e *pós-melt* (todos os amplicons estão em simples-fitas), regiões que são usadas para definir os dados nas curvas de *Aligned Melt* e *Difference Plot*, onde as variantes são mais facilmente identificáveis.

4.9 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES

Os resultados dos sequenciamentos foram analisados com o programa *CLC Main Workbench (CLCbio version 4.6)* e comparados com a sequência normal de *TP53* (NM_000546 para o cDNA e NC_000017 para gDNA) para detectar as mutações no gene. As sequências apresentadas na cor verde representam resultados do sequenciamento utilizando iniciadores

foward. As sequências apresentadas na cor vermelha representam resultados do sequenciamento utilizando iniciadores *reverse*.

Para as predições de ruptura ou nova formação dos sítios de *splicing*, foram utilizados os programas NNSPLICE 0,9 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) e HSF (*Human Splicing Finder - Version 2.4.1* - <http://www.umd.be/HSF/HSF.html> - DESMET et al. 2009). O programa NNSPLICE utiliza uma rede neural artificial para predizer os sítios de *splicing* através de curvas de funções parabólicas, sem prévio conhecimento das bases conservadas dos sítios doadores e aceptores de *splicing*. O programa HSF prediz o efeito das mutações comparando as sequências dos mutantes com as sequências normais, utilizando as sequências conservadas de reconhecimento da maquinaria de *splicing*.

Para as mutações do tipo *missense* foram utilizados algoritmos complementares para a predição da patogenicidade das alterações. Os algoritmos e os critérios utilizados estão descritos a seguir:

- Funcionalidade: predição sobre a funcionalidade da proteína mutante de acordo com sistemas de leveduras, segundo KATO et al. (2003), baseado na atividade transcricional de promotores específicos.
- AGVGD (<http://agvgd.iarc.fr>). O programa AGVGD combina as características biofísicas dos aminoácidos com os múltiplos alinhamentos das sequências proteicas para predizer se mutações *missense* são deletérias ou neutras, utilizando a matrix de Grantham de conservação dos aminoácidos: Grantham Variation (GV) e Grantham Deviation (GD). Os valores de $GV \leq 61,3$ foram

considerados como mutações deletérias e valores de $GV > 61,3$ ou $0 < GD \geq 61,3$ foram consideradas como mutações neutras.

- SIFT (<http://sift-dna.org>). O programa SIFT prediz se uma substituição afeta a função proteica baseado na homologia das sequências e das propriedades físicas dos aminoácidos. Os valores do SIFT são de 0 a 1, escores $\leq 0,05$ foram considerados como alterações que afetam a função proteica, enquanto escores $\geq 0,05$ foram considerados como “tolerantes”, seguindo as recomendações do programa.
- DNE: predição referente ao efeito dominante negativo da proteína mutante sobre a proteína p53 selvagem, segundo DEARTH et al. (2007). Mutantes foram considerados como “sim” se possuíam efeito dominante negativo tanto sob os promotores de *WAF1* e *RGC*; considerados como “moderado” se possuíam efeito dominante negativo sob um dos promotores; e considerados como “não”, se não possuíam efeito dominante negativo sob nenhum dos promotores estudados.
- Estrutura/Função: predições funcionais derivadas de modelos computacionais que levam em conta a estrutura 3D das proteínas mutantes e selvagens, baseados nos dados de domínio de transativação estudados por KATO et al. (2003). Prediz o impacto funcional das mutações sobre o domínio de ligação do DNA de p53. Mutações são classificadas como funcionais (mais de 40% de atividade quando comparado à proteína selvagem) ou não funcionais

(menos de 40% de atividade quando comparado à proteína selvagem).

Todas as mutações pontuais encontradas no presente estudo já foram descritas anteriormente e encontram-se publicadas no Banco de Dados do *International Agency for Research on Cancer* – (IARC <http://www-p53.iarc.fr/>). Além disso, algumas mutações já possuem diferentes estudos funcionais, sejam em leveduras, outros sistemas, ou mesmo previsões através de estudos de bioinformática que utilizam a sequência proteica para prever os efeitos das mutações sobre a estrutura e/ou função da proteína mutante.

A versão utilizada é a do Banco de Dados R15, publicada em novembro de 2010. O banco R15 contém 27.580 mutações somáticas, 597 mutações germinativas, dados funcionais de 2.314 proteínas mutantes e dados do gene *TP53* de 2.263 linhagens celulares (PETITJEAN et al. 2007).

Para a comparação e análise das frequências alélicas dos polimorfismos estudados foram utilizados os valores dos alelos de menor frequência (MAF - *minor allele frequency*) dos dados do *1000 Genome phase 1 genotype (Release: May 2011)*, que estudou 1094 indivíduos, população hoje considerada como a população padrão.

A nomenclatura utilizada para as mutações encontradas é baseada no trabalho proposto por DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2001).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações obtidas da revisão dos prontuários médicos e os resultados obtidos das análises de p53 foram registrados em planilha de dados Excel e a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). As associações entre a expressão, mutação, polimorfismo e as variáveis clínico-patológicas foram verificadas através do teste de frequências do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. As estimativas da probabilidade de sobrevida foram obtidas através do método de Kaplan-Meier. As curvas de probabilidade de sobrevida cumulativa foram comparadas pelo teste do log-rank. As estimativas dos fatores prognósticos independentes foram obtidas através do modelo de regressão de Cox na técnica *stepwise* (forward). O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO PROTEICA DE p53

O grupo de estudo foi composto por 52 (51,5%) amostras com ausência de expressão de p53, 36 (35,6%) amostras com expressão de p53 em mais de 70% das células tumorais e 13 (12,9%) amostras com expressão de p53 entre 20 e 70% das células tumorais. Os dois últimos subgrupos foram analisados conjuntamente, formando o grupo de amostras com expressão positiva para p53 (48,5%). A Figura 9 exemplifica as reações de IHC realizadas.

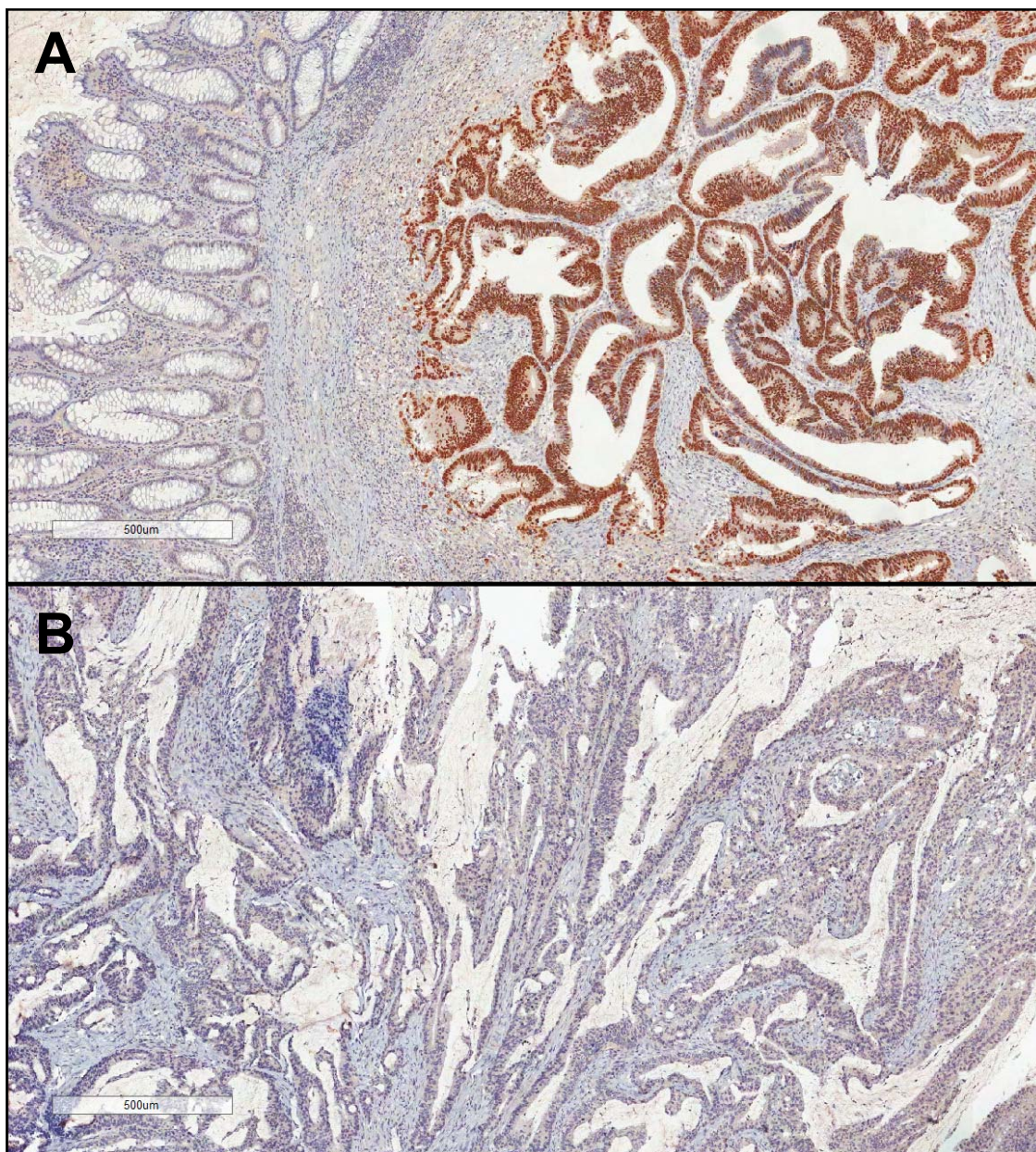


Figura 9 - Fotomicrografias de tecidos tumorais representando os perfis de coloração obtidos para p53 nas reações de IHC. A- representa um caso demonstrando expressão da proteína em todas as células neoplásicas; B- representa um caso demonstrando ausência de expressão da proteína.

Em relação à expressão proteica por IHC, das cinco (5%) amostras que não apresentam mudança na sequência codificante de *TP53*, quatro delas (80%) apresentaram ausência de expressão proteica de p53 e uma (20%) apresentou expressão positiva.

5.2 ANÁLISE MUTACIONAL DE *TP53* DO cDNA

O grupo de estudo do presente projeto constituiu-se de 101 amostras. A mutação no gene *TP53* foi um evento comum no presente estudo, sendo encontrados diferentes tipos de mutação entre os pacientes. A análise destas sequências mostrou 147 eventos de trocas nas 101 amostras, dos quais 58 são alterações pontuais encontradas em mais de uma amostra (*missense*, *nonsense*, sinônima e polimorfismos), quatro inserções e quatro deleções (indels). Cinco (5%) amostras não apresentaram alteração na sequência codificante de *TP53*, ou seja, nem mutações nem polimorfismos exônicos. A frequência de pacientes com alterações encontradas nos tumores colorretais foi de 54,5% (55), excluindo-se os polimorfismos.

Em relação aos 34 tipos diferentes de alterações pontuais detectadas, duas (5,9%) representam polimorfismos conhecidos (36Pro>Pro e 72Pro>Arg) três (8,8%) são mutações sinônimas (224Glu>Glu e 338Phe>Phe), duas (5,9%) são mutações *nonsense* (196Arg>Stop e 349Glu>Stop) e 28 (82,3%) são *missense*. A descrição dos achados será discutida em tópicos específicos.

Das 96 amostras com alteração no gene *TP53*, 82 (85,4%) delas contêm um polimorfismo conhecido nas populações humanas, a troca c.215C>G, que corresponde à mudança do aminoácido prolina (Pro72) para arginina (Arg72) na posição 72 da proteína, onde está o domínio PRR (*proline rich domain*). Destas, 41 (50%) das amostras possuem apenas este polimorfismo na região seqüenciada e as 41 (50%) restantes apresentam mais de uma troca além do polimorfismo. As outras 14 (14,6%) amostras apresentam outras mutações sem a presença do polimorfismo na posição 72 da proteína. Análises envolvendo o polimorfismo 72Pro>Arg foram detalhadas em artigo científico submetido (Anexo 9).

Conforme esperado, foram encontradas mais mutações no grupo de pacientes que apresentaram reação imunoistoquímica positiva (70,9%) do que no grupo dos negativos (21,7%; $p < 0,001$) (Tabela 1). Essa diferença também foi observada entre os tipos de alterações encontradas (*missense*, *nonsense*, silenciosas e indels) quando analisadas individualmente e também quando agrupadas, entre *missense*, outras alterações e sem alterações ($p < 0,001$) (Tabela 1). Da mesma maneira, essa diferença entre os grupos também foi significativa quando comparadas as alterações *missense versus* as demais alterações, desconsiderando os pacientes para os quais não foi observada nenhuma alteração ($p < 0,001$) (Tabela 1). Assim, 86,4% das alterações do tipo *missense* apresentam acumulação de expressão proteica, diferença que se manteve estatisticamente significativa em todas as análises.

Tabela 1 - Associação entre a frequência das alterações encontradas com a expressão por IHC.

Análise	Alteração	P53 negativo	P53 positivo	Total	P
Presença de alteração	Não	36 (78,3%)	10 (21,7%)	46	P < 0,001
	Sim	16 (29,1%)	39 (70,9%)	55	
Tipos de alterações	<i>Missense</i>	6 (13,6%)	38 (86,4%)	44	P < 0,001
	<i>Nonsense</i>	2 (100%)	0	2	
	Indels	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8	
	Sinônima	1 (50%)	1 (50%)	2	
	Sem alteração	36 (78,3%)	10 (21,7%)	46	
Tipos de alterações agrupadas	<i>Missense</i>	6 (13,6%)	38 (86,4%)	44	P < 0,001
	<i>Nonsense</i> +				
	Indels +	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12	
	Sinônimas				
Diferença entre alterações	Sem alteração	36 (78,3%)	10 (21,7%)	46	P < 0,001
	<i>Missense</i>	6 (13,6%)	38 (86,4%)	44	
	<i>Nonsense</i> +				
Diferença entre alterações	Indels +	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12	P < 0,001
	Sinônimas				
	Sinônimas				

5.2.1 Mutações sinônimas x *Splicing*

O rastreamento para a identificação de *splicing* aberrante utilizando a observação direta dos tamanhos dos produtos amplificados através de eletroforese em gel não forneceu resultados satisfatórios, de forma que nenhum produto amplificado possuía tamanho diferente evidente do tamanho esperado para aquele *amplicon*. Dessa maneira, todos os produtos gerados foram sequenciados, visando identificar todas as possíveis alterações presente na sequência de p53.

Foram encontradas três mutações sinônimas: 36Pro>Pro (CCG>CCA), 224Glu>Glu (GAG>GAA) e 338Phe>Phe (TTC>TTT).

Apenas uma (1%) amostra revelou evidência de mutação sinônima relacionada ao mecanismo de *splicing*, de acordo com o resultado do sequenciamento.

A amostra LC145T apresenta uma mutação sinônima relacionada ao mecanismo de *splicing*. Foi verificada a troca em heterozigose do último nucleotídeo do exon 6 (c.672G>A; 224Glu>Glu; GAG>GAA), levando a maquinaria de *splicing* a reconhecer um novo sitio de *splicing* no intron 6, o que resultou na retenção de 5 bases do intron 6 na sequência do transcrito (c.672_673insGTCTG), alterando o código de leitura (Figura 10). Assim, um códon de parada prematuro foi gerado entre os códons originais 246 e 247 (TGA) do exon 7. A amostra apresentou acúmulo proteico de p53 em 20% das células tumorais. Como a inserção não havia sido descrita anteriormente nos banco de dados disponíveis, foi feito um depósito da sequência no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), número de acesso *GenBank* JQ026209.

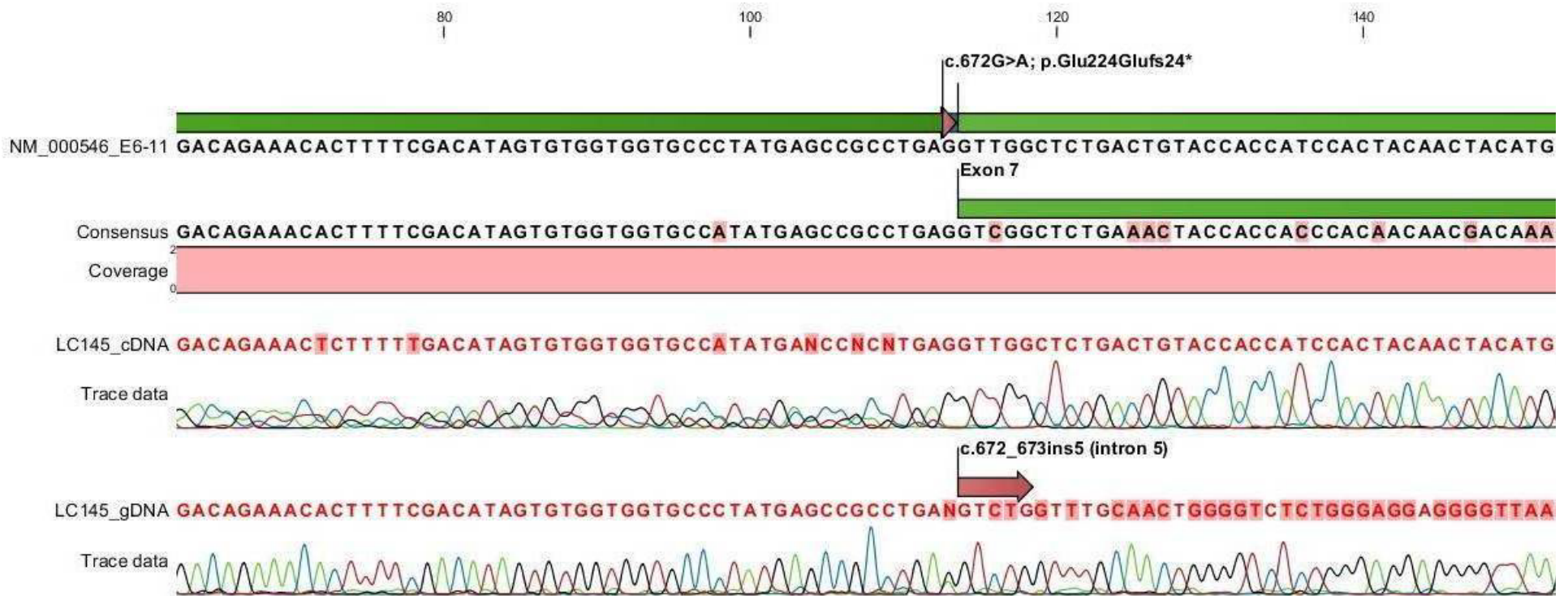


Figura 10 - Mutação sinônima c.672G>A (p.E224E) que causou a ruptura do sítio de *splicing*, levando a retenção de cinco bases do intron em heterozigose.

Outra amostra apresenta a mutação sinônima 338Phe>Phe (TTC/TTT) juntamente com o polimorfismo 72Pro>Arg, e ausência de expressão proteica. Não existem estudos sobre esta alteração encontrada. Por fim, a terceira mutação sinônima identificada (36Pro>Pro) representa um polimorfismo de baixa frequência na população que será discutido em tópico específico.

5.2.2 Mutações *Nonsense* e *Missense*

As duas amostras que apresentam mutação *nonsense*, que resultam na formação de uma proteína com códon de parada prematuro, demonstram ausência de expressão proteica. Uma delas apresenta o polimorfismo 72Pro>Arg conjuntamente com a mutação. As duas mutações *nonsense* encontradas apresentavam-se em heterozigose.

Todos os 28 tipos de mutações *missense* resultam em proteínas preditas como deletérias e não funcionais. Em relação à expressão proteica, dos 28 tipos de mutação observadas, apenas cinco (17,9%) apresentaram ausência de expressão proteica e todas elas apresentam mutações acompanhadas do polimorfismo 72Pro>Arg. Apesar de não alterar a meia-vida da proteína, de forma a não apresentar detecção da proteína por imunistoquímica, estas cinco mutações também são preditas como deletérias e não funcionais; são elas: 175Arg>Cys (CGC>TGC), 244Gly>Asp (GGC>GAC), 232Ile>Thr (ATC>ACC), 248Arg>Gln (CGG>CAG) e 220Tyr>Cys (TAT>TGT).

Dentre as 28 mutações *missense*, oito (28,6%) delas foram encontradas em mais de uma amostra, assim distribuídas: 175Arg>Cys em duas amostras, 175Arg>His em quatro amostras, 248Arg>Gln em três amostras, 248Arg>Trp em quatro amostras, 273Arg>Cys em três amostras, 273Arg>His em duas amostras, 278Pro>Leu em três amostras e 282Arg>Trp em quatro amostras.

Os tipos de mutações *missense* encontradas estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Tipos de mutação *missense* e *nonsense* encontradas

Mutação	Troca
c.328C>T	110Arg>Cys
c.329G>T	110Arg>Leu
c.455C>T	152Pro>Leu
c.473G>A	158Arg>His
c.476C>A	159Ala>Asp
c.476C>T	159Ala>Val
c.488A>G	163Tyr>Cys
c.523C>T	175Arg>Cys
c.524G>A	175Arg>His
c.580C>T	194Leu>Phe
c.583A>T	195Ile>Phe
c.587G>T	196Arg>Leu
c.586C>T	196Arg>Stop
c.632C>T	211Thr>Ile
c.659A>G	220Tyr>Cys
c.659A>C	220Tyr>Ser
c.695T>C	232Ile>Thr
c.722C>G	241Ser>Cys
c.725G>A	242Cys>Tyr
c.731G>A	244Gly>Asp
c.734G>C	245Gly>Ala
c.733G>A	245Gly>Ser
c.743G>A	248Arg>Gln
c.742C>T	248Arg>Trp
c.815T>C	272Val>Ala
c.817C>T	273Arg>Cys
c.818G>A	273Arg>His
c.833C>T	278Pro>Leu
c.844C>T	282Arg>Trp
c.1045G>T	349Glu>Stop

5.2.3 Inserções, Deleções e *Splicing*

O presente estudo encontrou quatro deleções e quatro inserções (c.159delG, c.514_559del46, c.376_396del21, c.792_796del5, e c.398_399ins4, c.217insC, c.672_673ins5 e c.455insC). A deleção c.159delG está representada na Figura 11. A deleção c.792_796del5 está representada na Figura 12. A inserção c.398_399ins4 está representada na Figura 13. A inserção c.217insC está representada na Figura 14. A inserção c.455insC está representada na Figura 15. A inserção c.672_673ins5 foi representada anteriormente na Figura 10. A deleção c.514_559del46 está representada na Figura 17. A deleção c.376_396del21 está representada na Figura 18.

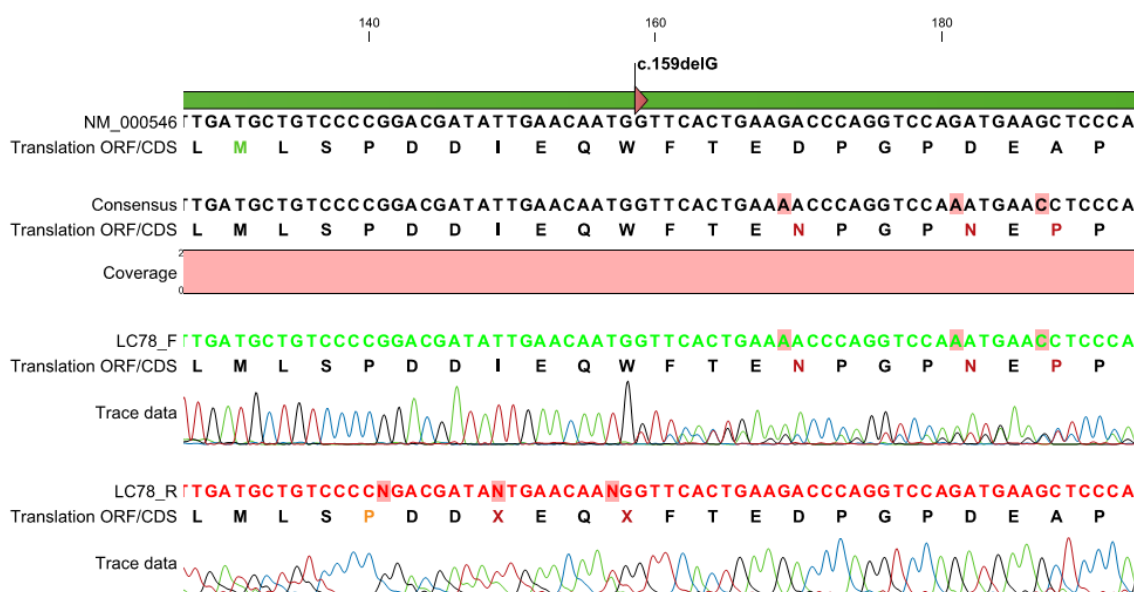


Figura 11 - Deleção c.159delG presente na amostra LC78T.

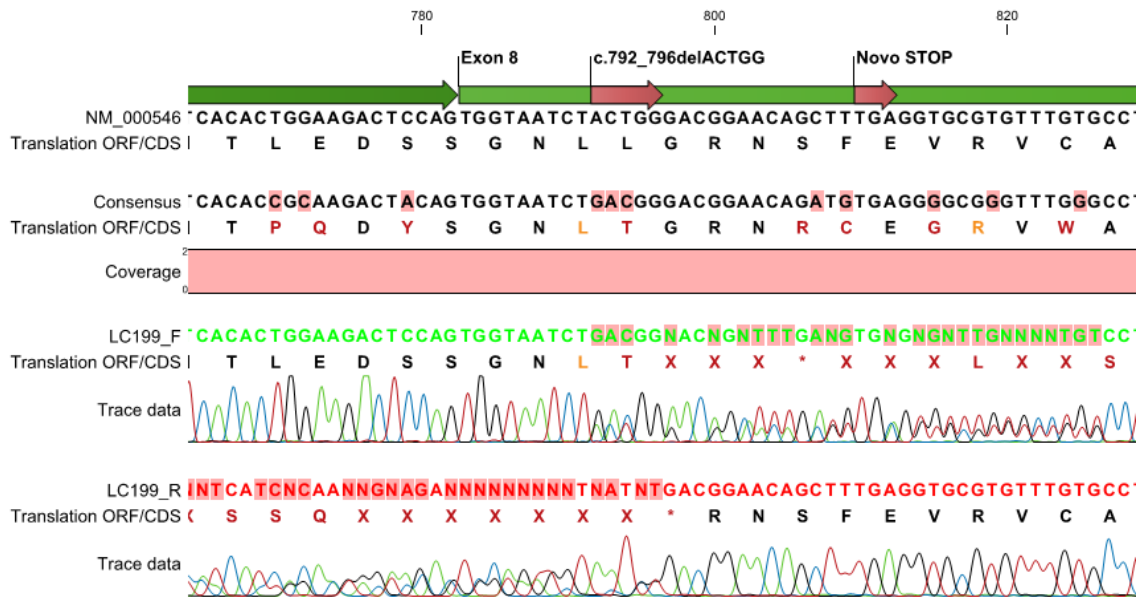


Figura 12 - Deleção c.792_796del5 presente na amostra LC199T.

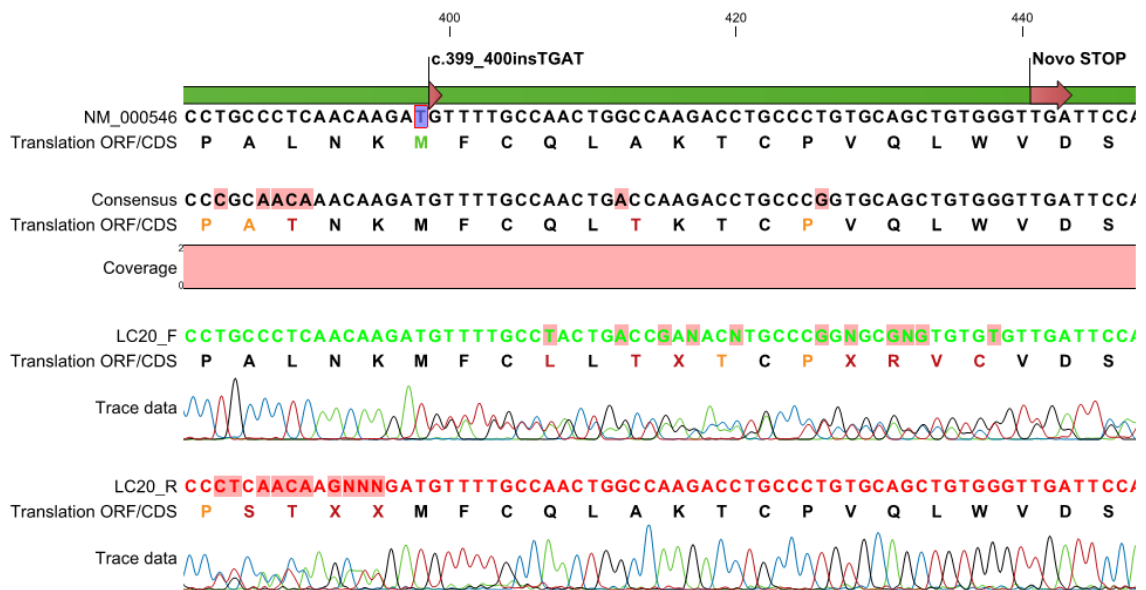


Figura 13 - Inserção c.398_399ins4 presente na amostra LC20T.

Como as alterações c.159del1, c.398_399ins4, c.672_673ins5 e c.792_796del5 nunca haviam sido descritas nos bancos de dados disponíveis, as sequências destas variantes foram depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Depósitos das indels identificadas

Descrição	Efeito	Bases envolvidas	Número acesso <i>GenBank</i>
c.159del1	Deleção <i>frameshift</i>	G	JQ026207
c.398-399ins4	Inserção <i>frameshift</i>	TGAT	JQ026208
c.672_673ins5	Inserção <i>frameshift</i>	GTCTG	JQ026209
c.792_796del5	Deleção <i>frameshift</i>	ACTGG	JQ026210

Levando-se em conta o número de alterações encontradas neste estudo, dos 42 tipos de alterações encontrados, três (7,1%) delas afetam o mecanismo de *splicing*, por alterarem os sítios doadores ou aceptores. Em relação à frequência do achado no grupo amostral, das 101 amostras, três (3%) apresentaram este tipo de alteração.

Dentre as mutações encontradas na região codificante de *TP53*, apenas uma mutação sinônima foi responsável por alterar o sítio de reconhecimento da maquinaria de *splicing* (c.672G>A; c.672_673ins5), conforme descrito anteriormente. Entretanto, duas das quatro deleções detectadas neste estudo também apresentaram relação com o mecanismo de *splicing*, já estas por alterações nas regiões intrônicas, gerando a quebra dos sítios de *splicing*. Assim, do total de oito eventos encontrados, duas

deleções e uma inserção (37,5%) possuem envolvimento com o mecanismo de *splicing*, descritos a seguir e ilustrados nas Figuras 10, 16, 17 e 18.

A deleção c.514_559del46 elimina do RNA mensageiro de p53 a porção final 3' do exon 5, eliminando 46 nucleotídeos e, assim, suprimindo da proteína 15 aminoácidos mais uma base, alterando, dessa maneira, o código de leitura restante, de forma a gerar um códon de parada prematuro entre os códons originais 246 e 247 (TGA) do exon 7. O sequenciamento do gDNA tumoral revelou que essa deleção foi decorrente de uma mutação em heterozigose do primeiro nucleotídeo do intron 5 (c.559+1G>A), eliminando o sitio de reconhecimento para *splicing*. Assim, a porção 5' da região deletada possui as mesmas bases que seriam reconhecidas da porção 5' do intron 5, que sofreu mutação.

Da mesma maneira, no caso da deleção em homozigose c.376_396del21 (ou expressão de apenas um alelo), no sequenciamento do gDNA foi encontrada uma mutação no penúltimo nucleotídeo do intron 4 (c.376-2A>G), eliminando o sitio de *splicing* e sete aminoácidos do início do exon 5, de forma que as bases da porção 3' da porção deletada são as mesmas bases que seriam reconhecidas na porção 3' do intron 4.

E por fim, a inserção c.672_673ins5 foi causada pela mutação sinônima do último nucleotídeo do exon 6 (c.672G>A), conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras que apresentaram deleções foram negativas para p53 nas reações de IHC. Das amostras que apresentam inserções, apenas aquela com a inserção c.672_673ins5 mostrou expressão proteica

detectável, em 20% das células tumorais. Apenas a deleção c.376_396del21 se apresenta em homozigose; as demais deleções e inserções apresentam-se em heterozigose nas amostras estudadas.

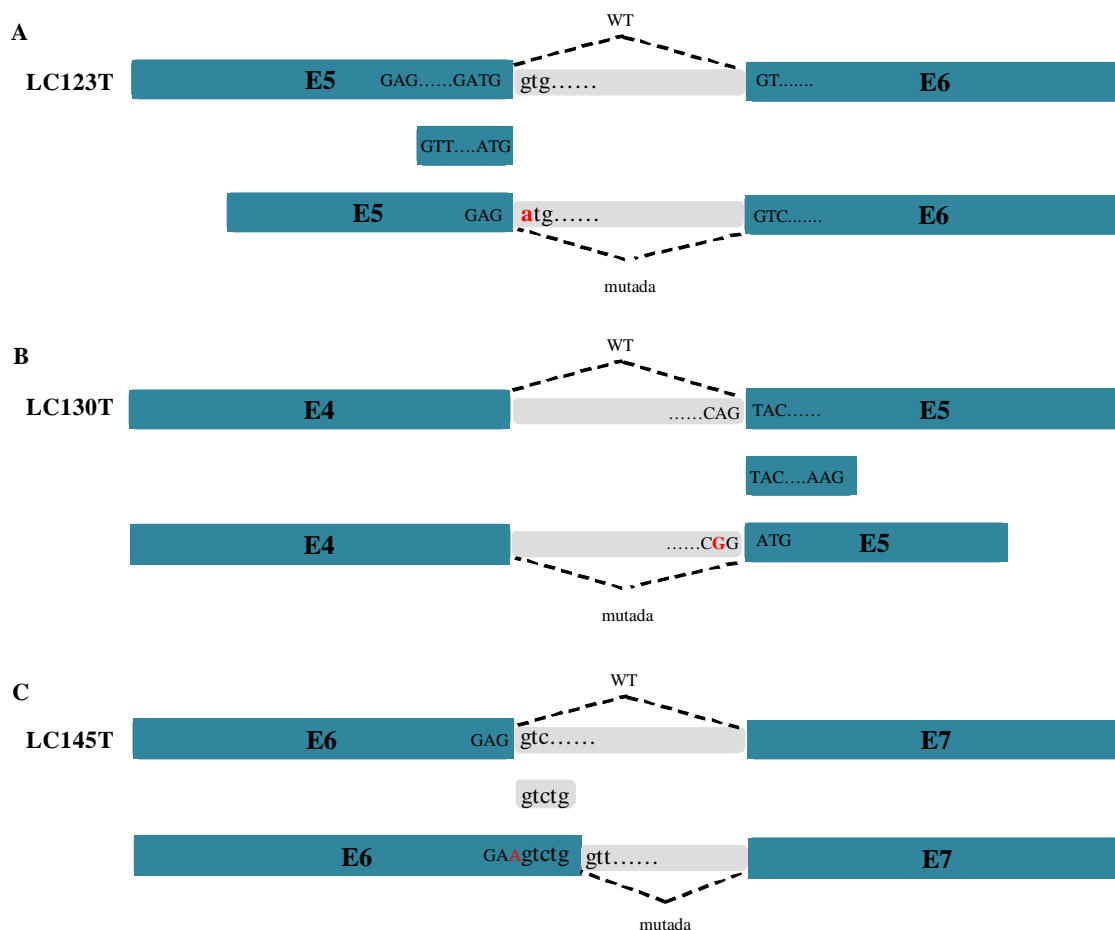


Figura 16 - Variantes de *splicing*. A figura apresenta as regiões dos padrões atípicos de *splicing* encontrados. As linhas tracejadas representam o local de união dos exons para cada caso de *splicing*. A: LC123T; B: LC130T; C: LC145T. WT = *splicing* normal.

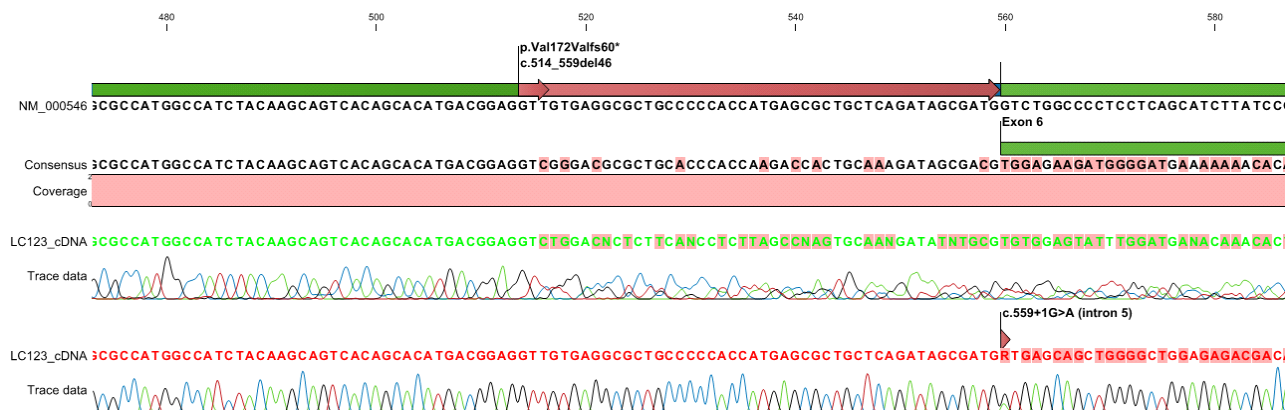


Figura 17 - Mutação no intron 5 c.559+1G>A que causou a ruptura do sitio de *splicing*, levando a deleção de 46 bases do exon 5 (c.514_559del46).

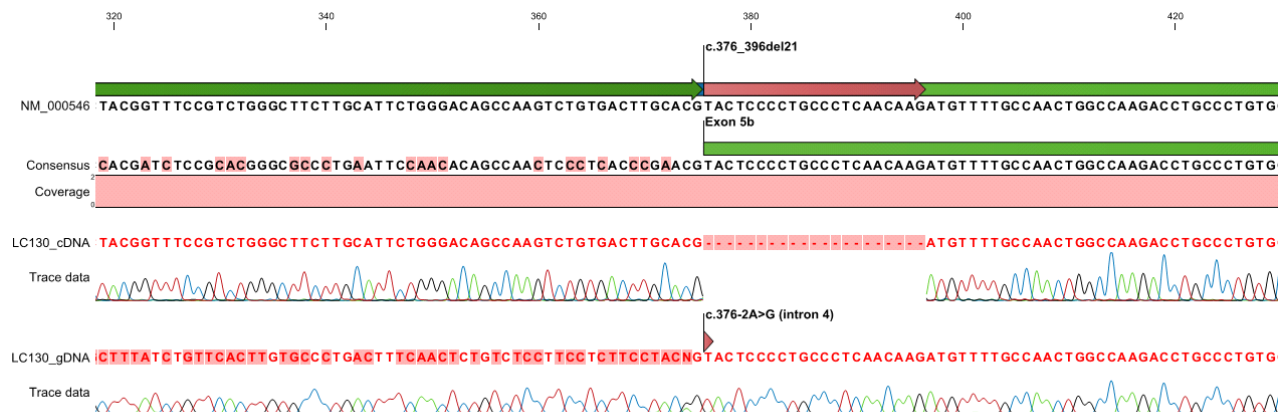


Figura 18 - Mutação no intron 4 c.376-2A>G que causou a ruptura do sitio de *splicing*, levando a deleção de 21 bases do exon 5 (c.376_396del21).

5.2.4 Localização das alterações

Em relação à distribuição das alterações nos códons, verifica-se a ocorrência predominantemente em alguns deles, de forma que dez códons foram encontrados alterados mais de uma vez, assim distribuídos: códon 110 por duas vezes, códon 159 por duas vezes, códon 175 por cinco vezes, códon 196 por duas vezes, códon 220 por duas vezes, códon 245 por duas vezes, códon 248 por seis vezes, códon 273 por cinco vezes, códon 278 por

três vezes e códon 282 por quatro vezes. A Figura 19 mostra uma representação da frequência de alterações distribuídas ao longo dos domínios de *TP53*.

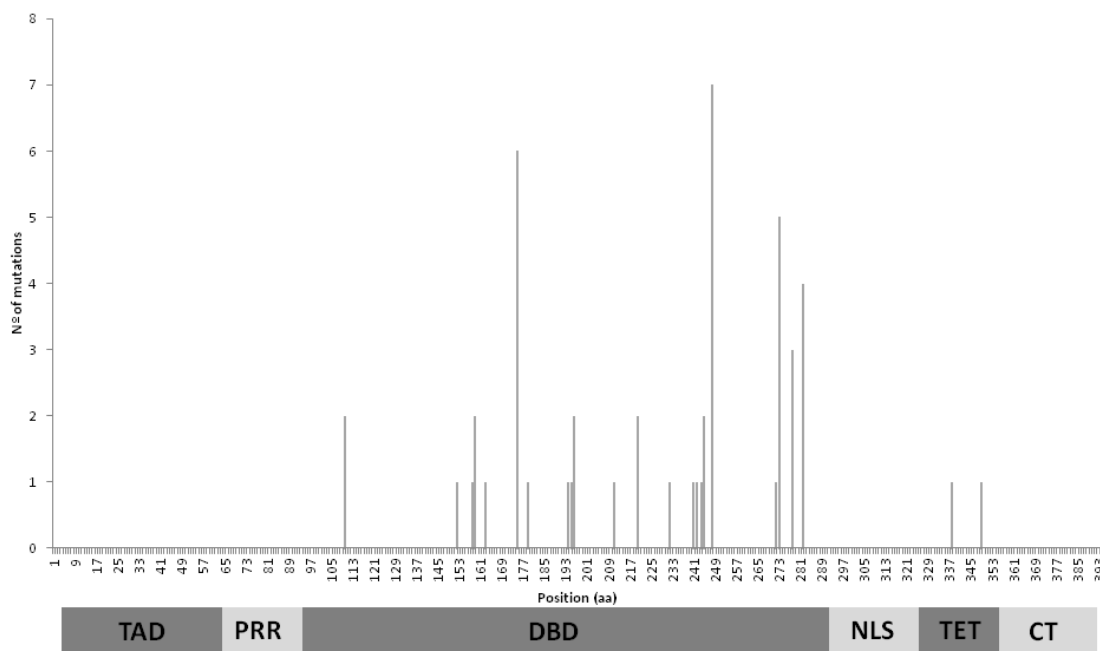


Figura 19 - Distribuição das alterações ao longo dos domínios de *TP53*.

5.2.5 Polimorfismos

Apenas uma amostra apresenta o polimorfismo 36Pro>Pro (rs1800370; CCG/CCA) juntamente com a mutação 248Arg>Trp, que foi predita como deletéria e não funcional. As predições vão de acordo com os achados imunistoquímicos, já que esta amostra apresenta expressão proteica de p53 nas células tumorais. A troca 36Pro>Pro representa um polimorfismo de baixa frequência (MAF=0,0127), de acordo com os dados do *1000Genome phase 1*.

A alelo menos frequente do polimorfismo 72Pro>Arg (rs1042522) se apresenta com 39% na população global (MAF=0,398) segundo dados do *1000Genome phase1*. No presente estudo foram encontrados 67 (66,4%) indivíduos Arg/Arg, 16 (15,8%) indivíduos Pro/Arg e 18 (17,8%) indivíduos Pro/Pro. Em relação à frequência alélica, 83 (82,2%) expressavam o alelo Arg72 e 18 (17,8%) não expressavam. Assim, a frequência do alelo Pro72 foi de 0,26. O detalhamento dos achados referente à expressão dos alelos e as análises clinicopatológicas encontra-se no artigo submetido no Anexo 9.

5.2.6 Mutações e Polimorfismos – gDNA

Foram encontradas duas mutações intrônicas nos sítios de *splicing* conforme descrito anteriormente, a c.559+1G>A no intron 4 e a c.376-2A>G no intron 5.

Além disso, o polimorfismo PIN2 (c.74+38C>G) do intron 2 e o de duplicação de 16 pb PIN3 (c.96+41_96+56del16) do intron 3 foram estudados, bem como o polimorfismo do exon 4 (72Pro>Arg) no DNA genômico tumoral.

Em relação ao PIN2, foram encontrados 11 (10,9%) indivíduos CC, 35 (34,7%) indivíduos CG e 55 (54,4%) indivíduos GG. A sequência referência para *TP53* (NC_000017) apresenta o alelo C como o alelo normal. Assim, a frequência alélica para o alelo G foi de 0,72. Dentre as amostras que apresentaram este polimorfismo, duas delas estavam entre as cinco amostras que não apresentaram nenhuma alteração na sequência codificante ao sequenciamento do cDNA.

Em relação ao PIN3, foram encontrados 79 (78,2%) indivíduos A1/A1, 19 (18,8%) indivíduos A1/A2 e 3 (3%) indivíduos A2/A2. Em relação à frequência alélica, 98 (97%) apresentavam o alelo A1 e 3 (3%) não apresentavam. Assim, a frequência do alelo A2 foi de 0,12.

Foram encontradas três amostras homocigotas para o alelo A2, as amostras LC34T, LC83T e LC187T (Figura 20).

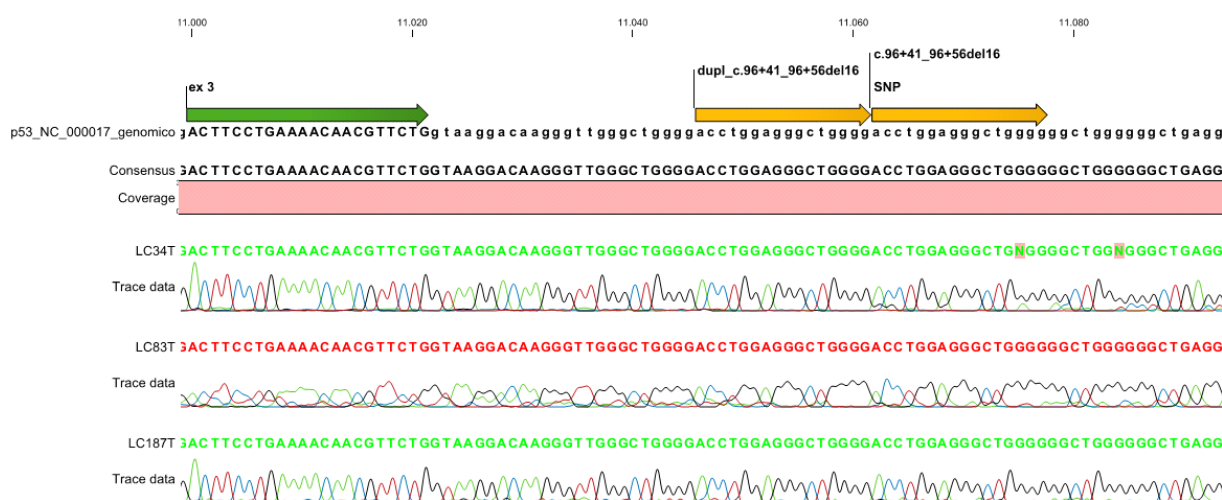


Figura 20 - Representação gráfica da presença da duplicação de 16 pb no intron 3 (alelo A2).

A descrição das frequências dos polimorfismos 72Pro>Arg e PIN3 encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação entre 72Pro>Arg e PIN3.

Polimorfismo gDNA	Genótipo	Número/Total (%)		
		Pacientes	Frequência Genotípica	Frequência Alélica
72Pro>Arg	Pro/Pro	10/101	0,099	0,23
	Pro/Arg	27/101	0,267	-
	Arg/Arg	64/101	0,634	0,77
PIN3	A1/A1	79/101	0,782	0,88
	A1/A2	19/101	0,188	-
	A2/A2	3/101	0,03	0,12

Para verificar se a frequência alélica encontrada para os polimorfismos do exon 4 e do intron 3 possuíam alguma relação com o processo tumoral, 97 amostras de sangue de pacientes controles foram genotipados.

Os valores para o alelo de menor frequência Pro72 foram 0,23 para os pacientes e 0,27 para os controles, sem diferenças estatisticamente significativas. Os valores para o alelo de menor frequência A2 foram 0,12 para os pacientes e 0,13 para os controles, sem diferenças estatisticamente significativas. Três (3%) pacientes, em contraste com nenhum controle, revelaram o genótipo A2/A2 (ambos os alelos com a duplicação de 16 pb), conforme representado na Figura 20. As características específicas destes pacientes/tumores encontram-se no Quadro 3.

Quadro 3 - Características das amostras com genótipo A2/A2.

	LC34T	LC83T	LC187T
Gênero	Feminino	Masculino	Masculino
Idade ao diagnóstico	37 anos	62 anos	73 anos
Localização tumor	Reto	colon proximal	Reto
Estadiamento T	II	II	IV
Estadiamento N	N0	N0	N+
Estadiamento M	M0	M0	M+
Diferenciação	Pouco	moderadamente	Pouco
Borda do tumor	Infiltrativa	infiltrativa	Infiltrativa
Adjuvância (pós)	não fez	quimioterapia	Quimioterapia
Desmoplasia	Presente	presente	Presente
Infiltrado linfocitário	Presente	presente	Presente
Genótipo códon 72	Pro/Arg	Pro/Pro	Arg/Arg
Mutação TP53	indel: c.217insC	missense: c.817C>T	missense: c.488A>G
Expressão p53	Negativa	positiva	Positiva

Análises das amostras tumorais revelaram que 77,2% dos tumores Arg/Arg são A1/A1; 78,9% dos A1/A2 são Pro/Arg e 86,4% dos que possuem o alelo A2 também expressam o alelo Pro72 ($P < 0.001$ – Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Associação entre os polimorfismos 72Pro>Arg e PIN3

	72Pro>Arg			Total	P
	Pro/Pro	Pro/Arg	Arg/Arg		
A1/A1	7 (8,9%)	11 (13,9%)	61 (77,2%)	79 (78,2%)	
PIN3 A1/A2	2 (10,5%)	15 (78,9%)	2 (10,5%)	19 (18,8%)	<0,001
A2/A2	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	3 (3%)	
Total	10 (9,9%)	27 (26,7%)	62 (63,4%)	101	

Tabela 4 - Associação entre a presença do alelo A2 e o alelo Pro72

		72Pro>Arg		Total	P
		Pro72 ausente	Pro72 presente		
PIN3	A2 ausente	61 (77,2%)	18 (22,8%)	79 (78,2%)	<0,001
	A2 presente	3 (13,6%)	19 (86,4%)	22 (21,8%)	
Total		64 (63,4%)	37 (36,6%)	101	

Em relação ao SNP 72Pro>Arg, no sequenciamento do gDNA a frequência de achados foi ligeiramente diferente do que o encontrado no sequenciamento do cDNA. No sequenciamento do gDNA foram encontrados 64 (63,4%) indivíduos Arg/Arg, 27 (26,7%) indivíduos Pro/Arg e 10 (9,9%) indivíduos Pro/Pro. Em relação à frequência alélica, 91 (90,1%) apresentavam o alelo Arg72 e 10 (9,9%) não apresentavam. Assim, a frequência alélica do alelo Pro72 mudou de 0,26 do cDNA para 0,23 para o gDNA.

5.2.7 Expressão diferencial

O polimorfismo 72Pro>Arg foi avaliado tanto a partir das sequências de cDNA quanto de gDNA. Nos heterozigotos foi observada uma diferença de expressão dos alelos.

O sequenciamento do cDNA revelou 16 heterozigotos enquanto que o sequenciamento do gDNA revelou 27 heterozigotos, ou seja, 11 (40,7%) casos apresentou expressão de apenas um dos alelos no transcrito, sendo que dos 11 casos, 8 (72,2%) apresentaram desbalanço de expressão em

favor do alelo com Pro72. Casos representativos dessa diferença encontrada podem ser observados na Figura 21.

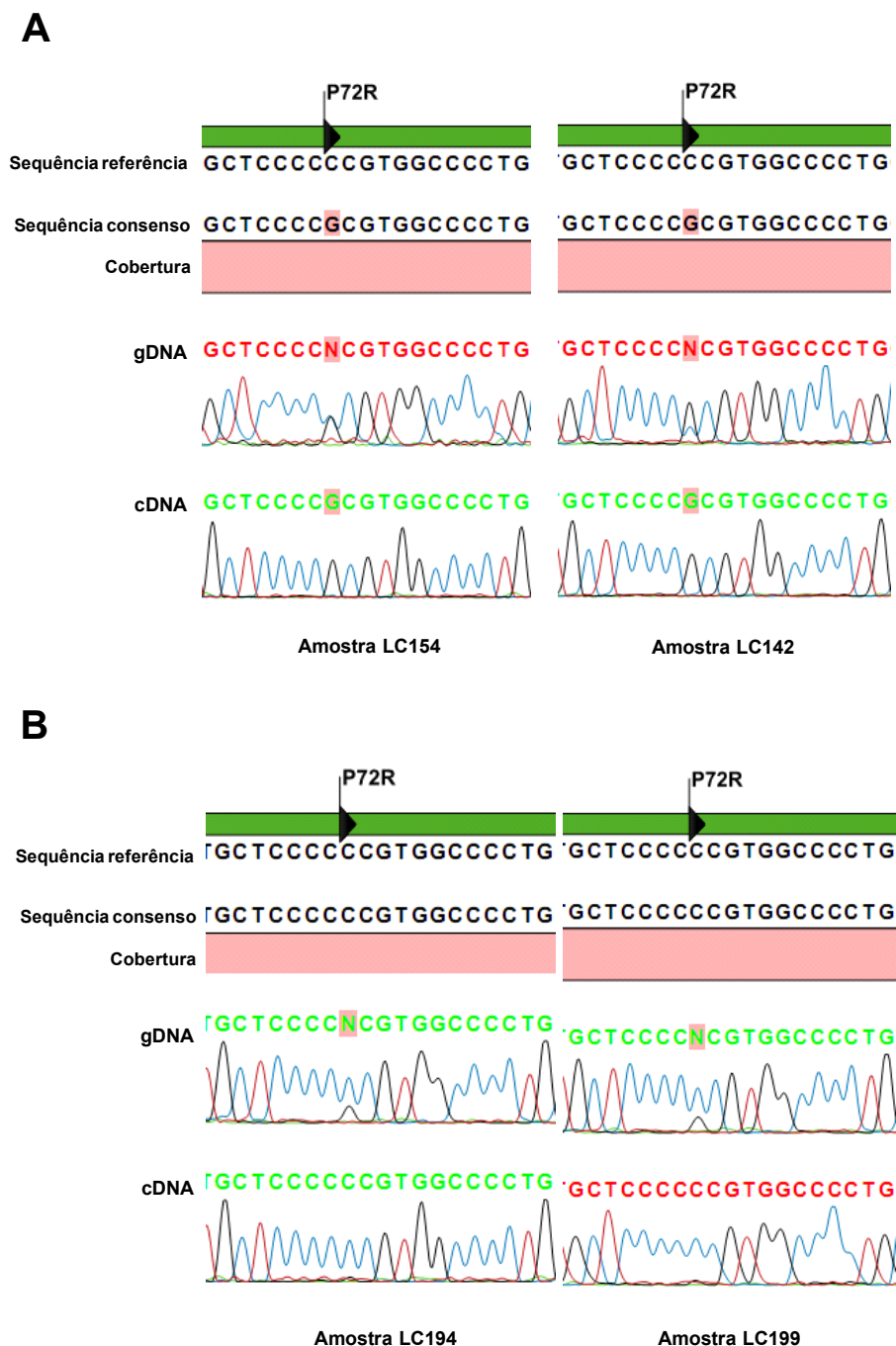


Figura 21 - Padrão de expressão do polimorfismo 72Pro>Arg. A figura mostra eletroferogramas obtidos de sequenciamento do gDNA e do cDNA das amostras tumorais. A- Amostras representativas demonstrando expressão monoalélica do alelo G (Arg72); B- Amostras representativas demonstrando expressão monoalélica do alelo C (Pro72).

5.3 CORRELAÇÕES CLÍNICOPATOLÓGICAS

As associações clinicopatológicas foram feitas utilizando os dados obtidos através do sequenciamento do cDNA, ou seja, representa as possíveis associações entre o que é expresso no tumor e as suas características clinicopatológicas. Apenas as associações envolvendo o polimorfismo PIN3 foram realizadas utilizando os dados do sequenciamento de gDNA.

5.3.1 Expressão de p53

A expressão de p53 visualizada através das reações de IHC foi associada significativamente às seguintes características: em 78,8% das amostras sem expressão proteica também não foi observada a presença de *budding* (grupos de até 5 células tumorais destacadas das glândulas neoplásicas) (Tabela 5); 88,6% dos tumores que apresentaram forte expressão de p53 eram do tipo histológico tubular (Tabela 6), diferença que se manteve estatisticamente significativa após a divisão dos tumores em expressão positiva e negativa (Tabela 7); e 69,4% dos tumores com forte expressão de p53 apresentaram a presença de necrose tumoral (Tabela 8), diferença que se manteve estatisticamente significativa após a divisão dos tumores em expressão positiva e negativa (Tabela 9).

Tabela 5 - Associação entre a expressão de p53 e *budding*.

		<i>Budding</i>		Total	P
		Não observado	Observado		
Expressão p53	Ausente	41 (78,8%)	11 (21,2%)	52 (51,5%)	0,032
	Presente	29 (59,2%)	20 (40,8%)	49 (48,5%)	
Total		70 (69,3%)	31 (30,7%)	101	

Tabela 6 - Associação entre a expressão de p53 (graduada) e o tipo histológico.

		Tipo Histológico				Total	P
		Tubular	Diferenciação mucinosa	Mucinoso	Neuroendócrino		
Expressão p53	Ausente	28 (53,8%)	11 (21,2%)	3 (5,8%)	10 (19,2%)	52 (52%)	0,005
	Média	7 (53,8%)	4 (30,8%)	0	2 (15,4%)	13 (13%)	
	Forte	31 (88,6%)	1 (2,9%)	3 (8,6%)	0	35 (35%)	
Total		66 (66%)	16 (16%)	6 (6%)	12 (12%)	100	

Legenda: Média expressão = expressão em 20 a 60% das células neoplásicas. Forte expressão = expressão em 60 a 100% das células neoplásicas. Os tipos histológicos são: adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma com diferenciação mucinosa, adenocarcinoma mucinoso e adenocarcinoma com diferenciação neuroendócrina.

Tabela 7 - Associação entre a expressão de p53 e o tipo histológico.

		Tipo Histológico				Total	P
		Tubular	Diferenciação mucinosa	Mucinoso	Neuroendócrino		
Expressão p53	Ausente	28 (53,8%)	11 (21,2%)	3 (5,8%)	10 (19,2%)	52 (52%)	0,030
	Presente	38 (79,2%)	5 (10,4%)	3 (6,3%)	2 (4,2%)	48 (48%)	
Total		66 (66%)	16 (16%)	6 (6%)	12 (12%)	100	

Legenda: Os tipos histológicos são: adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma com diferenciação mucinosa, adenocarcinoma mucinoso e adenocarcinoma com diferenciação neuroendócrina.

Tabela 8 - Associação entre a expressão de p53 e necrose.

		Necrose		Total	P
		Não observada	Observada		
Expressão p53	Ausente	31 (60,8%)	20 (39,2%)	51 (51%)	0,008
	Média	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (13%)	
	Forte	11 (30,6%)	25 (69,4%)	36 (36%)	
Total		51 (51%)	49 (49%)	100	

Legenda: Média expressão = expressão em 20 a 60% das células neoplásicas. Forte expressão = expressão em 60 a 100% das células neoplásicas.

Tabela 9 - Associação entre a expressão de p53 (graduada) e necrose.

		Necrose		Total	P
		Não observado	Observado		
Expressão p53	Ausente	31 (60,8%)	20 (39,2%)	52 (51%)	0,046
	Presente	20 (40,8%)	29 (59,2%)	49 (49%)	
Total		51 (51%)	49 (49%)	100	

5.3.2 Mutação de *TP53*

A mutação de *TP53* foi associada significativamente às seguintes características: 89,1% dos pacientes com mutação identificada tinham mais de 50 anos ao diagnóstico (Tabela 10); 80% dos tumores com mutação identificada apresentaram desmoplasia (Tabela 11); 79,6% dos tumores com mutação identificada eram do tipo histológico tubular (Tabela 12) e 78,2% dos tumores com mutação identificada apresentavam padrão de crescimento tumoral do tipo infiltrativo (Tabela 13).

Tabela 10 - Associação entre a mutação de *TP53* e a idade ao diagnóstico do paciente

		Idade		Total	P
		≤ 50 anos	> 50 anos		
Mutação <i>TP53</i>	Ausente	13 (28,3%)	33 (71,7%)	46 (45,5%)	0,026
	Presente	6 (10,9%)	49 (89,1%)	55 (54,5%)	
Total		19 (18,8%)	82 (81,2%)	101	

Tabela 11 - Associação entre a mutação de *TP53* e desmoplasia

		Desmoplasia		Total	P
		Não observado	Observado		
Mutação <i>TP53</i>	Ausente	18 (39,1%)	28 (60,9%)	46 (45,5%)	0,034
	Presente	11 (20%)	44 (80%)	55 (54,5%)	
Total		29 (28,7%)	72 (71,3%)	101	

Tabela 12 - Associação entre a mutação de *TP53* e tipo histológico

		Tipo Histológico				Total	P
		Tubular	Diferenciação mucinosa	Mucinoso	Neuroendócrino		
Mutação <i>TP53</i>	Ausente	23 (50%)	12 (26,1%)	2 (4,3%)	9 (19,6%)	46 (46%)	0,004
	Presente	43 (79,6%)	4 (7,4%)	4 (7,4%)	3 (5,6%)	54 (54%)	
Total		66 (66%)	16 (16%)	6 (6%)	12 (12%)	100	

Legenda: Os tipos histológicos são: adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma com diferenciação mucinosa, adenocarcinoma mucinoso e adenocarcinoma com diferenciação neuroendócrina.

Tabela 13 - Associação entre a mutação de *TP53* e padrão de crescimento do tumor (borda)

		Borda do Tumor		Total	P
		Infiltrativa	Expansiva		
Mutação <i>TP53</i>	Ausente	26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (45,5%)	0,020
	Presente	43 (78,2%)	12 (21,8%)	55 (54,5%)	
Total		69 (68,3%)	32 (31,7%)	101	

5.3.3 Polimorfismo 72Pro>Arg

A análise deste SNP apresentou resultados significativamente associados ao sexo ($p = 0,037$), recorrência ($p = 0,008$), padrão de crescimento do tumor ($p = 0,05$), uso de quimiorradioterapia pós-adiuvante ($p = 0,002$), expressão imunoistoquímica de p53 ($p = 0,034$) e mutação no gene *TP53* ($p = 0,004$), características de pior comportamento tumoral (Figura 22; Tabela 14). O detalhamento dos resultados referente ao polimorfismo 72Pro>Arg encontra-se descrito no artigo submetido (Anexo 9).

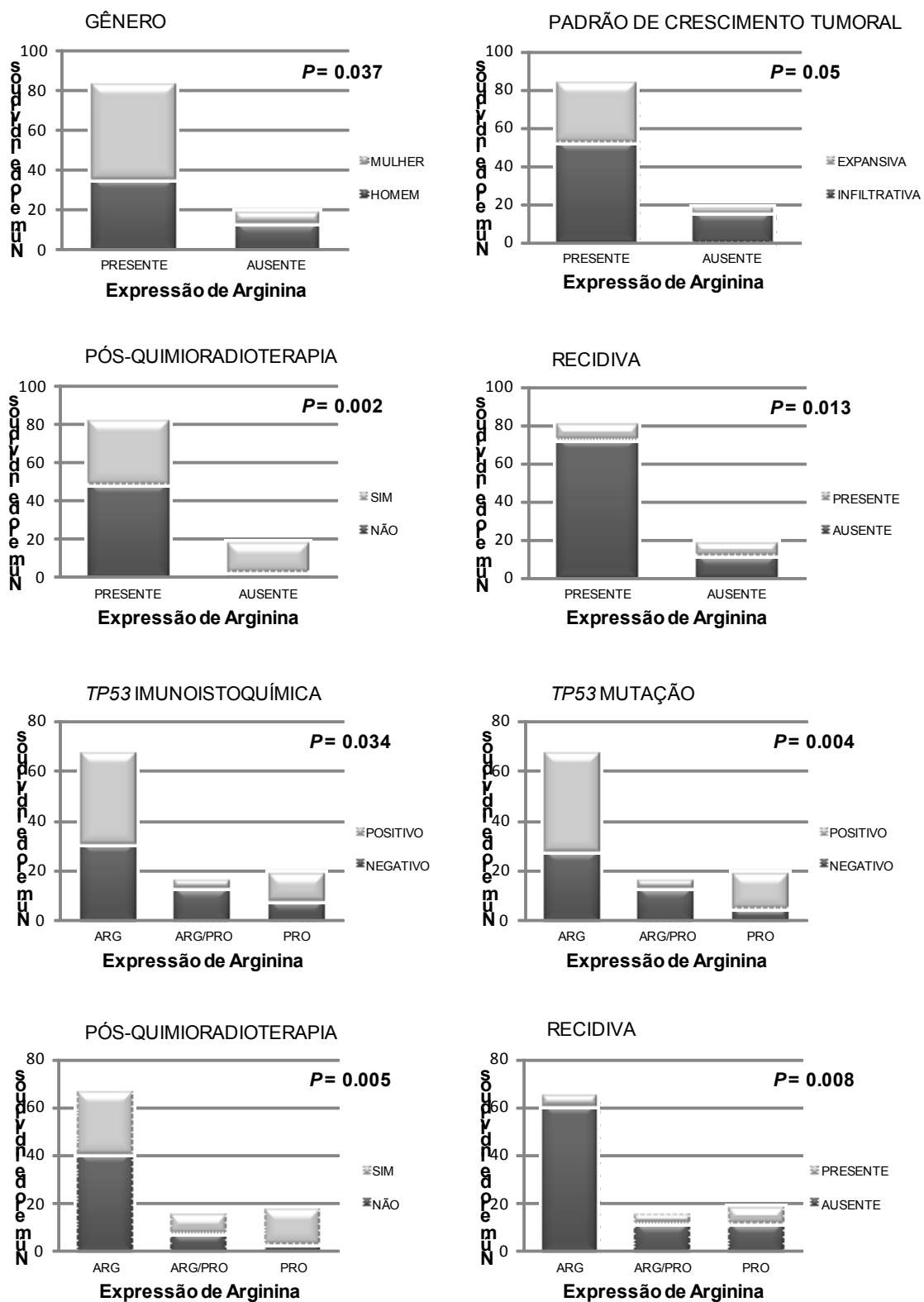


Figura 22 - Associações entre o polimorfismo 73Pro>Arg e as variáveis clinicopatológicas estatisticamente significativas.

Tabela 14 - Associações entre o polimorfismo 73Pro>Arg e as variáveis clinicopatológicas estatisticamente significativas.

Variável	N (%)	Expressão dos alelos			p	Expressão Alelo		P
		Arginina	Arg/Pro	Prolina		Arginina		
						expressam	não expressam	
CCR	101 (100%)	67 (66,4%)	16 (15,8%)	18 (17,8%)	-	83 (82,2%)	18 (17,8%)	-
Gênero	49	29	7	13	NS	36 (43,4%)	13 (72,2%)	0,037
Homens	(48,5%)	(43,3%)	(43,8%)	(72,2%)				
Mulheres	52 (51,5%)	38 (56,7%)	9 (56,3%)	5 (27,8%)				
Borda do tumor	69	42	11	16	NS	53 (63,9%)	16 (88,9%)	0,05
Infiltrativa	(68,3%)	(62,7%)	(68,8%)	(88,9%)				
Expansiva	32 (31,7%)	25 (37,3%)	5 (31,3%)	2 (11,1%)				
Recidiva	85	61	12	12	0,008	73 (91,3%)	12 (66,7%)	0,013
Ausente	(86,7%)	(93,8%)	(80%)	(66,7%)				
Presente	13 (13,3%)	4 (6,2%)	3 (20%)	6 (33,3%)				
Quimioradioterapia	52	41	8	3	0,005	49 (60,5%)	3 (17,6%)	0,002
Não	(53,1%)	(62,1%)	(53,3%)	(17,6%)				
Sim	46 (46,9%)	25 (37,9%)	7 (46,7%)	14 (82,4%)				
Expressão p53 IHC	52	31	13	8	0,034	45 (54,2%)	8 (44,4%)	NS
Negativa	(51,5%)	(46,3%)	(81,3%)	(44,4%)				
Positiva	49 (48,5%)	36 (53,7%)	3 (18,8%)	10 (55,6%)				
Mutação TP53	46	28	13	5	0,004	41 (49,4%)	5 (27,8%)	NS
Não observada	(45,5%)	(41,8%)	(81,3%)	(27,8%)				
Observada	55 (54,5%)	39 (58,2%)	3 (18,8%)	13 (72,2%)				

NS = não significativo

O estudo não mostrou diferenças significativas entre o polimorfismo 72Pro>Arg e a taxa de sobrevida global. No modelo proporcional de Cox para sobrevida as variáveis que se mantiveram independentes foram o agrupamento do estadiamento TNM (OR 4,38; IC 1,84-10,43; P= 0,001) e a invasão perineural (OR 3,21; IC 1,26-8,19; P= 0,014) (Figura 23; Tabela 15).

No modelo de regressão logística múltipla as variáveis que se mostraram como preditores independentes de recidiva da doença foram a expressão do alelo Arg72 (OR 3,83; IC 1,02-14,35; P= 0,046) e o agrupamento do estadiamento TNM (OR 7,15; IC 1,45-35,29; P= 0,016) (Tabela 15). Este modelo explicou 24,5% da variação das taxas de recidiva.

Tabela 15 - Análise multivariada para sobrevida global e recidiva do tumor

Variáveis	OR	(IC 95%)	P
Sobrevida			
Estadiamento TNM			
I-II	1	1,84 – 10,43	0,001
III-IV	4,38		
Invasão Perineural			
Não observada	1	1,26 – 8,19	0,014
Observada	3,21		
Recidiva			
Arg 72			
Expresso	1	1,02 – 14,35	0,046
Não expresso	3,83		
Estadiamento TNM			
I-II	1	1,45 – 35,29	0,016
III-IV	7,15		

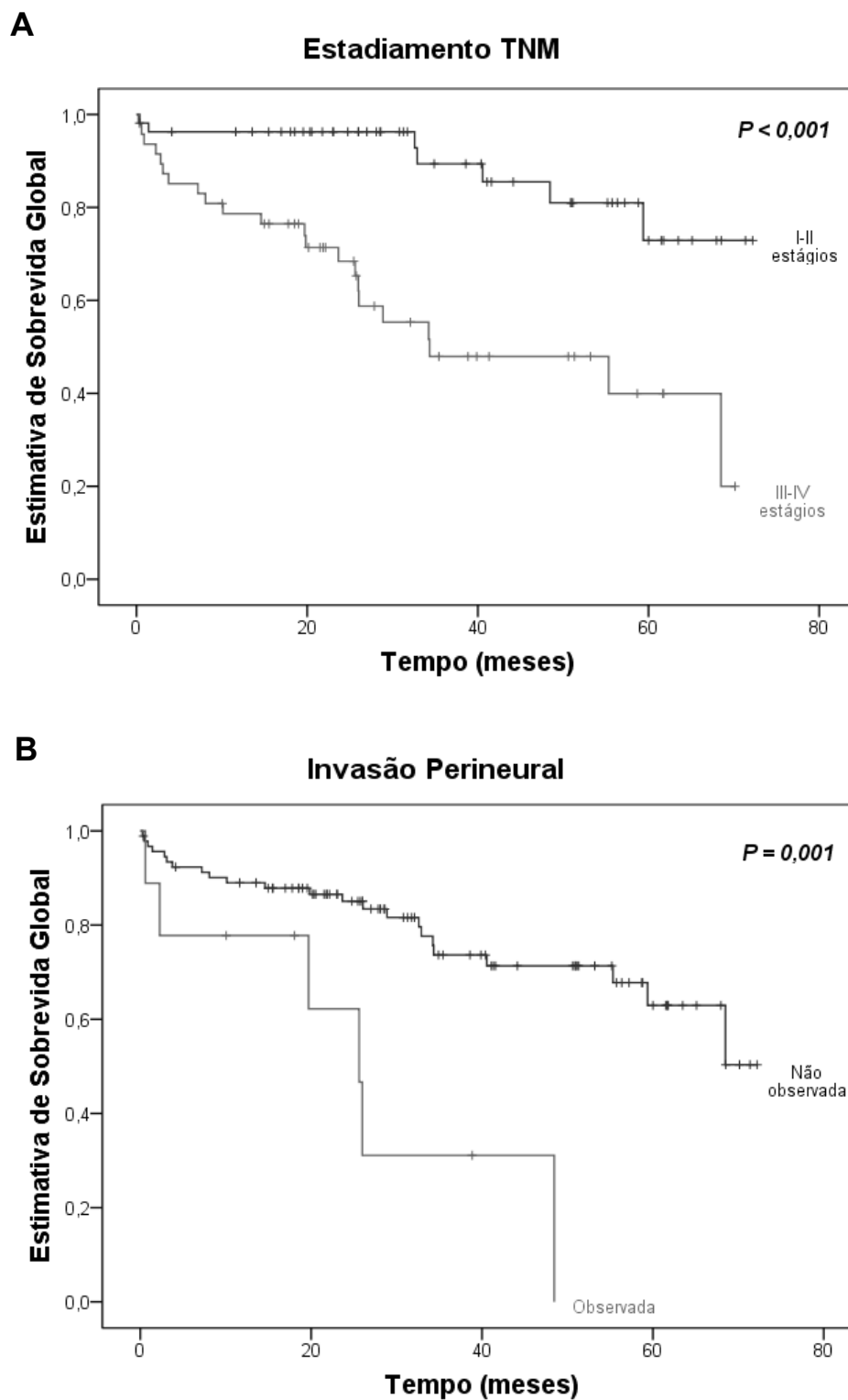


Figura 23 - Curvas de sobrevida global da an\u00e1lise univariada para estadiamento TNM (agrupados I-II e III-IV) em “A” e para invas\u00e3o perineural, associadas \u00e0s taxas de sobrevida dos pacientes (Kaplan-Meier) em “B”.

5.3.4 Polimorfismo PIN3

Em relação ao polimorfismo PIN3, 90,8% dos tumores que não expressam o alelo A2 não apresentaram recidiva da doença ($P = 0,028$ – Tabela 16).

Tabela 16 - Associação entre o alelo A2 e recidiva do tumor.

		Recidiva		Total	P
		Não observada	Observada		
Alelo A2	Ausente	69 (90,8%)	7 (9,2%)	76 (77,6%)	0,028
	Presente	16 (72,7%)	6 (27,3%)	22 (22,4%)	
Total		85 (86,7%)	13 (13,3%)	98	

5.4 HIGH RESOLUTION MELTING

A técnica de HRM foi proposta para verificar a acurácia da metodologia no rastreamento das alterações em *TP53*. Assim, todas as amostras foram sequenciadas para testar o método.

Os exons 2, 3 e 4 necessitaram de maior padronização para tornar a amplificação mais específica, eliminando os dímeros de iniciadores e formação de estruturas secundárias. Foram testadas diferentes concentrações de iniciadores, de DNA, de $MgCl_2$, e temperaturas de anelamento.

A análise do HRM para o exon 2 resultou em uma amplificação mais específica aumentando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores para 62°C (ao invés de 60°C, utilizada nos demais ensaios). Apenas duas

amostras foram detectadas como variantes sem apresentarem alteração na sequência amplificada. Entretanto, a definição de variante foi realizada em apenas uma amostra de cada duplicata, o que não permite concluir a definição do software para estas amostras. Além disso, o software não conseguiu identificar as variantes que apresentam o polimorfismo no intron 2 (PIN2; c.74+38C>G). Os dados brutos deste ensaio estão representados no Anexo 6A. O gráfico utilizado para a análise das variantes está representado na Figura 24.

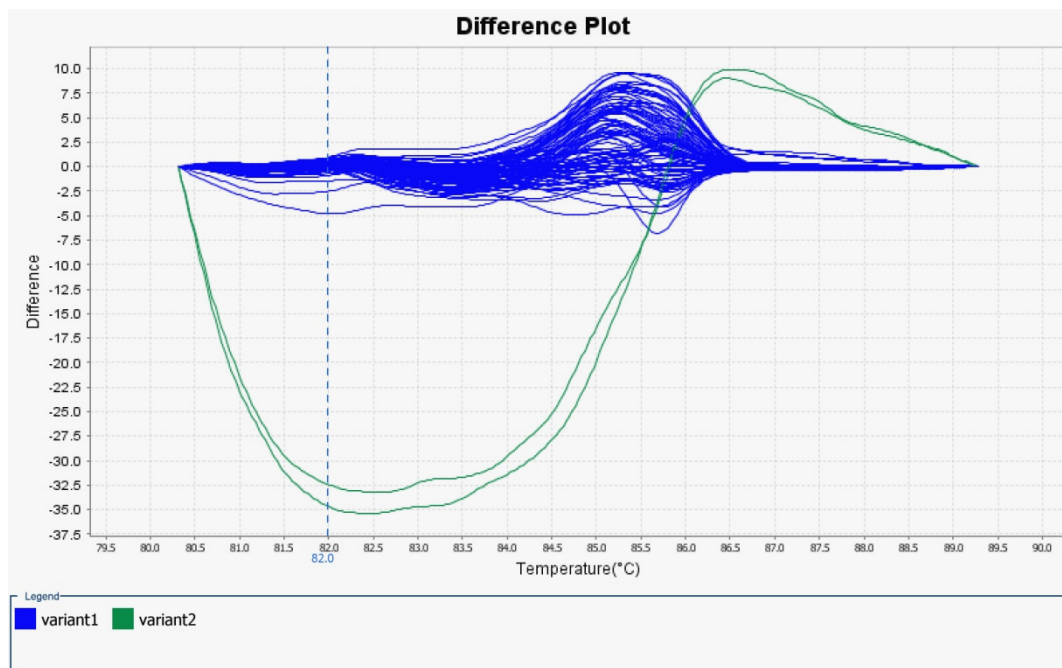


Figura 24 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 2. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

A análise do HRM para o exon 3 resultou em uma amplificação mais específica aumentando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores para 63°C. Como o intron 3 apresenta um polimorfismo de duplicação de 16

pb, ele passou também a ser alvo de estudo utilizando o HRM, de forma que os iniciadores desenhados para esta técnica, e que também seriam utilizados para subsequente reação de sequenciamento, foram desenhados de forma a incluir este polimorfismo para análise, o que resultou em maior dificuldade de padronização e interpretação das reações de HRM. Assim, a região amplificada contém o exon e o intron 3. Entretanto, mesmo após a adequação do ensaio às recomendações do fabricante, o software identificou seis tipos de variantes, sendo que o esperado seria que fossem encontradas apenas as três representativas do PIN3 em homozigose dominante, homozigose recessiva e heterozigose, já que nenhuma amostra apresenta mutação identificada no exon 3. Apesar da determinação de um número maior de variantes do que o esperado, o software foi capaz de diferenciar corretamente as variantes do PIN3 heterozigotas e homozigotas recessivas, das amostras homozigotas dominante. As amostras A2/A2 foram corretamente separadas das demais. Os dados brutos deste ensaio estão representados no Anexo 6B. O gráfico utilizado para a análise das variantes está representado na Figura 25.

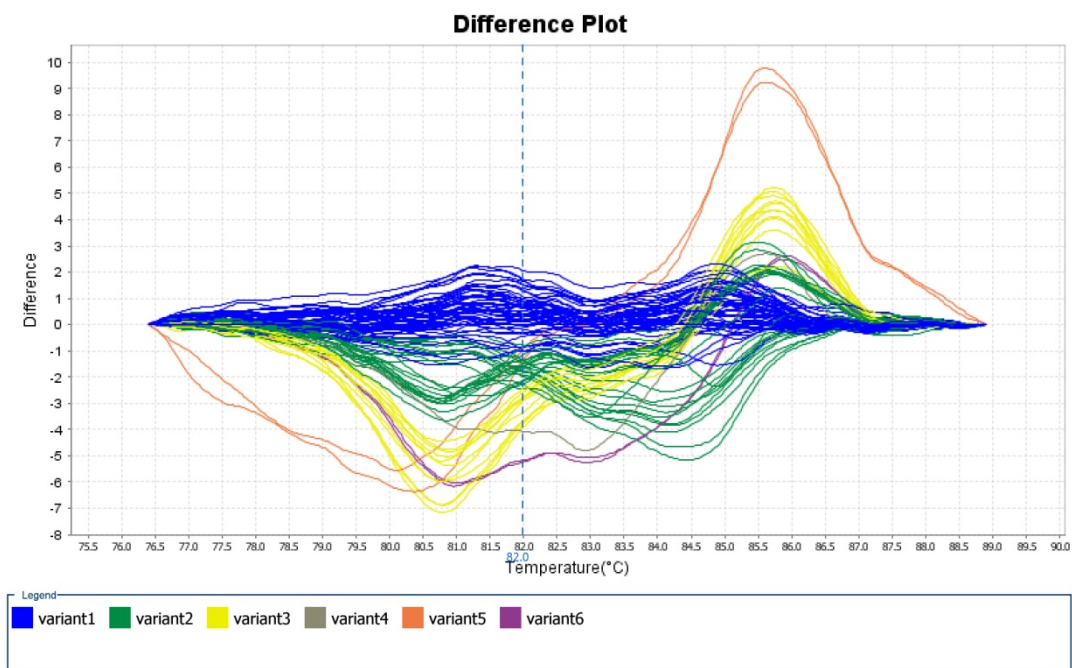


Figura 25 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 3. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

A análise do HRM para o exon 4 resultou em uma amplificação mais específica aumentando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores para 63°C. O exon 4 apresenta o polimorfismo de alta frequência 72Pro>Arg, o que resulta na formação de mais de um pico na curva de dissociação. Entretanto, mesmo após a adequação do ensaio às recomendações do fabricante, os resultados mostravam três picos distintos dentro da região ativa de dissociação. Em relação à detecção das variantes, espera-se encontrar três tipos, representativas do 72Pro>Arg em homozigose dominante, homozigose recessiva e heterozigose. Além destas, como algumas amostras apresentam mutação na mesma região amplificada, esperava-se que o software fosse capaz de identificar como variantes as amostras que continham a mutação além do polimorfismo. Entretanto, entre

as três variantes identificadas pelo software, apenas uma delas representou corretamente a variante que continha a mutação além do polimorfismo. As outras duas variantes encontradas pelo software reuniam dentro da mesma definição tanto casos homocigotos quanto heterocigotos. Os dados brutos deste ensaio estão representados no Anexo 6C. O gráfico utilizado para a análise das variantes está representado na Figura 26.

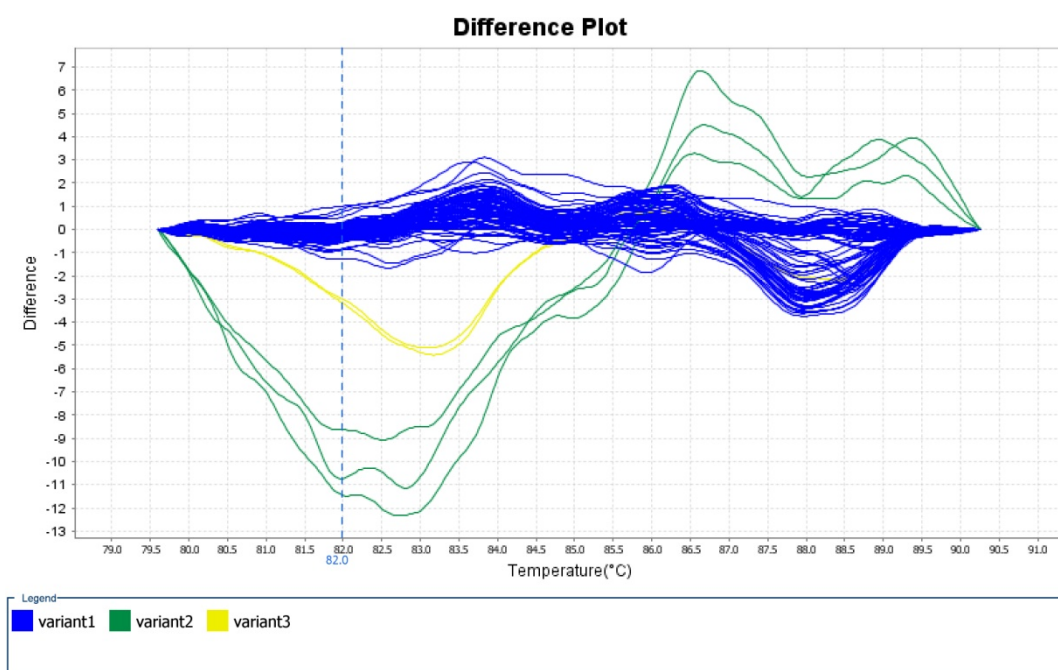


Figura 26 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 4. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

A análise do HRM para o exon 5 não apresentou resultados satisfatórios, pois apesar de a reação ter sido corretamente padronizada e a amplificação ter sido realizada adequadamente, o software não identificou nenhuma das variantes encontradas no sequenciamento. Erroneamente, identificou uma amostra como variante, sendo que ela não apresenta

alteração na sequência amplificada. Como essa identificação foi feita em apenas uma amostra dentre a duplicata, o resultado encontrado não pode ser considerado como confiável. Os dados brutos deste ensaio estão representados no Anexo 6D. O gráfico utilizado para a análise das variantes está representado na Figura 27.

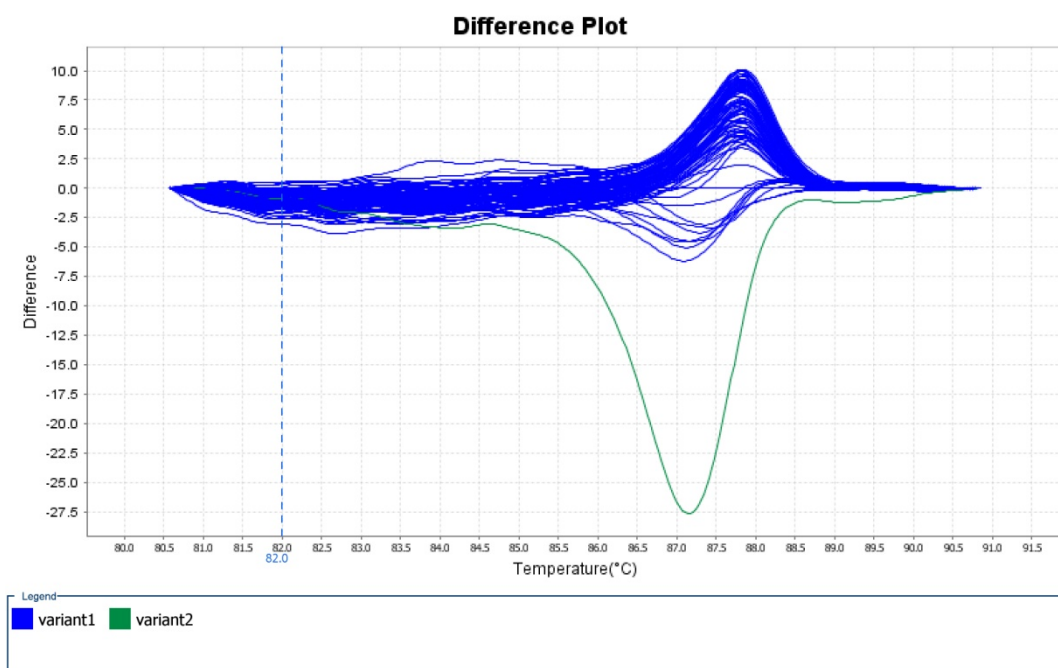


Figura 27 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 5. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

As análises do HRM para os exons 6, 7, 8 e 10 apresentaram resultados excelentes, pois todas as variantes encontradas no sequenciamento foram corretamente identificadas na análise do software de HRM, nas duplicatas. Além das variantes corretamente identificadas, o software identificou como outras variantes amostras que não possuíam alteração na sequência amplificada, ainda que não sempre nas duplicatas,

gerando falsos positivos. Os dados brutos destes ensaios estão representados nos Anexos 6E, 6F, 6G, 6H. Os gráficos utilizados para as análises das variantes estão representados nas Figuras 28 a 31.

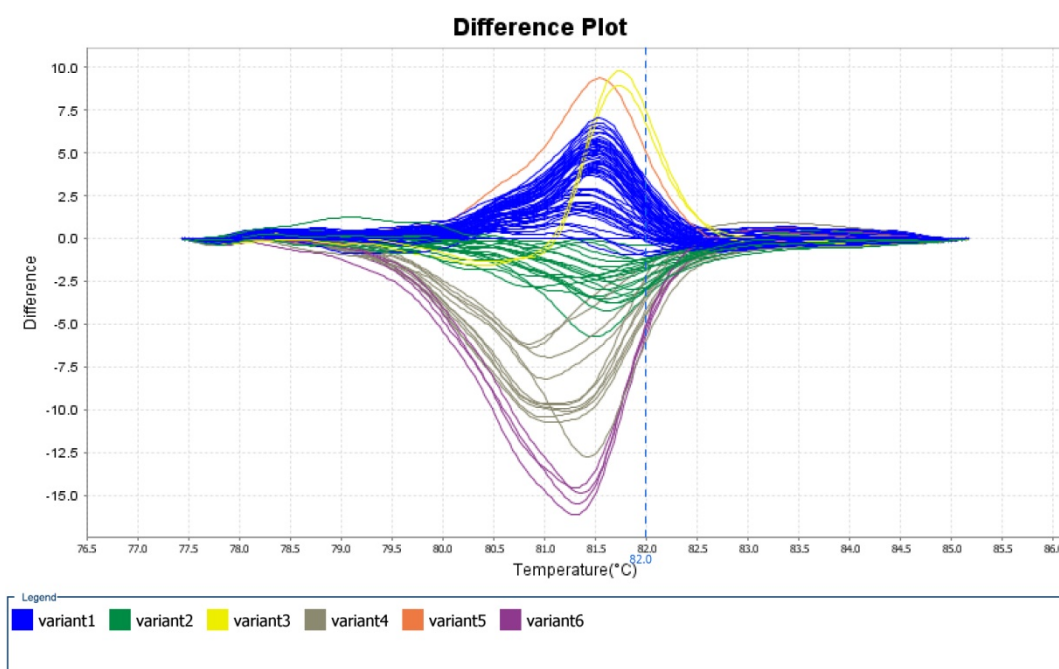


Figura 28 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 6. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

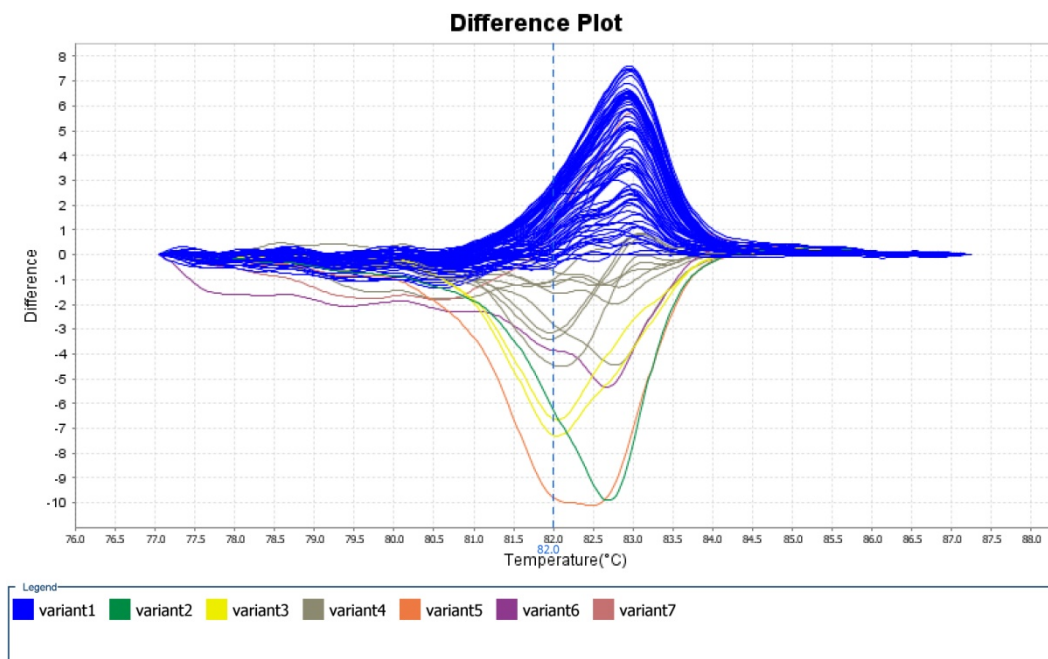


Figura 29 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 7. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

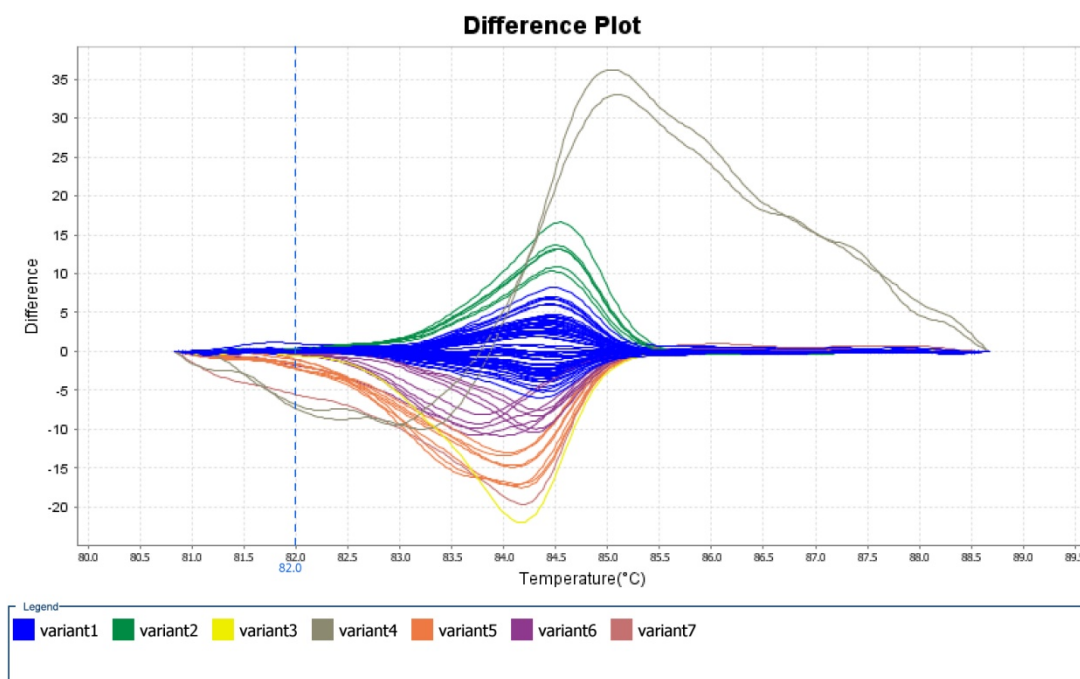


Figura 30 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 8. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

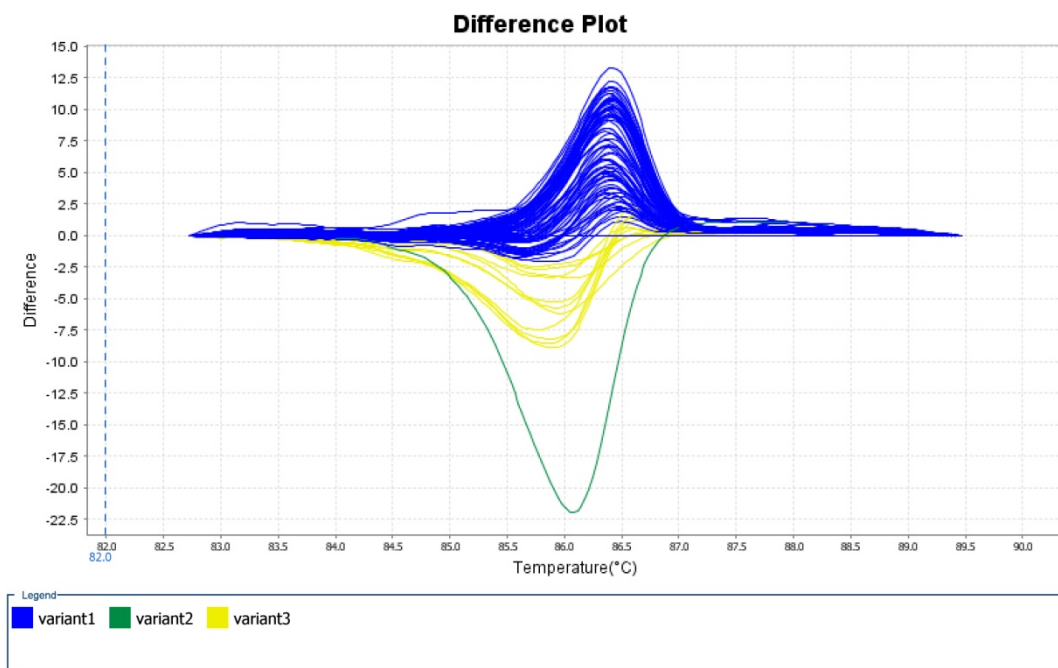


Figura 31 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 10. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

A análise do HRM para os exons 9 e 11 foi realizada de forma a cobrir todo o gene, seguindo a proposta de um rastreamento das alterações. Entretanto, nenhuma das amostras revelou alteração na sequência destes exons. A análise do HRM, assim como para a maioria dos exons, identificou como variantes amostras sem alteração na sequência amplificada, ainda que não sempre nas duplicatas, gerando falsos positivos. Os dados brutos destes ensaios estão representados nos Anexos 6I e 6J. Os gráficos utilizados para as análises das variantes estão representados nas Figuras 32 e 33.

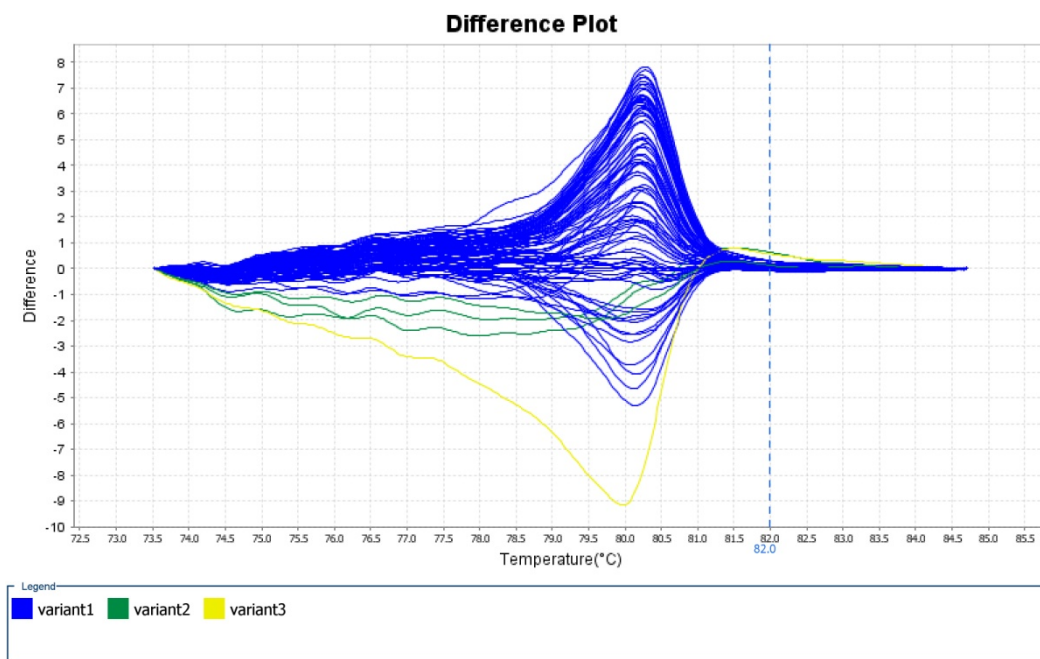


Figura 32 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 9. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

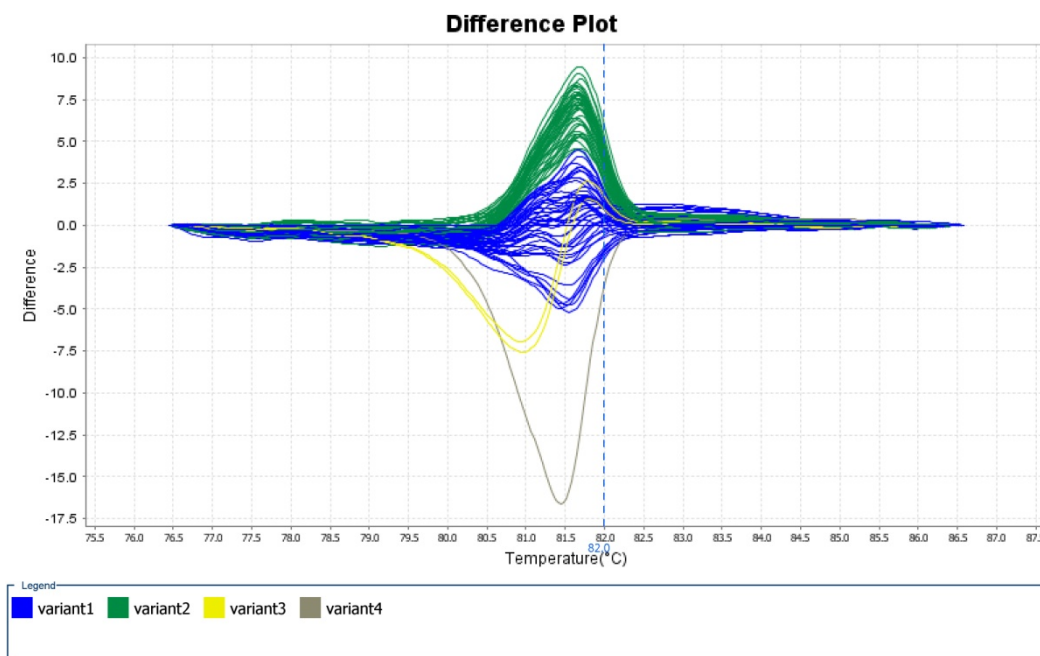


Figura 33 - Gráfico resultante da análise do HRM para o exon 11. O gráfico alinha os dados relativos às diferenças de fluorescência entre as curvas de dissociação das sequências referências com as sequências variantes.

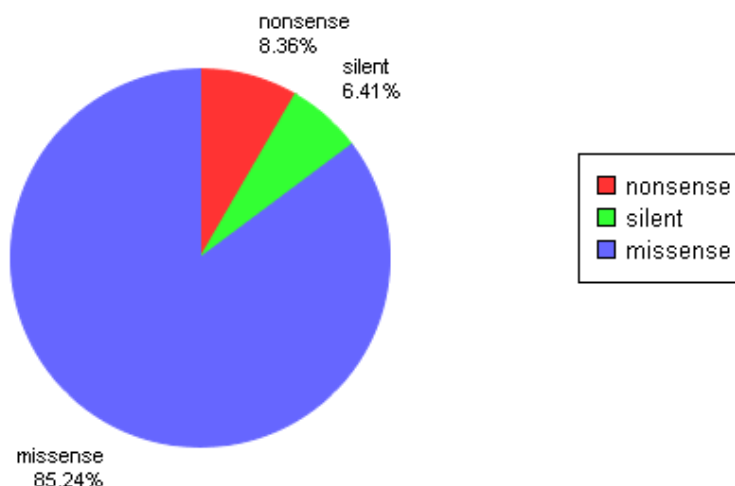
6 DISCUSSÃO

Este estudo buscou investigar as alterações de *TP53*, bem como buscar associações entre as alterações encontradas com a expressão imunohistoquímica e os dados clinicopatológicos, através de análises da proteína, do cDNA e do gDNA de *TP53*.

6.1 MUTAÇÕES SINÔNIMAS

Levando-se em conta o número de mutações sinônimas encontrado neste estudo, das 101 amostras, três (3%) delas apresentaram mutações sinônimas. O banco de dados do IARC revela que de todas as mutações somáticas pontuais já descritas em *TP53*, aproximadamente 6,4% delas são mutações sinônimas (LAMOLLE et al. 2006 – Figura 34). Considerando o número dos tipos de mutações pontuais encontradas neste estudo, do total de 34 eventos de mutações pontuais, três (8,8%) deles correspondem a mutações sinônimas, de forma a corroborar com os achados de literatura.

Effect distribution of 1536 mutations



(C) IARC TP53 Database, R15 release, November 2010

Figura 34 - Frequência dos tipos de mutações já descritas em CCR (IARC)

Mutações sinônimas envolvem na maior parte das vezes transições G:C→A:T (62%), sendo que mutações G→A estão frequentemente associadas aos sítios de metilação. Todas as seqüências exônicas de CG são metiladas em *TP53*, e assim, propensas a sofrerem mutação. Isso porque a citosina metilada é propensa à transição C→T por deaminação (LAMOLLE et al. 2006). Dessa maneira, as mutações sinônimas encontradas neste estudo, 36Pro>Pro (CCG>CCA) e 224Glu>Glu (GAG>GAA) podem estar envolvidas na ruptura do sítio de metilação e, assim, no processo carcinogênico. Mutações sinônimas do tipo G:C→A:T caracterizam tumores associados ao cigarro, como de pulmão ou bexiga. Outros dados revelam que códonos que possuem duas ou três guanosinas ou citosinas apresentam mutações sinônimas significativamente com maior

freqüência do que códons que não as possuem, como é o caso do códon que codifica o aminoácido Prolina (KOUIDOU et al. 2006).

A outra mutação sinônima encontrada neste estudo, a 338Phe>Phe (TTC>TTT), também apresenta características comuns aos achados da literatura. As mutações C→T correspondem a 39% de todas as mutações silenciosas. Adicionalmente, mutações envolvendo os aminoácidos 307-393 geralmente são cruciais para a atividade de p53 (KOUIDOU et al. 2006). Evidências sugerem que as substituições sinônimas podem induzir variabilidade fenotípica por alterar a acurácia do *splicing*, fidelidade da tradução, conformação e função da proteína (CZECH et al. 2010). Além disso, a distribuição não uniforme dos códons pode resultar em uma velocidade também não uniforme do movimento dos ribossomos ao longo do RNA mensageiro, o que tem sido demonstrado experimentalmente: a variabilidade de uso dos códons e a velocidade de alongação da proteína são necessárias para o correto empacotamento do peptídeo nascente (LAMOLLE et al. 2006; MARIN 2008; KOMAR 2009).

Assim, em relação ao uso dos códons de acordo com sua frequência de utilização, o códon CCG é responsável por codificar 11% do aminoácido prolina, enquanto que o códon CCA é responsável por codificar 28%. O códon GAG é responsável por codificar 58% do aminoácido glutamato, enquanto que o códon GAA é responsável por codificar 42%. O códon TTC é responsável por codificar 54% do aminoácido fenilalanina, enquanto que o códon CCA é responsável por codificar 46% (NAKAMURA et al. 2000).

Mutações sinônimas envolvem a troca redundante de um códon e, de forma geral, não alteraria a estrutura tridimensional da proteína. Entretanto, uma observação surpreendente foi relatada para o gene humano que codifica resistência a múltiplas drogas, da P-glicoproteína: um efluxo reduzido de seus moduladores baseia-se nas substituições silenciosas C1236T e A3435T. Importante ressaltar que estas substituições silenciosas estão presentes em 31% a 49% das populações da China, Índia e Malásia. Os autores não detectaram mudanças na estabilidade do RNA mensageiro, presença de variantes alternativas de *splicing*, ou diferenças nos níveis da P-glicoproteína ou da sua localização intracelular. Estudos utilizando anticorpos sensíveis à conformação da proteína revelaram diferenças entre a proteína selvagem e o haplótipo mutante, evidenciando alterações conformacionais (CZECH et al. 2010).

Mais de 40 doenças já foram associadas a mutações sinônimas (CZECH et al. 2010). Apesar de não serem frequentes, mutações sinônimas fornecem uma valiosa ferramenta para estudo da carcinogênese, já que qualquer vantagem seletiva em potencial associada a estas mutações é independente das considerações estruturais da proteína. Estas mutações podem, entretanto, estar relacionadas a modificações epigenéticas e forças seletivas que interferem na transcrição. O grande volume de dados de mutações sinônimas disponíveis nos bancos de dados de *TP53* justifica estes estudos (KOUIDOU et al. 2006).

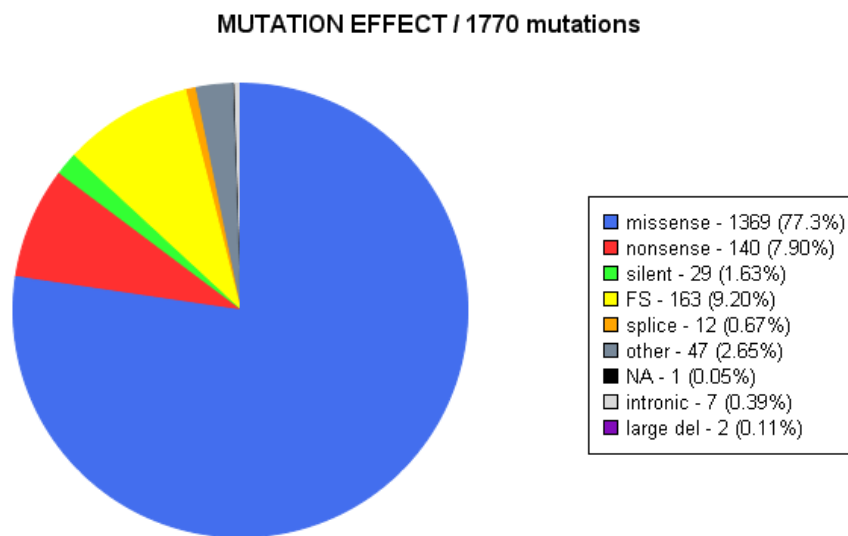
6.2 *SPLICING*

Apenas uma (1%) amostra revelou evidência de mutação sinônima relacionada ao mecanismo de *splicing*, de acordo com o resultado do sequenciamento, assim como já foi verificado para o gene *MLH1* em carcinoma colorretal (AUCLAIR et al. 2006) e *BRCA1* em carcinoma de mama (ORBAN e OLAH 2001). SENAPATHY et al. (1990) conduziram uma análise *in silico* para testar se mutações sinônimas em *TP53* poderiam estar associadas com a formação de novos sítios de *splicing*. De 652 mutações sinônimas testadas, apenas sete (1%) resultaram na formação de novos sítios aceptores ou doadores de *splicing* (HOLMILA 2003; BÉROUD e SOUSSI 2003).

Neste estudo foram encontradas três (3%) amostras que apresentaram alterações na sequência de *TP53* que levaram a ruptura do sítio de *splicing*.

Considerando o número dos tipos de alterações encontradas neste estudo, do total de 42 eventos de alterações, três (7,1%) deles correspondem a mutações relacionadas ao mecanismo de *splicing*, dado sete vezes superior ao relatado em literatura. O banco de dados do IARC revela que mutações nos sítios doadores ou receptores de *splicing* já descritas em *TP53* são relativamente raros, correspondendo a menos de 1% do banco de dados de mutações descritas (LAMOLLE et al. 2006 – Figura 35). A maior frequência encontrada pode ter sido decorrente da estratégia adotada para a busca de alterações deste estudo, já que a análise do

transcrito de *TP53* (cDNA), juntamente com a análise da sequência genômica de *TP53* (gDNA) facilita a detecção de possíveis variantes de *splicing*, que podem ter sido subestimadas em análises utilizando apenas o gDNA para o rastreamento das alterações.



(C) IARC TP53 Database, R15 release, November 2010

Figura 35 - Dados dos tipos de mutações em CCR (IARC).

Mutações que alteram o processamento e a estabilidade do RNA mensageiro podem estar envolvidas com o controle do mecanismo de *splicing* por alterar ou romper o sítio de *splicing*, por se localizar nas regiões de *enhancers* ou *silencers*, ou ainda por impedir a correta localização do spliceossomo ou a ligação das proteínas regulatórias, o que pode levar a supressão de um exon ou a retenção de um intron, ou mesmo de parte deles. Consequentemente, proteínas aberrantes e não funcionais podem ser criadas, como descrito com as proteínas BRCA2 e NAD(P)H (CZECH et al. 2010).

As alterações no RNA mensageiro causadas por *splicing* resultam em proteínas mutantes de p53 que podem se acumular nos tumores. Entender o controle da atividade dos mutantes é de fundamental importância na elucidação dos mecanismos moleculares no processo tumoral (HOLLSTEIN e HAINAUT 2010).

6.3 MUTAÇÕES *MISSENSE*

O resultado apresentado é semelhante aos 50% de mutação em p53 em tumores humanos referidos em literatura (LAMOLLE et al. 2006) e algumas mutações têm sido relacionadas à fenótipos clínicos específicos (ALSNER et al. 2000). Segundo o banco de dados do IARC, mais de 75% de todas as mutações estudadas em *TP53* são do tipo *missense*, dado que novamente é semelhante aos dados encontrados neste estudo (PETITJEAN et al. 2007).

Sendo um gene supressor de tumor, o esperado seria que as mutações que ocorrem na maioria dos tumores diminuíssem os níveis de *TP53* através da diminuição de sua proteína, ou por produzir uma proteína truncada. Entretanto, mais de 75% das alterações em *TP53* são mutações *missense* que levam à síntese de uma proteína completa e estável. Além disso, essas proteínas mutantes são geralmente expressas em níveis maiores do que as proteínas selvagens. Estes resultados intrigantes sugerem que mutações *missense* em *TP53* podem não somente levar a uma perda de função, mas também estar relacionadas a um potencial ganho de

função, contribuindo para a progressão do câncer efetivamente por um mutante de *TP53* com funções oncogênicas. Seguindo a linha desta possibilidade, tem sido mostrado que algumas mutações possuem um efeito dominante negativo sobre a proteína p53 selvagem, suprimindo sua atividade. O ganho de função inclui diferentes aspectos, como regulação da expressão gênica, crescimento celular, morte celular e resistência a agentes quimioterapêuticos. Estes novos papéis para as proteínas mutantes de p53 implicam que as mutações em *TP53* estão sujeitas às forças seletivas no câncer, já que a taxa de mutações não sinônimas é significativamente maior do que as sinônimas, testificando para uma seleção positiva. Outra possível força de seleção é a eficiência de translação. Como cada códon é lido por diferentes tRNAs, códons com tRNAs correspondentes mais abundantes estão propensos a serem traduzidos mais rapidamente. Assim, o uso de códons (sinônimos e não sinônimos) afeta a elongação da tradução e, dessa maneira, a eficiência da tradução (WALDMAN et al. 2009).

Vários estudos têm lançado mão do uso de programas de predição para avaliar a função de mutações não sinônimas encontradas nos genes. Estes algoritmos têm grande potencial para o rastreamento de alterações potencialmente patogênicas em genes associados com risco de câncer, levando em conta a conservação evolucionária em relação a alterações neutras ou deletérias. Esses programas podem predizer o quanto uma variante pode ser deletéria, usando um grupo de regras empíricas baseadas na sequência, na filogenética e na informação estrutural da variante.

Os dados do IARC revelam que aproximadamente 96% das mutações *missense* são deletérias e aproximadamente 87% das mutações *missense* não são funcionais (Figura 36), dado que novamente foi comprovado com este estudo, pois todas as mutações *missense* encontradas neste estudo já foram descritas como mutações deletérias e não funcionais.

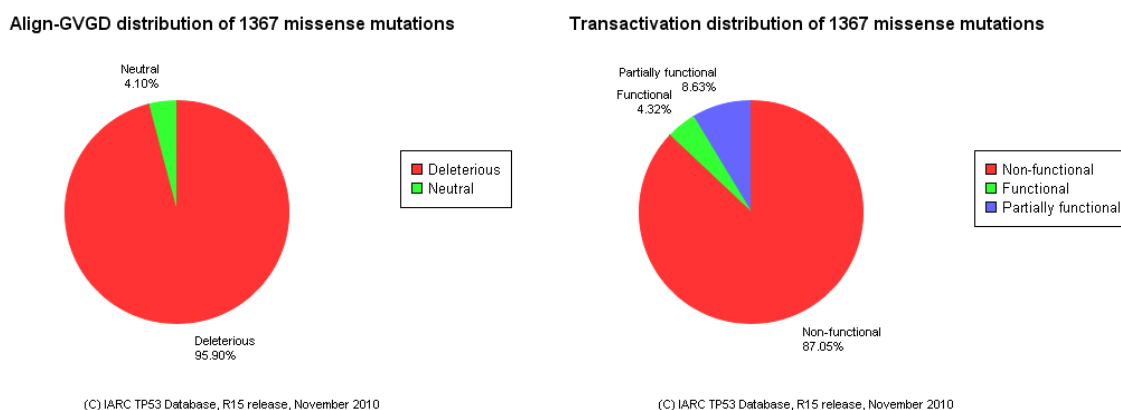


Figura 36 - Frequência de mutações *missense* em relação à sua atividade e funcionalidade (IACR).

6.4 MUTAÇÕES *NONSENSE*

As duas mutações *nonsense* encontradas apresentavam-se em heterozigose, de forma que a formação de uma proteína truncada era resultante de apenas um dos alelos, o que pode explicar a ausência de expressão proteica de p53 verificada nestes casos.

Além disso, a célula conta com sofisticados mecanismos para detectar mutações *nonsense*, como é o caso do *Nonsense-mediated Decay*. Neste mecanismo, a maquinaria da tradução reconhece sítios de *splicing downstream* da mutação *nonsense*, marcando o RNA para a degradação e

evitando que ele seja traduzido. Novamente, seqüências CG metiladas também estão envolvidas com a frequência de mutações nonsense, assim como bases adjacentes aos sítios de metilação (KOUIDOU et al. 2006).

6.5 POLIMORFISMOS

Alguns polimorfismos em *TP53* têm sido relacionadas a fenótipos clínicos específicos (ALSNER 2000). Dessa maneira, é factível que a existência de variantes naturais de *TP53* esteja ligada ao desenvolvimento de doenças específicas e que elas possam representar marcadores preditivos para prevenção e para estratégias precoces de intervenção. Variantes genéticas naturais de *TP53* aparecem também como uma boa fonte de estudos sobre diferenças entre indivíduos relacionados ao risco de câncer e resposta às terapias.

A identificação destas variantes contribui para a elucidação da etiologia deste tipo de tumor e fornecem alvos para o desenvolvimento futuro de abordagens terapêuticas. Os polimorfismos em *TP53*, assim como os sítios frequentes de mutações, são considerados como potenciais alvos de estudos para futuras intervenções (PHAROAH et al. 1999).

O polimorfismo do intron 2 (PIN2, rs1642785) possui o alelo C como alelo ancestral. De acordo com estudos do *1000Genome phase 1 genotype data*, considerada como a população referência, a MAF do alelo G é de 0,364. PHANG et al. (2011) encontrou uma frequência de 0,53 para o alelo G. O presente estudo encontrou maior frequência do alelo G, de 0,72. Não

existem estudos correlacionando o PIN2 e aumento de risco ou agressividade em tumores.

Em relação ao PIN3, não existem resultados de frequência alélica do projeto *1000Genome phase 1 genotype*, nem informação sobre qual seria o alelo ancestral. Dados do *Hapmap* (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003 - *Release: NCBI dbSNP Build 137, Jun 2012*) realizados com 90 indivíduos não relacionados (24 africanos-americanos, 24 asiáticos-americanos, 24 europeus-americanos, 12 hispânicos-americanos e 6 americanos nativos) mostram a presença do alelo A1 em 94% e do A2 em 6% da população estudada. O presente estudo encontrou uma frequência alélica de 0,12 para o alelo A2.

O exon e o intron 3 têm, respectivamente, 21 e 112 pares de bases. Assim, é possível que um aumento de 15% no comprimento do intron possa alterar o mecanismo de *splicing* do mRNA por reduzir a estabilidade do pré-mRNA carreador da duplicação de 16 pb, afetando assim, a função de p53 (GEMIGNANI et al. 2004).

O resíduo 72, apesar de não conservado, está localizado em uma região rica em prolina no exon 4 e pode afetar a estrutura do possível domínio de ligação SH3. A proteína com o aminoácido arginina na posição 72 foi reportada como mais eficiente na indução de apoptose do que a proteína com prolina. Esta propriedade se correlaciona com a maior capacidade de interagir com MDM2, o que facilita a exportação nuclear e a localização mitocondrial. Outras diferenças também já foram relatadas, como habilidade de se ligar aos componentes da maquinaria de transcrição, ativar

a transcrição, induzir a apoptose e reprimir a transformação de células primárias. A proteína com Arg72 também foi descrita como mais eficientemente marcada para a degradação pela proteína E6 do HPV16, sugerindo que indivíduos homocigóticos para Arg72 podem ter um risco aumentado de desenvolver tumores cervicais associados ao HPV (PETITJEAN et al. 2007).

Diferenças étnicas também foram relatadas em relação à frequência alélica do códon 72. A frequência de expressão do alelo Pro72 foi de 0,26. Esta frequência é consistente com a colonização europeia do Brasil, o que contribui com uma forte influência europeia no genoma dos brasileiros (MONTEIRO SANTOS et al. 2012). Estudos mostraram uma frequência de 0,24 para espanhóis (GEMIGNANI et al. 2004), 0,28 para italianos (PERFUMO et al. 2006) e 0,31 para franceses (OLSCHWANG et al. 1991). Para indivíduos africanos ou afro-americanos a frequência de Pro72 foi de 0,29 (CANN et al. 2002). Um estudo brasileiro prévio mostrou uma frequência genotípica de 0,25 para o alelo Pro72 (LIMA et al. 2006). Dados do projeto *Hapmap* (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003) para este polimorfismo confirmam as diferenças das frequências alélicas entre os diferentes grupos étnicos, como para o alelo Pro72 de 0,67 para a população “*Yoruba in Ibadan, Nigeria*”; 0,41 e 0,49 para populações de “*Japanese in Tokyo, Japan*” e “*Han Chinese in Beijing, China*”; 0,23 para a população de CEPH (“*Utah residents with ancestry from Northern and Western Europe*”) e 0,60 para o *1000 Genome phase1 genotype data*.

Tem sido observado que diferenças de expressão entre alelos do mesmo gene contribuem para a variação fenotípica entre indivíduos. Estudos mostram que existem variações no nível de expressão relativa de genes heterozigotos específicos (YAN et al. 2002; BRAY et al. 2003; LO et al. 2003; SCHADT et al. 2003; PASTINEM et al. 2004; CHEUNG et al. 2008).

Expressão monoalélica com escolha aleatória entre alelos maternos e paternos também tem sido mostrada por afetar centenas de genes autossômicos, e assim, contribuir para a variabilidade individual (GIMELBRANT et al. 2007).

Seguindo a linha destas observações, além da origem da população, a frequência do alelo Pro72 também se correlaciona significativamente com a latitude geográfica (BECKMAN et al. 1994).

Estas observações levaram sugestão de que os dois alelos podem produzir proteínas funcionalmente distintas e que o alelo Pro72 pode ser selecionado por ambientes sujeitos a altos níveis de radiação ultravioleta (SHI et al. 2009). Estes autores publicaram observações que sugerem uma forte seleção para os diferentes alelos de p53 em relação ao polimorfismo do códon 72 em populações que vivem em diferentes latitudes, particularmente porque essa distribuição de genótipos latitude-dependente foi observada para o mesmo grupo étnico. Observou-se também que a diferença encontrada na seleção dos alelos era fortemente associada com as variações da temperatura, o que tem sido mostrado por provocar uma resposta celular automática dependente de p53. Na conclusão deste

trabalho os autores concluíram que seria interessante determinar as implicações destes achados em câncer ou em outra doença epidemiológica.

No presente estudo também foram estudadas as potenciais interações entre estes polimorfismos e as características clinicopatológicas que são importantes marcadores em CCR, o que será discutido em tópico específico.

6.6 LOCALIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES

A maioria das mutações se concentrou na região do domínio de ligação ao DNA, principalmente nos códons considerados como *hotspots*. Existem quatro *hotspots* de códons que codificam para o aminoácido arginina em *TP53*, que contêm CpGs e, portanto, são considerados hipermutáveis. Eles estão localizados na posição 175, 248, 273 e 282 (LAMOLLE et al. 2006).

Estes são os códons mais frequentemente mutados em todos os tumores humanos e estão associados à perda de função de p53, tornando-se a possível causa da transformação celular (KATO et al. 2003; PETITJEAN et al. 2007). Além disso, também detectamos mutações pontuais em outros 19 códons localizados na região do domínio de ligação do DNA, uma observação que suporta a ideia geral de que a perda de habilidade da proteína em se ligar ao DNA pode ser um evento importante no desenvolvimento da doença.

Fora do domínio de ligação ao DNA foram detectadas mutações em dois códons, ambos localizados no domínio de oligomerização, que podem interferir na formação dos dímeros e, conseqüentemente, dos tetrâmeros: a mutação *nonsense* c.1045G>T, devido à geração de monômeros truncados incapazes de estabelecer os contatos apropriados; e a mutação sinônima c.1014C>T, que pode afetar a estrutura e a dinâmica da dimerização durante a tradução da proteína, já que ambos os mecanismos ocorrem ao mesmo tempo (NICHOLLS et al. 2002). Assim, esses dois códons podem estar implicados, de alguma forma, com a perda de função nas células malignas mutadas.

O presente estudo apresenta achados que corroboram com os achados de literatura, de forma que todos os códons considerados como *hotspots* foram encontrados mutados em mais de uma amostra (Figura 17). Segundo os dados do IARC esses códons também apresentam as maiores frequências de mutação em CCR (Figura 37).

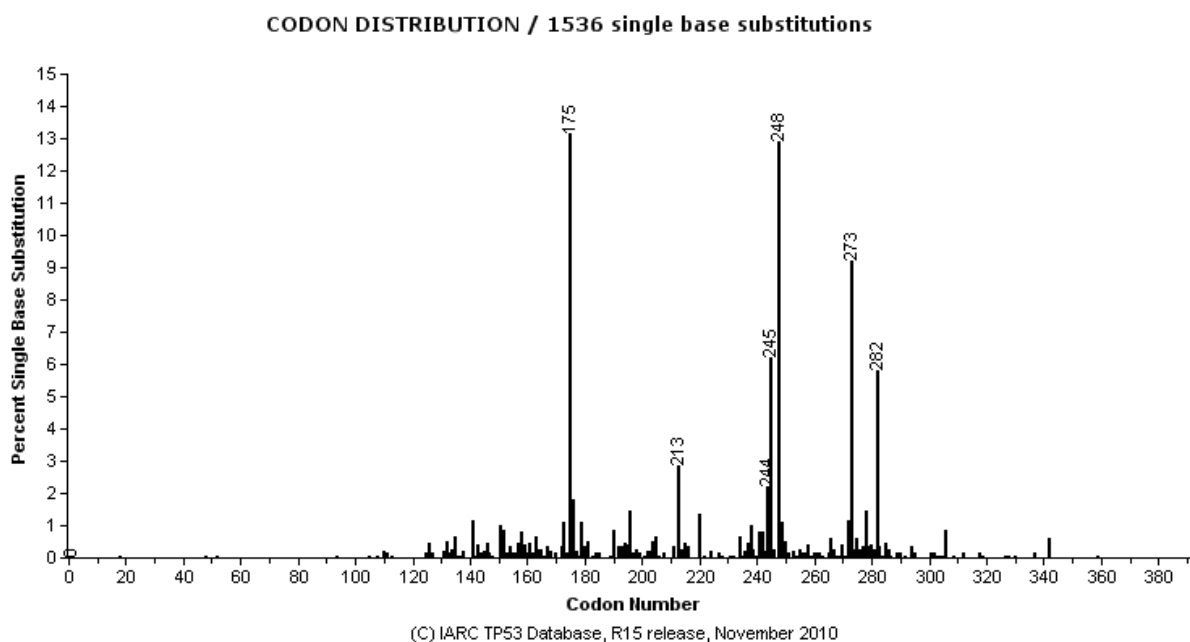


Figura 37 - Distribuição das mutações encontradas nos códons do gene *TP53*. Frequência das mutações encontradas no banco de dados do IARC para CCR.

6.7 EXPRESSÃO PROTEICA

A análise da relação entre a expressão de p53 e o padrão de mutações em *TP53* forneceu resultados interessantes.

Dado que as células em condições normais não apresentam expressão de p53 devido à meia-vida curta da proteína (FILIPPINI et al. 1998; HARRIS e LEVINE 2005; STEELE e LANE 2005), p53 não é normalmente detectado através das técnicas convencionais de imunistoquímica (LEVINE et al. 1991; RENNINSON et al. 1994; COOPER e HAFFAJEE 1997; FILIPPINI et al. 1998; HARRIS e LEVINE 2005).

Entretanto, este padrão pode ser afetado por mutações em *TP53* ou outros genes relacionados. A maioria das mutações em *TP53* está localizada no domínio de ligação ao DNA, e está associado com o acúmulo proteico, o que permite a detecção da proteína (LEVINE et al. 1991; RENNINSON et al. 1994; COOPER e HAFFAJEE 1997; FILIPPINI et al. 1998; HARRIS e LEVINE 2005). Esta característica é atualmente utilizada como marcadores de alterações em p53 nos tumores (RODRIGUES et al. 1990; WALKER et al. 1994; IACOPETTA 2003).

A proteína p53 é altamente imunogênica. Mais de 95% dos anticorpos monoclonais reconhecem epítomos localizados na região amino terminal da proteína. O anticorpo DO7 é monoclonal, isotipo IgG2b, que reconhece o epítomo de 21 a 25, na região amino terminal. Assim, apenas as isoformas de p53 que não possuem essa região amino terminal não são reconhecidas por este anticorpo (VOJTĚSEK et al. 1992; STEPHEN et al. 1995).

Estudos anteriores sugeriram que o acúmulo proteico não é um evento geral em todos os tipos de CCR, e que diferenças podem ser vistas em tumores de localizações específicas, como o reto e o lado esquerdo do colon, indicando um padrão diferente de crescimento tumoral em relação ao *status* de p53 (IACOPETTA 2003; PALUSZKIEWICZ et al. 2004). O presente estudo corrobora com os dados de literatura, pois 73,5% dos tumores que apresentaram expressão positiva de p53 estavam localizados no lado esquerdo do colon ou no reto (ainda que esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa). Assim, a observação do sinal positivo por

imunistoquímica pode depender da localização do tumor, assim como do número e tipo de mutações localizado em p53 ou proteínas relacionadas.

Em relação às amostras remanescentes, que exibiram alteração no padrão de expressão de p53, sem apresentar mutação em *TP53* (10 casos/10%), é possível que outras proteínas que regulam a expressão de p53 apresentem alteração, como MDM2, MDM4, COP-1, PIRH-2, ARF, entre outras, levando ao acúmulo proteico de p53 (LEVINE et al. 2006; JOERGER e FERSHT 2008).

Por outro lado, o grupo de amostras com ausência de expressão de p53 apresentou amostras com mutações em *TP53*. As mutações que geram códons de parada prematuros no local da mutação, ou por inserirem ou suprimirem bases alterando assim o código de leitura produzem RNAs mensageiros que podem ser reconhecidos pelo mecanismo de *Nonsense-mediated Decay*, resultando na ausência de expressão de p53 verificada. Já as mutações *missense* que não resultam em acúmulo de expressão proteica indicam que seus mecanismos de ação podem ser substancialmente diferentes, de forma que a ausência de expressão pode refletir um efeito específico destas mutações em particular, que falham em estabilizar a proteína, como já foi relatado anteriormente (STEELE e LANE 2005).

Entre o grupo de tumores com expressão positiva e negativa de p53, a diferença na frequência de mutações entre os grupos era esperada, já que mutações em *TP53*, e particularmente mutações *missense*, são fortemente associadas ao padrão de acúmulo proteico em câncer (RENNINSON et al. 1994).

6.8 ASSOCIAÇÕES CLINICOPATOLÓGICAS

6.8.1 Características tumorais

Existe uma crescente evidência de que a resposta inflamatória possui um importante papel na progressão do CCR, resultado do efeito cumulativo da sequência de alterações genéticas, que leva à expressão de antígenos associados aos tumores, e assim, possivelmente induzindo uma resposta celular antitumoral (DESCHOOLMEESTER et al. 2010). O presente estudo revelou que 59,2% dos tumores onde a necrose foi observada apresentou expressão positiva de p53.

A presença de células necróticas está frequentemente associada a um dano tecidual extensivo, resultado da intensa resposta inflamatória. A necrose é usualmente considerada por ser imunologicamente prejudicial por gerar inflamação além de ser consequência da mesma, por causa da liberação repentina de mediadores pró-inflamatórios, o que promove um processo inflamatório crônico que pode favorecer o crescimento do tumor. Assim, agentes que causam a necrose celular podem ser carcinogênicos. Além disso, a necrose pode ser um fator de pior prognóstico por diminuir a vascularização, impedindo a chegada de medicamentos, por exemplo.

Entre o infiltrado inflamatório no tumor os macrófagos exercem um papel central em muitos tumores sólidos. Estudos pré-clínicos em modelos animais para câncer de mama têm inequivocamente mostrado que macrófagos promovem invasão, angiogênese e metástase, como uma tentativa de resposta anti-tumoral. Estes estudos mostram uma correlação

entre o número de macrófagos, densidade microvascular e redução da sobrevida (DEMARIA et al. 2010).

O termo *budding* denota que na frente de invasão das células tumorais dos adenocarcinomas colorretais, células epiteliais neoplásicas isoladas ou em pequenos agregados se apresentam destacadas das glândulas neoplásicas, migrando em direção ao estroma desmoplásico. A classificação "*budding*" é realizada para grupos de até cinco células tumorais. Esta característica morfológica tem sido amplamente reconhecida como um fator forte e robusto de prognóstico adverso, pois tem sido considerado como uma fase inicial de invasão do tumor, associado tanto com atividade metastática quanto com prognóstico (SOHN et al. 2007).

A migração celular tumoral ocorre como um componente da desdiferenciação observada na margem invasiva. Tais células apresentam protruções citoplasmáticas em contato direto com o tecido intersticial adjacente, como "pés", que são formados durante a migração celular, resultado da reorganização do citoesqueleto após a redução de contato célula-célula e célula-matriz extracelular (PRALL 2007). Assim, os resultados apresentados são representativos deste mecanismo de invasão, já que 90,3% dos tumores que apresentam *budding* possuem padrão de crescimento tumoral de borda infiltrativa ($p= 0,002$).

6.8.2 Polimorfismos

Os dados do presente estudo sugerem que a expressão do alelo Pro72 em tecidos colorretais pode conferir um pior prognóstico, já que a

expressão deste alelo está associada à recidiva tumoral. Indivíduos que expressam o alelo Arg72 apresentaram menor número de recidivas, tumores em estadiamento menos avançado, tumores com padrão de crescimento de borda expansiva a menor frequência de mutações em *TP53*.

A relação entre gênero e o polimorfismo 72Pro>Arg mostrou uma aparente vantagem para as mulheres, porque poucas mulheres apresentaram o alelo Pro72 detectado em seus tumores. Uma comum causa ambiental de dano ao DNA é o cigarro, que contem muitos compostos mutagênicos. Se p53 protege as células do dano ao DNA causado pela exposição destes mutagênicos, o grau de proteção deve variar de acordo com a força e a capacidade da resposta de p53. Assim, indivíduos com uma resposta fraca de p53 pode ser menos capaz de responder apropriadamente ao cigarro, o que pode então afetar a habilidade de promover a apoptose (HANCOX et al. 2009). De fato, evidências epidemiológicas revelam uma associação deste polimorfismo com o cigarro em tumores de pulmão e bexiga (HANCOX et al. 2009; PANDITH et al. 2010). Assim, uma possível explicação para os nossos achados é que os homens tipicamente começam a fumar mais cedo e fumam mais frequentemente do que mulheres (TOBACCO FREE INITIATIVE 2011; MARQUETA et al. 2012). Estes dados foram reproduzidos no presente estudo (64,3% dos fumantes eram homens), apesar de que não foram encontradas diferenças significativas entre o hábito de fumar, o gênero e a expressão de algum alelo especificamente. Além disso, é importante notar que este tipo de dado é derivado de relatos

verbais, de modo que a verdadeira extensão do tabagismo pode ter sido subestimada (HISCOCK et al. 2012).

A interação do tumor com o tecido normal na sua frente de invasão representa uma interface crítica, onde surge a progressão do tumor e disseminação das células tumorais. O padrão de crescimento de borda expansiva, identificado como a presença de margens razoavelmente circunscritas, é frequentemente associado com o desenvolvimento de um infiltrado inflamatório (JASS et al. 1987; ZLOBEC et al. 2009). Em contraste, o padrão de crescimento tumoral de borda infiltrativa é caracterizado pela dissecação generalizada das estruturas teciduais normais, com a perda de uma fronteira nítida entre o tecido tumoral e o tecido normal. O padrão infiltrativo promove a progressão e a disseminação das células tumorais por penetração dos vasos vasculares e linfáticos (JASS et al. 1987; ZLOBEC et al. 2009).

Estudos revelam que o padrão de crescimento do tipo infiltrativo é um fator prognóstico adverso e que pode prever recidiva local (ZLOBEC et al. 2008), enquanto que o padrão de crescimento do tipo expansivo está relacionado com melhor sobrevida (ZLOBEC et al. 2009), dados que são consistentes com os resultados aqui apresentados.

A via de p53 é crítica em mediar a resposta das terapias mais comumente utilizadas. Existem evidências de que o gene *TP53* possui polimorfismos funcionais que afetam a sinalização de p53, e assim, possivelmente alterando o risco de câncer e o resultado clínico (GROCHOLA et al. 2010). Como estes polimorfismos interagem com os fatores de risco já

conhecidos e com a terapêutica ainda precisam ser respondidos. Este estudo fornece evidências do efeito protetor que a expressão do alelo Agr72 exerce sobre a necessidade da quimiorradioterapia pós-cirúrgica.

A terapia adjuvante para CCR consiste em um componente essencial para uma estratégia efetiva de tratamento. Inicialmente a quimioterapia adjuvante para CCR era realizada na etapa pós-cirúrgica seguido da cirurgia curativa para destruir qualquer doença micrometastática remanescente. Hoje os efeitos da quimioterapia para CCR incluem retardar e possivelmente prevenir recidivas após a cirurgia curativa, diminuindo a doença incurável e aumentando significativamente a sobrevida média no cenário de doença metastática avançada (WILKINSON 2007). Apesar do grande número de fatores envolvidos na predição do resultado clínico em pacientes com CCR, o grau histológico do tumor ao diagnóstico permanece a variável de maior importância prognóstica (CASILLAS et al. 1997). Assim, a seleção apropriada dos pacientes que devam receber a terapia adjuvante tem sido baseada no seu risco de recorrência após a cirurgia e nas variáveis conhecidamente adversas ao prognóstico, e a seleção dos agentes sistêmicos tem sido tipicamente baseada na atividade antitumoral dos pacientes com doença metastática de histologia similar (FUCHS e MAYER 1993).

Alguns estudos sugerem que células de indivíduos que possuem o alelo Pro72 irão sofrer menos apoptose em resposta ao dano ao DNA produzido por terapias quando comparado com indivíduos que possuem o alelo Arg72. Este efeito tem sido sugerido por ser causado por redução da

atividade transcricional dos efetores apoptóticos (SULLIVAN et al. 2004). Neste estudo os autores verificaram que o alelo Arg72 com tratamento quimioterápico mostrou-se com uma taxa oito vezes mais de indução da apoptose do que o alelo Pro72 sob os mesmos agentes quimioterápicos.

Estudos utilizando linhagens celulares isogênicas também notaram um potencial apoptótico superior do Arg72 tanto na presença (SULLIVAN et al. 2004), como na ausência (PIM e BANKS 2004; BERGAMASCHI et al. 2006) de quimioterápicos.

Estudos futuros com as variantes de p53 podem ajudar a definir populações de pacientes através das suas habilidades de responder ao estresse, suprimir a formação do tumor e responder às terapias que causam dano ao DNA (GROCHOLA et al. 2010).

Muitos estudos investigaram as associações dos polimorfismos em *TP53* com aumento de risco de desenvolver câncer. A presença da duplicação no intron 3 tem sido associada com um aumento de risco para tumores colorretais esporádicos em um estudo caso-controle e tem sido correlacionado com níveis reduzidos de mRNA de linhagens celulares linfoblastoides (GEMIGNANI et al. 2004). Estudos experimentais têm mostrado que este polimorfismo altera a estrutura *G-quartet* que regula o mecanismo de *splicing* de p53, afetando a taxa de síntese das diferentes isoformas da proteína (PALMERO et al. 2010). Em um recente estudo sobre o PIN3 com famílias brasileiras Li-Fraumeni, e Li-Fraumeni-like, o alelo A2 foi associado com uma grande diminuição da idade de diagnóstico do

primeiro tumor, que ocorreu em média 19 anos depois do que nos indivíduos carreadores do alelo A1 (MARCEL et al. 2009).

O alelo A2 tem sido associado a um aumento de risco de tumores de pulmão (WU et al. 2002), mama (WESTON et al. 1997; POWELL et al. 2002; WANG-GOHRKE et al. 2002), e ovário (RUNNEBAUM et al. 1995; WANG-GOHRKE et al. 1999).

COSTA et al. (2008) encontraram o polimorfismo PIN3 como um real modificador de risco em câncer de mama, tanto para casos esporádicos quanto familiares. Ainda revelaram a associação deste polimorfismo com maior incidência de metástases linfonodais. Esses achados fornecem evidências de que estas variantes estão associadas com um fenótipo tumoral mais agressivo.

HU et al. (2010) sugeriram que o polimorfismo PIN3 pode ser um marcador genético que contribui para a susceptibilidade ao cancer, com potencial que pode ser aplicado na clínica.

Duas meta-análises foram realizadas envolvendo o polimorfismo do exon 4 e mostram diferentes resultados. Uma delas inclui 13 estudos sobre câncer de pulmão, mas falhou em encontrar alguma associação significativa. A outra meta-análise inclui 23 estudos e demonstra que o alelo Pro72 é um fator de risco para desenvolvimento de câncer de pulmão, especialmente em asiáticos e caucasianos. Estudos envolvendo o câncer de mama e de ovário falharam em identificar alguma associação entre os polimorfismos e o risco aumentado para tumores (PETITJEAN et al. 2007).

Estudos envolvendo o CCR também mostram um aumento no risco associado ao polimorfismo do códon 72. Entretanto, os experimentos do estudo não permitem concluir se o aumento no risco verificado deve-se exclusivamente à duplicação de intron 3, que foi encontrado conjuntamente com a variante Pro72, ou se a diferença encontrada ocorreria com os eventos de forma independente (PETITJEAN et al. 2007).

O polimorfismo 72Pro>Arg envolve a troca do códon CCC para CGC, que então passa a ser associado a maior frequência de tumores por ser um alvo de metilação. Assim, este polimorfismo pode apresentar diferente potencial de metilação de acordo as exposições individuais aos carcinógenos causadores de metilação, como o cigarro e outros fatores ambientais, ou ainda, de acordo com a eficiência da maquinaria de demetilação entre os indivíduos (KOUIDOU et al. 2006).

Outros estudos mostram que a variante polimórfica do códon 72 se mostra como um modificador intragênico do comportamento mutante de p53. O alelo Arg72 foi encontrado como preferencialmente mutado em tumores que eram heterozigóticos Arg/Pro. Além disso, o alelo Arg72 se mostrou mais potente em neutralizar a apoptose induzida por p73 e em cooperar com EJ-Ras na transformação das células. Outros estudos envolvendo tumores colorretais, de pulmão e de cabeça e pescoço também mostraram que indivíduos heterozigóticos Arg/Pro também apresentavam o alelo Pro preferencialmente perdido e o alelo Arg preferencialmente mutado (PETITJEAN et al. 2007).

KIM et al. (2009) demonstraram que pacientes de genótipos Arg/Pro e Pro/Pro de *TP53* códon 72 foram significativamente correlacionados com menor taxa de resposta à quimioterapia quando comparados ao genótipo Arg/Arg na análise de regressão logística (35,7 vs 66,7%, $P= 0,019$). Na análise multivariada para sobrevida, os dados também mostraram que o tempo de progressão para os pacientes com genótipo Arg/Pro e Pro/Pro se mostraram piores do que para os pacientes com genótipo Arg/Arg (OD= 3,056, $P= 0,047$). A conclusão do estudo é de que o polimorfismo do códon 72 de *TP53* é um fator preditivo de resposta à quimioterapia e que se correlaciona com o tempo de progressão de pacientes com tumores gástricos avançados.

Os dados originados do presente projeto constituem-se no primeiro relato em literatura que descreve o padrão de expressão do SNP no códon 72 do gene *TP53* em CCR, e indicam que este SNP está associado a este tipo tumoral.

BOLDRINI et al. (2008) analisaram o efeito combinado dos polimorfismos 72Pro>Arg e PIN3 em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células. Os autores encontraram evidências de efeitos relacionados a dosagem desse polimorfismo; pacientes com até 2 alelos variantes apresentavam a tendência de exibir um prognóstico melhor quando comparados aos pacientes que apresentavam três ou quatro variantes.

Assim, o impacto das mutações em *TP53* pode ser diferente de acordo com o haplótipo onde essas mutações ocorrem, assim como com o haplótipo do alelo selvagem residual. Além disso, é possível que outros

fatores como a dieta e o estilo de vida, o que não é completamente controlado na maioria dos estudos, possam impactar na associação e, assim, explicar a falta de associação direta encontrada em alguns estudos sobre este polimorfismo e CCR (TANG et al. 2010).

6.9 EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Correlações entre a variação do DNA e diferenças humanas fenotípicas, como a susceptibilidade a certas doenças, ainda não são bem entendidas. Os polimorfismos podem contribuir para a variação observada dos complexos traços humanos, mas suas relativas contribuições permanecem indeterminadas.

Estudos que buscaram analisar a expressão diferencial dos alelos de heterozigotos mostraram que aproximadamente 50% apresentam diferenças na expressão dos alelos (PANT et al. 2006). A variação alélica na expressão dos genes é de particular interesse por causa da potencial contribuição desta variação nos traços herdados. Assim, entender o grau, a estrutura e os padrões das variações de expressão gênica é de central importância na pesquisa biomédica. Células podem ter diferentes propriedades dependendo se um ou ambos os alelos estão sendo expressos, ou ainda, qual dos dois alelos está sendo expresso nos heterozigotos. Esta variabilidade é alcançada sem alterar a sequência de DNA, o que pode ser vantajoso pensando evolutivamente. Até agora a expressão alélica tem sido estudada principalmente no contexto de polimorfismos regulatórios, o que pode

fornecer a base genética da variação humana, tendo um papel crucial na variação fenotípica e susceptibilidade as doenças.

Diferenças de expressão entre alelos do mesmo gene têm sido observadas, contribuindo para a variação fenotípica entre indivíduos. Estudos mostram que existem variações alélicas de expressão em certos genes de indivíduos heterozigotos (TAN et al. 2008; MILANI et al. 2009; PINHEIRO et al. 2010). GIMELBRANT et al. (2007) mostraram que 300 de 4000 genes (8%) adquiriram expressões monoalélicas aleatórias subclonando linhagens celulares de linfoblastos.

A expressão monoalélica (*monoallelic expression* – MAE) é definida pela expressão de um gene que fica restrita a um alelo na presença de um genoma diplóide e heterozigoto. A expressão diferencial (*differential allele-specific expression* - DAE) é definida por um aumento de expressão de um alelo específico, ao invés da completa expressão monoalélica.

Existe uma considerável variação natural de expressão gênica entre a população e entre indivíduos. A expressão monoalélica ocorre naturalmente em alguns genes, como aqueles que sofrem exclusão alélica, como as imunoglobulinas e receptores olfativos, como os genes que sofrem *imprinting* entre alelos maternos e paternos, ou ainda como os genes ligados ao cromossomo X que sofre inativação nas mulheres (CHEUNG et al. 2008).

Alguns estudos com tecidos normais, tumorais e linhagens celulares utilizando plataformas como Affymetrix e Illumina mostraram que a MAE e a DAE são relativamente frequentes (5-20%, 10-50%, respectivamente), dependendo no número de genes incluindo nos estudos e da forma de

seleção dos genes (YAN et al. 2002; BRAY et al. 2003; LO et al. 2003; PASTINEN et al. 2004; GIMELBRANT et al. 2007; TAN et al. 2008; SERRE et al. 2008; MILANI et al. 2009). Estes dados revelaram a MAE/DAE de alguns genes e forneceram mecanismos que podem explicar diferenças fenotípicas entre indivíduos, assim como a susceptibilidade de algumas doenças, ou mesmo o seu curso de evolução. Entretanto, a maioria dos estudos utilizam linhagens celulares ou material germinativo dos pacientes, sendo poucos utilizando tumores primários. O mecanismo e as consequências funcionais da MAE nos tecidos tumorais nunca foram estudados, assim, o papel da MAE na tumorigênese permanece obscuro.

O desequilíbrio de expressão alélica é influenciado tanto por cis-fatores e trans-moduladores. Apesar das diferenças de expressão herdáveis sugerirem que a influência de mecanismos trans-ativadores serem mais importantes, os cis-fatores podem explicar até 35% das diferenças entre indivíduos (PASTINEN e HUDSON 2004; MILANI et al. 2007). A capacidade de discriminação específica entre dois alelos pode revelar mudanças no controle epigenético, já que ambos os alelos são afetados pelos mesmos fatores de transcrição, ainda que difiram em elementos cis-ativadores. O efeito de variações regulatórias em humanos é desconhecido. O *splicing* alternativo de pré-mRNAs é outro possível mecanismo para variações alélicas de expressão de um gene.

Não está claro se a diferença de expressão entre dois alelos por si é relevante ou se a soma do nível de expressão é importante. Além disso, permanece confuso como que pequenos desbalanços de expressão

poderiam causar um fenótipo. Entretanto, existem vários precedentes de que diferenças de expressões sutis podem ter um impacto significativo no fenotípico.

Devido ao fato de que se espera que os SNPs sejam menos deletérios do que as mutações que inativam ou ativam completamente a função, é muito útil procurar por SNPs candidatos em genes que demonstram haploinsuficiência. Isso inclui os genes que tenham um fenótipo cancer-específico, quando o indivíduo tem apenas um alelo selvagem, a provavelmente, metade da atividade e nível da proteína. Interessantemente, os genes *TP53*, *MDM2* e *MDM4* são genes haploinsuficientes em camundongos e o *TP53* o é em humanos (HIRSHFIELD et al. 2010).

Este é o primeiro relato de expressão monoalélica do códon 72 de *TP53* em CCR, e revela que os heterozigotos preferencialmente expressam o alelo Pro72, o que sugere que este alelo pode ser seletivamente ativado durante o desenvolvimento do CCR. O único estudo que avaliou a expressão do códon 72 de *TP53* também mostrou que tumores de mama de chinesas heterozigotas preferencialmente expressavam o alelo Pro72 ou expressavam ambos os alelos (SIDDIQUE et al. 2005).

Dessa maneira, surge a possibilidade de que o alelo Pro72 pode não estar funcionalmente envolvido, mas que sua expressão se correlaciona com a tumorigênese. Surgem importantes questões sobre por que, quando e como as células escolhem e toleram o monoallelismo, e se essa “hemizigose funcional” pode fornecer alguma vantagem não conhecida. Assim, novos estudos são necessários para examinar o papel do alelo Pro72 na

carcinogênese e para avaliar se outros modificadores genéticos podem estar envolvidos.

A expressão dos diferentes polimorfos de p53 é seletivamente regulada em indivíduos heterozigotos para o polimorfismo 72Pro>Arg. A “silenciamento” do alelo Arg72 parece ter um efeito negativo em relação ao câncer, já que ele atua melhor na indução da apoptose. As diferenças na expressão dos heterozigotos identificadas quando comparados os resultados do sequenciamento do cDNA e do gDNA resultaram num aumento da frequência alélica do alelo Pro72 nesta população. Assim, o status da expressão dos polimorfos de p53, ao invés do status genotípico, fornece indicações mais apropriadas no processo tumoral. A extensão da MAE em CCR e sua significância biológica e clínica ainda são desconhecidas. Este estudo mostrou MAE de *TP53* em CCR. Uma exploração maior de genes relevantes pode contribuir para um melhor entendimento sobre a relação deste mecanismo e tumores.

WALKER et al. (2012) mostraram, clinicamente, que a MAE em *TP53* existe apenas em tumores com mutação e aumenta a agressividade do tumor, sugerindo que a MAE é tumor e gene específica, e pode estar associada com a progressão tumoral.

Finalmente, estudos *genome-wide* podem identificar novos genes com MAE envolvidos com tumores. Estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos que governam a MAE e para permitir o entendimento do papel da MAE no desenvolvimento da doença.

Apesar de ter sido feito com uma pequena amostra, os resultados apresentados fornecem uma indicação para futuros estudos sobre variações alélicas de expressão gênica de *TP53* em CCR. O maior entendimento dos padrões de expressão irá fornecer dados valiosos sobre a diversidade fenotípica em humanos.

Como o sequenciamento pelo método de Sanger não normaliza para quantificar a expressão relativa dos alelos, iniciadores foram desenhados para o sequenciamento de cDNA e gDNA através do pirosequenciamento, que será realizado futuramente.

6.10 HRM

Existem algumas técnicas utilizadas para detectar mutações, cada uma com vantagens e desvantagens particulares. A técnica de HRM já utilizada para rastreamento de alterações somáticas nos genes *KIT*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2* e *KRAS* (WILLMORE-PAYNE et al. 2005, 2006; NOMOTO et al. 2006; KRYPUY et al. 2006), incluindo *TP53* (KRYPUY et al. 2007).

No presente estudo, pensando na proposta do uso da técnica de HRM, seria sequenciado um maior número de amostras do que o número de variantes reais, o que nos permite concluir que a técnica gera vários falsos positivos, mas dificilmente deixa de identificar as amostras que verdadeiramente possuem alguma alteração na sequência amplificada. O gene *TP53* é relativamente pequeno, com intros curtos entre os exons, de forma a possibilitar a análise de mais de um exon na mesma reação,

diminuindo o número de reações de PCR que seriam necessárias previamente ao sequenciamento. Já para a análise de HRM, são necessários fragmentos de até 250 pb, de forma que cada exon deve ser analisado separadamente. Além disso, é preciso um número muito maior de amostras que justifique o uso do HRM para rastreamento de alterações, para que seja mais rápido e barato do que o sequenciamento direto de todo o gene. Assim, apesar da técnica de HRM ter sido padronizada para que fosse feito um rastreamento das mutações em *TP53* e ter apresentado resultados satisfatórios, ela seria mais bem utilizada para genes com muitos exons e introns muito longos entre eles, para os quais o sequenciamento de toda a região codificante consumiria muito tempo e dinheiro, bem como para o rastreamento de mutações que ocorram em *hotspots* de alguns genes, o que permite o rastreamento de várias amostras em uma única reação para a mesma alteração. Assim, para o gene *TP53* o sequenciamento direto de toda a sua região codificante é menos oneroso e laborioso.

7 CONCLUSÕES

- 1) Houve forte associação entre presença de mutação e o acúmulo proteico nos tumores, permitindo identificação da estabilização proteica que leva a este acúmulo no núcleo;
- 2) A frequência de mutações de *TP53* em CCR é semelhante aos achados de literatura. A frequência mutações relacionadas ao mecanismo de *splicing* em *TP53* é superior aos achados de literatura;
- 3) Observou-se um caso de mutação sinônima no gene *TP53* que se relaciona ao mecanismo de *splicing*;
- 4) A análise da sequência de todo o transcrito do gene *TP53* foi importante para determinar o padrão de alterações e a contribuição específica de cada alelo expresso, pois existe um desbalanço alélico evidenciado no códon 72 de *TP53*. O favorecimento da expressão do alelo Pro72 no tumor está associado com pior comportamento tumoral;
- 5) A expressão proteica positiva de p53 e a mutação de *TP53* estão associados à características de maior agressividade tumoral. O SNP no códon 72 do gene *TP53* pode ter um papel na progressão do CCR. O polimorfismo do intron 3 do gene *TP53* sugere associação com recidiva tumoral;
- 6) A técnica de HRM permite a identificação das variantes, entretanto, gera muitos falsos positivos. O rastreamento é factível, porém o sequenciamento direto de toda a região codificante de *TP53* é menos laborioso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alsner J, Yilmaz M, Guldborg P, et al. Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3923-31.

Arai N, Nomura D, Yokota K, et al. Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. **Mol Cell Biol** 1986; 6:3232-9.

Ashktorab H, Brim H, Al-Riyami M, et al. Sporadic Colon Cancer: Mismatch Repair Immunohistochemistry and Microsatellite Instability in Omani Subjects. **Dig Dis Sci** 2008; 53:2723-31.

Auclair J, Busine MP, Navarro C, et al. Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. **Hum Mutat** 2006; 27:145-54.

Balic M, Pichler M, Strutz J, et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. **J Mol Diagn** 2009; 11:102-8.

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. **J Med Genet** 2005; 42:737-48.

Beckman G, Birgander R, Sjalander A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum Hered** 1994; 44:266-70.

Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. **Nat Gen** 2006; 38:1133-41.

Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:3171-5.

Béroud C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. **Hum Mutat** 2003; 21:176-81.

Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, et al: Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. **Cancer Invest** 2008; 26:168-72.

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Dev** 2005; 19:2122-37.

Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. **Br J Cancer** 2007; 97:277-82.

Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ, et al. Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. **Hum Genet** 2003; 113:149-53.

Cann HM, de Toma C, Cazes L, et al. A human genome diversity cell line panel. **Science** 2002; 122:261-2.

Casillas S, Pelley RJ, Milsom JW. Adjuvant therapy for colorectal cancer: present and future perspectives. **Dis Colon Rectum** 1997; 40:977-92.

Chao HK, Hsiao KJ, Su TS. A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. **Hum Genet** 2001; 108:14-9.

Cheung VG, Bruzel A, Burdick JT, et al. Monozygotic twins reveal germline contribution to allelic expression differences. **Am J Hum Genet** 2008; 82:1357-60.

Chung CC, Chanock SJ. Current status of genome-wide association studies in cancer. **Hum Genet** 2011; 130:59-78.

Clancy S. RNA splicing: introns, exons and spliceosome. **Nat Educ** 2008; 1(1).

Coggi G, Bosari S, Roncalli M, et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. **Cancer** 1997; 79:425-32.

Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. **J Pathol** 1997; 182:307-10.

Costa S, Pinto D, Pereira D, et al. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. **BMC Cancer** 2008; 29:8-32.

Courtois S, Verhaegh G, North S, et al. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. **Oncogene** 2002; 21:6722-8.

Czech A, Fedyunin I, Zhang G, et al. Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations. **Mol Biosyst** 2010; 6:1767-72.

da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Fam Cancer** 2010; 9:563-70.

Dearth LR, Qian H, Wang T, et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. **Carcinogenesis** 2007; 28:289-98.

Demaria S, Pikarsky E, Karin M, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **J Immunother** 2010; 33:335-51.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. **Hum Genet** 2001; 109:121-24.

Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. **BMC Immunol** 2010; 12:11-9.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acid Res** 2009; 37:e67.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res** 1994; 54:1169-74.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, et al. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. **Cancer Res** 1988; 48: 1159-61.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; 127:2893-917.

Filippini G, Griffin S, Uhr M, et al. A novel flow cytometric method for the quantification of p53 gene expression. **Cytometry** 1998; 31:180-6.

Flaman JM, Waridel F, Estreicher A, et al. The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. **Oncogene** 1996; 15:813-8.

Franco ED, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.3-22.

Fuchs CS, Mayer RJ. Adjuvant Chemotherapy for Colon and Rectal Cancer. **Semin Radiat Oncol** 1993; 3:29-41.

Gatalica Z, Torlakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. **Fam Cancer** 2008; 7:15-26.

Gemignani F, Moreno V, Landi S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. **Oncogene** 2004; 23:1954-6.

Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. **Mol Cell Biol** 2004; 24:7987-97.

Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. **Genes Dev** 1998; 12:2973-83.

Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, et al. Widespread monoallelic expression on human autosomes. **Science** 2007; 318:1136-40.

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, et al. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science** 1985; 228:187-90.

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. **Science** 1974; 185:862-4.

Grochola LF, Zeron-Medina J, Mériaux S, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001032.

Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. **Curr Opin Oncol** 1995; 7:76-82.

Hancox RJ, Poulton R, Welch D, et al. Accelerated decline in lung function in cigarette smokers is associated with TP53/MDM2 polymorphisms. **Hum Genet** 2009; 126:559-65.

Hanski C, Tiecke F, Hummel M, et al. Low frequency of p53 gene mutation and protein expression in mucinous colorectal carcinomas. **Cancer Lett** 1996; 103:163-70.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N Engl J Med** 1993; 329:1318-27.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene** 2005; 24:2899-908.

Hirshfield KM, Rebbeck TR, Levine AJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. **J Oncol** 2010; 2010:297671.

Hiscock R, Bauld L, Amos A, et al. Socioeconomic status and smoking: a review. **Ann N Y Acad Sci** 2012; 1248:107-23.

Hollstein M, Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. **J Pathol** 2010; 220:164-73.

Holmila R, Fouquet C, Cadranet J, et al. Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature. **Hum Mutat** 2003; 21:101-2.

Hu Z, Li X, Qu X, et al. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. **Carcinogenesis** 2010; 31:643-7.

Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. **Hum Mutat** 2003; 21:271-6.

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. **Nature** 2003; 426:789-96.

Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. **Lancet** 1987; 1:1303-6.

Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. **Annu Rev Biochem** 2008 77:557-82.

Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8424-9.

Kim JG, Sohn SK, Chae YS, et al. TP53 codon 72 polymorphism associated with prognosis in patients with advanced gastric cancer treated with paclitaxel and cisplatin. **Cancer Chemother Pharmacol** 2009; 64:355-60.

Komar AA. A pause for thought along the co-translational folding pathway. **Trends Biochem Sci** 2009; 34:16-24.

Kouidou S, Malousi A, Maglaveras N. Methylation and repeats in silent and nonsense mutations of p53. **Mutat Res** 2006; 599:167-77.

Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:295.

Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. **BMC Cancer** 2007; 7:168-81.

Lamolle G, Marin M, Alvarez-Valin F. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. **Mutat Res** 2006; 600:102-12.

Lane DP. Cancer, p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358: 15-6.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death Differ** 2006; 13:1027-36.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. **Nature** 1991; 351:453-6.

Lim DHK, Maher ER. Genomic imprinting syndromes and cancer. In: Zdenko H, Toshikazu U, editors. **Advances in genetics**. Academic Press; 2010. p. 145–75.

Lima JM, Serafim PV, Silva ID, et al. Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. **Arq Gastroenterol** 2006; 43:8-13.

Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. **Neoplasia** 2000; 2:208-25.

Lo HS, Wang Z, Hu Y, et al. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. **Genome Res** 2003; 13:1855-62.

Mammano E, Belluco C, Bonafé M, et al. Association of p53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression. **Eur J Surg Oncol** 2009; 35:415-9.

Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, et al. TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. **J Med Genet** 2009; 46:766-72.

Marcel V, Hainaut P. p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:391-406.

Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. **Cell Death Differ** 2011; 18:1815-24.

Marin MC, Jost CA, Brooks LA, et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. **Nat Genet** 2000; 25:47-54.

Marin M. Folding at the rhythm of the rare codon beat. **Biotechnol J** 2008; 3:1047-57.

Marqueta A, Nerín I, Jiménez-Muro A, et al. Predictors of outcome of a smoking cessation treatment by gender. **Gac Sanit** 2012; 23.

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **EMBO J** 1984; 3:3257-62.

Matlashewski G, Pim D, Banks L, et al. Alternative splicing of human p53 transcripts. **Oncogene Res** 1987; 1:77-85.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 1999; 18:7621-36.

Milani L, Gupta M, Andersen M, et al. Allelic imbalance in gene expression as a guide to cis-acting regulatory single nucleotide polymorphisms in cancer cells. **Nucleic Acids Res** 2007; 35:e34

Milani L, Lundmark A, Nordlund J, et al. Allele-specific gene expression patterns in primary leukemic cells reveal regulation of gene expression by CpG site methylation. **Genome Res** 2009; 19:1-11.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Monteiro Santos EM, Valentin MD, Carneiro F, et al. Predictive models for mutations in mismatch repair genes: implication for genetic counseling in developing countries. **BMC Cancer** 2012; 9:12-64.

Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. **Cancer** 1975; 36:2251-70.

Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:292.

Nicholls CD, McLures KG, Shields MA, et al. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. **J Biol Chem** 2002; 277:12937-45.

Nomoto K, Tsuta K, Takano T, et al. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high resolution melting analysis. **Am J Clin Pathol** 2006; 126:608-15.

O'Farrell TJ, Ghosh P, Dobashi N, et al. Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression. **Cancer Res** 2004; 64:8199-207.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001008.

Olschwang S, Laurent-Puig P, Vassal A, et al. Characterization of a recurrent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. **Hum Genet** 1991; 86:369-70.

Orban TI, Olah E. Purifying selection on silent sites - a constraint from splicing regulation? **Trends Genet** 2001; 17:252-3.

Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P, et al. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:64-9.

Paluszkiewicz P, Berbeć H, Pawłowska-Wakowicz B, et al. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. **Cancer Detect Prev** 2004; 28:252-9.

Pandith AA, Shah ZA, Khan NP, et al. Role of TP53 Arg72Pro polymorphism in urinary bladder cancer predisposition and predictive impact of proline related genotype in advanced tumors in an ethnic Kashmiri population. **Cancer Genet Cytogenet** 2010; 203:263-8.

Pant PV, Tao H, Beilharz EJ, et al. Analysis of allelic differential expression in human white blood cells. **Genome Res** 2006; 16:331-9.

Pastinen T, Sladek R, Gurd S, et al. A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. **Physiol Genomics** 2004; 16:184-193.

Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum. Mol Genet* 2006; 1:R9-16.

Pastinen T, Hudson TJ. Cis-acting regulatory variation in the human genome. **Science** 2004; 306:647-50.

Perfumo C, Bonelli L, Menichini P, et al. Increased risk of colorectal adenomas in Italian subjects carrying the p53 PIN3 A2-Pro72 haplotype. **Digestion** 2006; 74:228-35.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat** 2007; 28:622-9.

Phang BH, Chua HW, Li H, et al. Characterization of novel and uncharacterized p53 SNPs in the Chinese population--intron 2 SNP co-segregates with the common codon 72 polymorphism. **PLoS One** 2011; 6:e15320.

Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer** 1999; 80:1968-73.

Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. **Int J Cancer** 2004; 108:196-9.

Pinheiro H, Bordeira-Carriço R, Seixas S, et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. **Hum Mol Genet** 2010; 19:943–52.

Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, et al. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. **Carcinogenesis** 2002; 23:311-5.

Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. **Histopathology** 2007; 50:151-62.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. **J Pathol** 1999; 187:112-26.

Renninson J, Baker BW, McGown AT, et al. Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in epithelial ovarian cancer using polyclonal antibody CMI: correlation with histopathology and clinical features. **Br J Cancer** 1994; 69:609-12.

Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:7555-9.

Runnebaum IB, Tong XW, König R, et al. p53-based blood test for p53PIN3 and risk for sporadic ovarian cancer. **Lancet** 1995; 345:1250.

Schmid M, Haaf T, Grunert D. 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. **Hum Genet** 1984; 67: 257-63.

Senapathy P, Shapiro MB, Harris ML. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. **Meth Enzymol** 1990; 183:252-78.

Serre D, Gurd S, Ge B, et al. Differential allelic expression in the human genome: a robust approach to identify genetic and epigenetic cis-acting mechanisms regulating gene expression. **PLoS Genet** 2008; 29:e1000006.

Szybka M, Zakrzewska M, Rieske P, et al. cDNA sequencing improves the detection of P53 missense mutations in colorectal cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:278.

Schadt EE, Monks SA, Drake TA, et al. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. **Nature** 2003; 422:297-302.

Scherhammer AS, Ogino S, Fuchs CS. Folate and vitamin B6 intake and risk of colon cancer in relation to P53 mutational status. **Gastroenterology** 2008; 135:770-80.

Shi H, Tan SJ, Zhong H, et al. Winter temperature and UV are tightly linked to genetic changes in the p53 tumor suppressor pathway in Eastern Asia. **Am J Hum Genet** 2009; 84:534-41.

Siddique MM, Balram C, Fiszler-Maliszewska L, et al. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:2245-52.

Sohn DK, Chang HJ, Park JW, et al. Histopathological risk factors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma of pedunculated or semipedunculated type. **J Clin Pathol** 2007; 60:912-5.

Soussi T, Béroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:233-40.

Stadler ZK, Vijai J, Thom P, et al. Genome-wide association studies of cancer predisposition. **Hematol Oncol Clin North Am** 2010; 24:973-96.

Steele RJ, Lane DP. P53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. **Surgeon** 2005; 3:197-205.

Stephen CW, Helminen P, Lane DP. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. **J Mol Biol** 1995; 248:58-78.

Storey JD, Madeoy J, Strout JL et al. Gene-expression variation within and among human populations. **Am J Hum Genet** 2007; 80:502-9.

Sullivan A, Syed N, Gasco M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. **Oncogene** 2004; 23:3328-37.

Tan AC, Fan JB, Karikari C, et al. Allele-specific expression in the germline of patients with familial pancreatic cancer: an unbiased approach to cancer gene discovery. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:135-44.

Tang NP, Wu YM, Wang B, Ma J. Systematic review and meta-analysis of the association between P53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol** 2010; 36:431-8.

The International HapMap Consortium. The International HapMap project. **Nature** 2003; 426:789-96.

Tobacco Free Initiative (TFI). **WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco**. Geneva: World Health Organization; 2011.

Valentin MD, da Silva FC, dos Santos EMM, et al. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. **Fam Cancer** 2011; 10:641-7.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, et al. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. **J Immunol Methods** 1992; 151:237-44.

Vossen RH, Aten E, Roos A, et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. **Hum Mutat** 2009; 30:860-6.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:275-83.

Waldman YY, Tuller T, Sharan R, Ruppin E. TP53 cancerous mutations exhibit selection for translation efficiency. **Cancer Res** 2009; 69:8807-13.

Walker C, Robertson LJ, Myskow MW, et al. p53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. **Br J Cancer** 1994; 70:297-303.

Walker EJ, Zhang C, Castelo-Branco P, et al. Monoallelic expression determines oncogenic progression and outcome in benign and malignant brain tumors. **Cancer Res** 2012; 72:636-44.

Wang-Gohrke S, Rebbeck TR, Besenfelder W, et al. p53 germline polymorphisms are associated with an increased risk for breast cancer in German women. **Anticancer Res** 1998; 18:2095-9.

Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, et al. Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. **Br J Cancer** 1999; 81:179-83.

Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, et al. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. **Pharmacogenetics** 2002; 12:269-72.

Weston A, Pan CF, Ksieski HB, et al. p53 haplotype determination in breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1997; 6:105-12.

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:95-107.

Wilkinson NW. Adjuvant chemotherapy for colorectal cancer-new perspectives for effective treatment. **US Gastroenterol Hepatol Rev** 2007; 1:91-3.

Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, et al. Human malignant melanoma: detection of BRAF and c-kit activating mutations by high resolution amplicon melting analysis. **Hum Pathol** 2005; 36:486-93.

Willmore-Payne C, Holden JA, Layfield LJ. Detection of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2 activating mutations in lung adenocarcinoma by high-resolution melting amplicon analysis: correlation with gene copy number, protein expression, and hormone receptor expression. **Hum Pathol** 2006; 37:755-63.

Wolf D, Harris N, Goldfinger N, et al. Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. **Mol Cell Biol** 1985; 5:127-32.

Wu X, Zhao H, Amos CI, et al. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:681-90.

Yan H, Yuan W, Velculescu VE, et al. Allelic variation in human gene expression. **Science** 2002; 297:1143.

Zlobec I, Baker K, Minoo P, et al. Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups. **Cancer** 2009; 115:4021-9.

Zlobec I, Terracciano LM, Lugli A. Local recurrence in mismatch repair-proficient colon cancer predicted by an infiltrative tumor border and lack of CD8+tumor-infiltrating lymphocytes. **Clin Cancer Res** 2008; 14:3792-7.

Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados - CCR

PACIENTE: _____

RGH: _____

NATURALIDADE: _____

ESCOLARIDADE: _____

PROFISSAO: _____

DATA DE ADMISSAO: ____ / ____ / ____ [] dt_adm

DATA NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ [] dt_nasc

IDADE AO DIAGNOSTICO: _____ [] idd_diag

SEXO: 1- FEMININO () 2 – MASCULINO () 3 – IGNORADO () [] sexo

RAÇA: 1-BRANCA () 2-NEGRA () 3-AMARELA () 4-OUTRAS () [] raça

TABAGISMO 1-SIM () 2-NAO () [] tab

PESO: _____ [] peso

ALTURA: _____ [] alt

TUMOR PRIMARIO: [] tu_prim

1- COLON PROX (D+T)

2- COLON DISTAL (E+S)

3- RETO

9- IGNORADO

DATA DA CIRURGIA: _____

CIRURGIA: _____ [] cir

1- COLECTOMIA PARCIAL

2- COLECTOMIA TOTAL

3- PCT

4- RA/APP

5- EXANTERAÇÃO

6- RESSECÇÃO LOCAL ENDOSCOPICA

7- RESSECÇÃO ABERTA TRANSANAL

8- OUTRA

9- IGNORADO

ESTADIO T:

T0 (0) T1 (1) T2 (2) T3 (3) T4 (4) TX (9) [] estadio t

ESTADIO N :

N0 (0) N1 (1) N2 (2) NX (9) [] estadio n

ESTADIO M :

M0 (0) M1 (1) - retroperitoneo M1 (2) – figado M1 (3) – pulmão
M1 (4) – outro (_____) MX (9) [] estadio m

GRUPOS POR ESTADIOS

O (0) I (1) IIA (2) IIB (3) IIIA (4) IIIB (5) IIIC (6) IV (7) [] gr_estadio

NUMERO DE LINFONODOS DISSECADOS [] linf_dis _____

888 () NAO REALIZADO 999 () IGNORADO

NUMERO DE LINFONODOS POSITIVOS [] linf_pos _____

888 () NAO REALIZADO 999 () IGNORADO

RESSECÇÃO DE METASTASE [] res_meta

(0) SEM METASTASE (1) SIM (2) NAO (9) IGNORADO

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO [] grau_dife

(1) BEM (2) MODERADAMENTE (3) POUCO
(4) INDIFERENCIADO (8) OUTRO (9) IGNORADO

CONFIGURAÇÃO DO TUMOR [] conf_tu

(1) EXOFITICA (2) ENDOFITICA (3) DIFUSA (4) OUTRAS
(9) IGNORADO

DIMENSAO DO TUMOR: _____ 999 – IGNORADA [] dim_tu

BORDA DE INVASAO: [] borda_inv

(1) INFILTRATIVA (2) EXPANSIVA (9) IGNORADO

INFITRADO TIPO CROHN: [] inf_crohn

(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

INFILTRADO LINFOCITARIO PERITUMORAL inf_linfoperi
(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

DESMOPLASIA desmo
(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

INVASAO VASCULAR SANGUINEA invasc_sang
(0) V0 (1)V1 (2) V2 (9) Vx

INVASAO VASCULAR LINFATICA invasc_linf
(0) L0 (1)L1 (2) L2 (9) Lx

INVASAO PERINEURAL inv_peri
(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

MARGENS ANATOMOPATOLOGICAS marg_anatomo
(0) não operado (1) livres (2) comprometida (9) ignorado

MARGEM DISTAL: _____ mm margem_dis
888-COLON E SIGMOIDE 999- IGNORADA

MARGEM RADIAL: _____ mm margem_rad
888-COLON E SIGMOIDE 999- IGNORADA

TIPO HISTOLOGICO: tipo_histo

- 1- ADENOCARCINOMA TUBULAR
- 2- ADENOCA C/ DIF MUCINOSA ATE 50%
- 3- ADENOCA MUCINOSO
- 4- DIFERENCIACAO NEUROENDOCRINA
- 5- CEC
- 6- CRIBIFORME (<50%)
- 7-ADENOESCAMOSO
- 8- INIFERENCIADO
- 9- PEQUENAS CELULAS
- 10-ANEL DE SINETE

11-MEDULAR

12- OUTROS

99 - IGNORADO

ADENOMA ASSOCIADO

[] adeno_asso

(0) SIM (1) NAO (9) IGNORADO

ADJUVANCIA

[] adjuvancia

(0) AUSENTE (1) QT (2) RT (9) IGNORADO

QUIMIOTERAPICOS ADJUVANTES

[] qt_adj

(0)SEM QT (1)5-FU/LV (2)FOLFOZ/FLOX

(3)CAPECITABINA

(4)BEVACIZUMAB (8)OUTROS (9) IGNORADO

ESTADO DA QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE

[] est_qtadj

(0) SEM QT (1) INCOMPLETA (2) COMPLETA

PRIMEIRA RECIDIVA:

[] prim_rec

1- PELVICA

2- PAREDE ABDOMINAL

3-PERITONEO

4- ANASTOMOSE

5- LINFONODO

6- FIGADO

7-PULMAO

8-OSSO

9- IGNORADO

10-OUTRO LOCAL

DATA DA RECIDIVA POS CIRURGIA: _____

DATA DA ULTIMA INFORMACAO: _____

ESTADO ATUAL

[] e_atual

1 - VIVO SEM DOENÇA ()

2 – VIVO COM DOENÇA ()

3- MORTE POR CANCER ()

4 – MORTE POR OUTRAS CAUSAS ()

5 – PERDIDO DE VISTA ()

NUMERO DO BLOCO ANATOMOPATOLOGICO

AP DA BIOPSIA _____

AP DA PEÇA COLORRETAL _____

AP OUTRA PEÇA _____

AP OUTROS _____

Anexo 2 - Protocolo para Imunoistoquímica

- 1) Desparafinização:
 - a) 3 banhos em xilol por 5 minutos
 - b) 4 banhos rápidos de etanol 100%
 - c) lavar em água corrente por 5 minutos

- 2) Recuperação antigênica

Tampão Citrato pH 6,0

- Panela de Pressão:
 - a. colocar lâminas na cuba de plástico e adicionar tampão até cobri-las
 - b. colocar 1500 ml de água destilada na panela
 - c. programar a panela para 25 minutos ou quando começar a pressão deixar por 15 minutos
 - d. desligar a panela (depois que acabar a pressão), retirar a cuba e esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente
 - e. após a recuperação, lavar em água corrente por 5 minutos. Secar as lâminas rapidamente com papel filtro e circular os cortes com caneta de silicone.

- 3) Bloqueio da peroxidase endógena

- a. incubar as amostras em H₂O₂ 10 vol por 3 vezes durante 5 minutos
- b. lavar em água corrente por 5 minutos

- 4) Bloqueio de proteínas inespecíficas (para evitar ou reduzir o background)

- a. -adicionar 100 µl da solução Protein Block Serum-Free (Dako)
- b. incubar por 20 minutos em câmara úmida
- c. retirar solução

- 5) Incubação com anticorpo primário

- a. diluir o anticorpo com Antibody Diluent with Background Reducing Component (Dako). Se o intervalo entre a diluição e o uso for longo, cobrir com papel alumínio e deixar na geladeira
- b. adicionar 100 µl do anticorpo diluído sobre o corte
- c. incubar por 2 horas em câmara úmida
- d. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- e. lavar as lâminas em PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos

6) Amplificação (sistema polímero) – Advance HRP Link (Dako)

- a. adicionar 100 µl de Advance HRP Link (tubo transparente)
- b. incubar por 30 minutos em câmara úmida
- c. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- d. lavar as lâminas separadamente com PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos
- e. adicionar 100 µl de Advance HRP Link (tubo marron)
- f. incubar por 30 minutos em câmara úmida
- g. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- h. lavar as lâminas em PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos

7) Coloração

- a. diluir DAB 1:50
- b. adicionar 100 µl de DAB sobre o corte
- c. retirar o excesso de DAB em água destilada
- d. lavar em água corrente por 5 minutos
- e. incubar em hematoxilina por 1 minuto
- f. lavar em água corrente para retirar o excesso de hematoxilina
- g. passar rapidamente pelo diferenciador
- h. lavar em água corrente por 5 minutos

8) Montagem das lâminas

- a. 4 banhos rápidos em etanol 100%
- b. banho rápido em etanol 100%+xilol
- c. 3 banhos rápidos em xilol
- d. pingar Entelan (Merck) na lamínula e colocar a lâmina

- e. limpar lâmina com xilol

Soluções para Imunoistoquímica

- 1) Tampão citrato 10 mM pH 6,0
 - a. 12,6 g de ácido cítrico
 - b. água destilada q.s.p. 6,0 L
 - c. corrigir o pH com NaOH 2N

- 2) Tampão PBS 0,01 M pH 7,4 20X (concentrado)
 - a. 160 g de NaCl
 - b. 27,31 g de fosfato de sódio dibásico
 - c. 4,86 g de fosfato de sódio monobásico
 - d. água destilada q.s.p. 1,0 L

- 3) Diferenciador
 - a. 500 ml de etanol 50%
 - b. 27 gotas de HCl

Anexo 3 - Extração de RNA por Trizol - Precellys

Procedimento para a extração do RNA:

1. Aliquotar o trizol em falcon de 50ml e manter no gelo.
2. Nos tubos com beads magnéticos do kit do Precellys® colocar **1ml de Trizol** (gelado) do falcon acima. Mantendo sempre os tubos no gelo. É colocado 1ml de Trizol para cada 50-100 mg de tecido.
3. Remover o excesso de Tissuetek® e tentar cortar o máximo que puder do tecido com o bisturi sem descongelar. Colocar o tecido no tubo com o Trizol e ligar o precellys por **10 segundos** na velocidade máxima (**6.500rpm**). (Se o material for muito grande dividir o tecido em vários tubos). Colocar imediatamente as amostras no gelo até o próximo ciclo. As amostras podem ser processadas até no máximo 3 ciclos de 10 segundos na velocidade máxima.
4. Transferir as amostras do tubo das beads (1ml) para um tubo eppendorf (1,5 ml) com o auxílio de Pipeta Pasteur estéril de plástico e deixá-las à temperatura ambiente no Trizol por **5 minutos** para garantir melhor degradação da matriz intracelular – proteoglicanas - das células e lise de todas as membranas.
5. Centrifugar a **12.000g** por **10 minutos** a 4°C.
NOTA: Algumas amostras vão aparecer 3 fases: a superior seguirá para extração do RNA; a do meio, parecendo um óleo é de Tissuetek® e deve ser descartada em lixo orgânico e a inferior segue para extração do DNA (onde acrescenta-se o BEB).
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml, adicionar **200µl de clorofórmio**, agitar por inversão durante 1 minuto e deixar à temperatura ambiente por **5 minutos** para iniciar a separação das fases.
7. Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4°C.
NOTA: Tomar cuidado ao transferir o sobrenadante com a pipeta, pois na interface estão as proteínas alifáticas (halo branco) que não devem ser retiradas.

8. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo de 2,0 ml, adicionar 1ul de glicogênio e aproximadamente 500µl de isopropanol (volume/volume), agitar por inversão durante 1 minuto.
9. Deixar essa solução precipitando à temperatura ambiente por **15 minutos**.
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.
11. Descartar o sobrenadante com cuidado por inversão e acrescentar 1 ml de etanol 70% gelado, preparado com água DEPC para a lavagem do pellet. Somente na primeira lavagem deve-se desgrudar o pellet.
12. Centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C.
13. Lavar o pellet mais 3X sem desgrudá-lo, com 1 ml de etanol 70% gelado e centrifugando a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C.
14. Descartar cuidadosamente o sobrenadante por inversão a cada lavagem, retirar o excesso de etanol com pipeta cuidadosamente e secar o pellet em banho-seco (Termomixer – 300rpm) a 42°C (menos de 1 minuto para os pellets secarem).
15. Ressuspender o pellet com H₂O DEPC e deixar em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Homogeneizar cuidadosamente com a pipeta o RNA durante esses 10 minutos. Após esse tempo colocar imediatamente no gelo.
16. A quantificação e pureza deve ser avaliada no NanoDrop e a integridade no Bioanalyzer. Armazenar o RNA a -80°C.

Anexo 4 - Extração de DNA – Tecido Congelado (Fenol/clorofórmio)

1. Coletar o tecido (<100 mg de tecido) em um tubo de 1,5 ml.
2. Adicionar 600 µl de **Tampão de Digestão** (caseiro- abaixo) ou 600 µl do tampão **Cell Lysis Solution** (Gentra Puregene Blood Kit - Qiagen).
 - 30 µl de 0,5M EDTA
 - 15 µl sodium dodecylsulphate 20%
 - 15 µl NaCl 4M
 - 6 µl Tris-HCl 1M pH 8,0
 - 519 µl de água MilliQ
 - 15 µl Proteinase K 20 µg/µl (adicionar a PK também com o tampão da Qiagen)
3. Incubar a **55°C** em agitação (700rpm) por **18** horas.
4. Adicionar mais 10-15 µl de Proteinase K, caso o tecido não tenha dissolvido por completo.
5. Centrifugar o **tubo Phase Lock Gel (PLG)** por 1 min a 13.200 rpm para que toda a resina desça para o fundo.
6. Transferir a amostra para o tubo PLG. Adicionar 600 µl de **fenol-clorofórmio-álcool isoamílico**
7. Homogeneizar por inversão por 1 min. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm.
8. Transferir a fase aquosa (acima da resina do tubo) para um novo tubo PLG. Adicionar 600 µl de **fenol-clorofórmio-álcool isoamílico** (25:24:1). Homogeneizar. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm.
9. Adicionar 600 µl de **clorofórmio** direto no tubo PLG (sem trocar de tubo).
10. Homogeneizar por inversão por 1 min. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm.

11. Transferir a fase aquosa para um novo tubo (2,0 ml) e adicionar 0,5 μ l de **glicogênio** (20 mg/ml) e 800 μ l de **EtOH 100 %** gelado. Homogeneizar bem por inversão.
12. Incubar por 1 hora a -20°C (se a nuvem de DNA estiver evidente pular esse passo).
13. Centrifugar por 30 min a 14.000 rpm a 4°C .
14. Remover o sobrenadante.
15. Lavar o pellet 3x com 1 ml de **EtOH 70%** gelado. Ressuspender o pellet na primeira lavagem.
16. Centrifugar por 2 min a 14.000 rpm a 4°C .
17. Remover o sobrenadante (retirar o excesso com a pipeta). Secar o pellet a 42°C ou na bancada.
18. Ressuspender em **aproximadamente 50 μ l** de H_2O (de acordo com o tamanho do pellet).
19. Incubar a 55°C por 10 minutos.
20. Deixar *overnight* a 4°C .
21. Quantificar o DNA. Avaliar integridade com 0,5 μ g em gel de agarose.
22. Armazenar em freezer -20°C .

Anexo 5A - Quadro das seqüências dos iniciadores utilizados para sequenciamento do cDNA.

Iniciador	Seqüência
E2ForE	GACGGTGACACGCTTCCCTG
E2ForI	CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTC
E6ForE	CCTCAGCATCTTATCCGAG
E6ForI	GGAAATTTGCGTGTGGAG
E6RevI	CTGTCATCAAATACTCCACACG
E6RevE	CACCACCACACTATGTCTG
E11RevI	CAAGAAGTGGAGAATGTC
E11RevE	AGGCTGTCAGTGGGGAAC

Anexo 5B - Quadro das sequências dos iniciadores utilizados para HRM e sequenciamento do gDNA.

Iniciador	Sequência
E2ForHRM	CCACTTTTCCTCTTGCAGCAG
E2RevHRM	CTAGCAGAGACCTGTGGAAG
E4ForHRM	GCTCTTTTCACCCATCTACAG
E4RevHRM	CACGGTCAGTTGCCCTG
E5ForHRM	GTA TCCCCTGCCCTCAAC
E5RevHRM	CAGATAGCGATGGTGAGCAGC
E6ForHRM	GATTCCTCACTGATTGCTCTTAG
E6RevHRM	CTGAGGTCTGGTTTGCAACTG
E7ForHRM	GCCTGTGTTATCTCCTAGG
E7RevHRM	TCAGGAGCCACTTGCCAC
E8ForHRM	GCTTCTCTTTTCCTATCCTGAG
E8RevHRM	GTAAGCAAGCAGGACAAGAAG
E9ForHRM	GAGACCAAGGGTGCAGTTATG
E9RevHRM	GGACCTCTTATCAAGTGGAAAG
E10ForHRM	CAGGTA CTGTGTATATACTTAC
E10RevHRM	GCCATAGGATTCCATTCTC
E11ForHRM	GCACAGACCCTCTCACTCATG
E11RevHRM	GTTCCCCACTGACAGCCTC
E13ForHRM	GGGACTGACTTTCTGCTCTTG
E13RevHRM	CTTTTCACCCATCTACAGTCCC

Anexo 6A - Gráficos representativos das análises de HRM

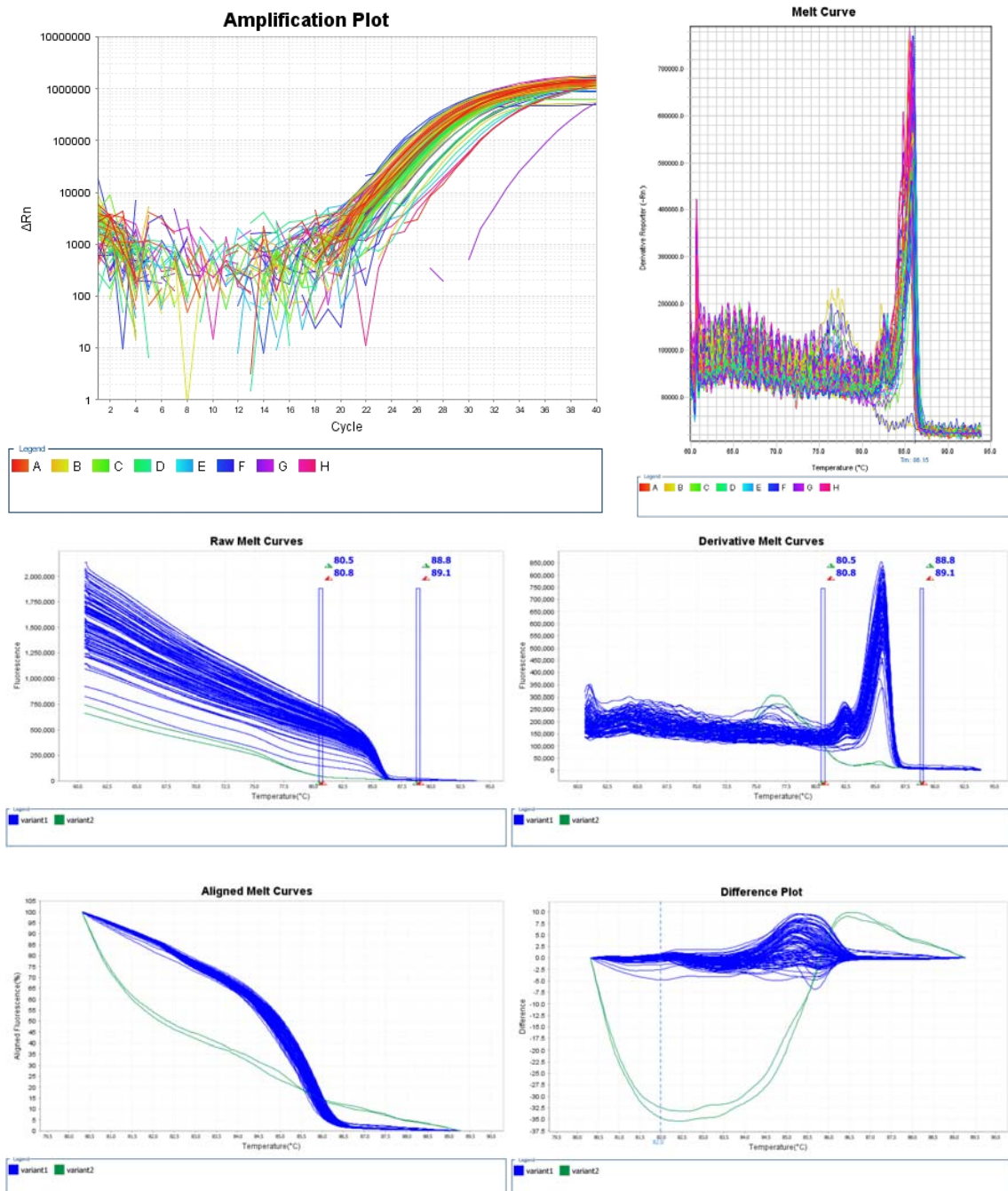


Figura 1 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 2. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6B

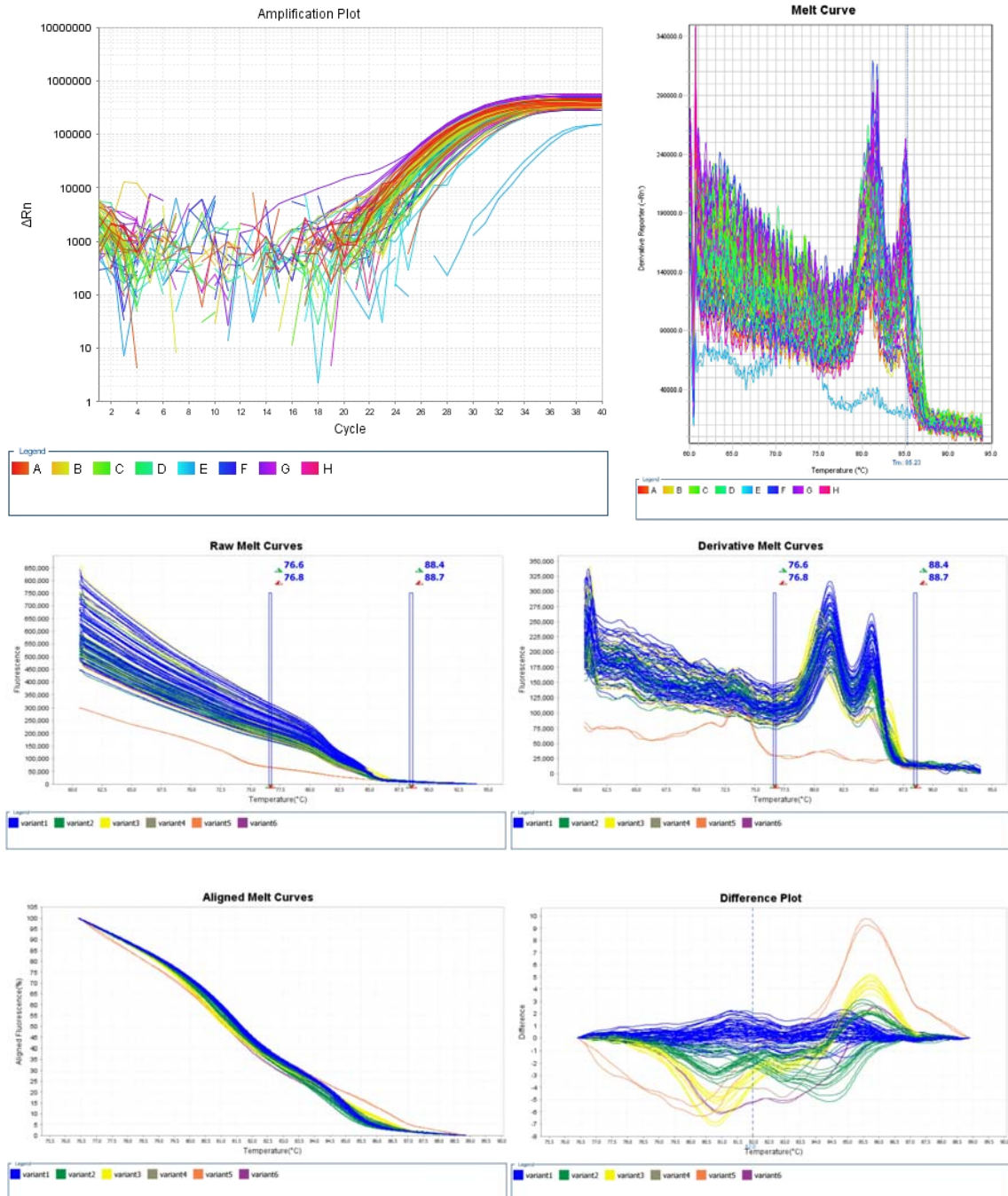


Figura 2 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 3. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6C

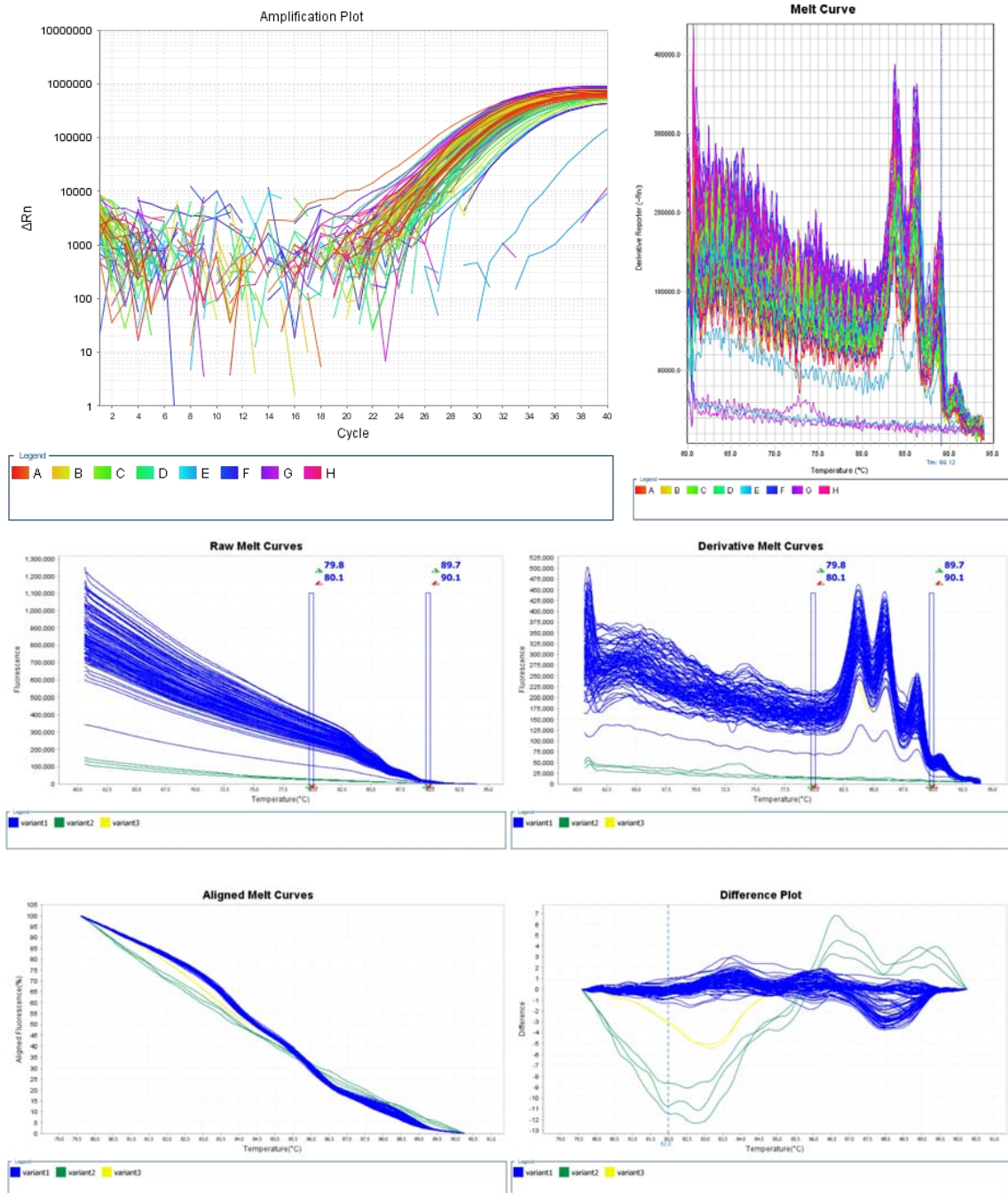


Figura 3 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 4. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6D

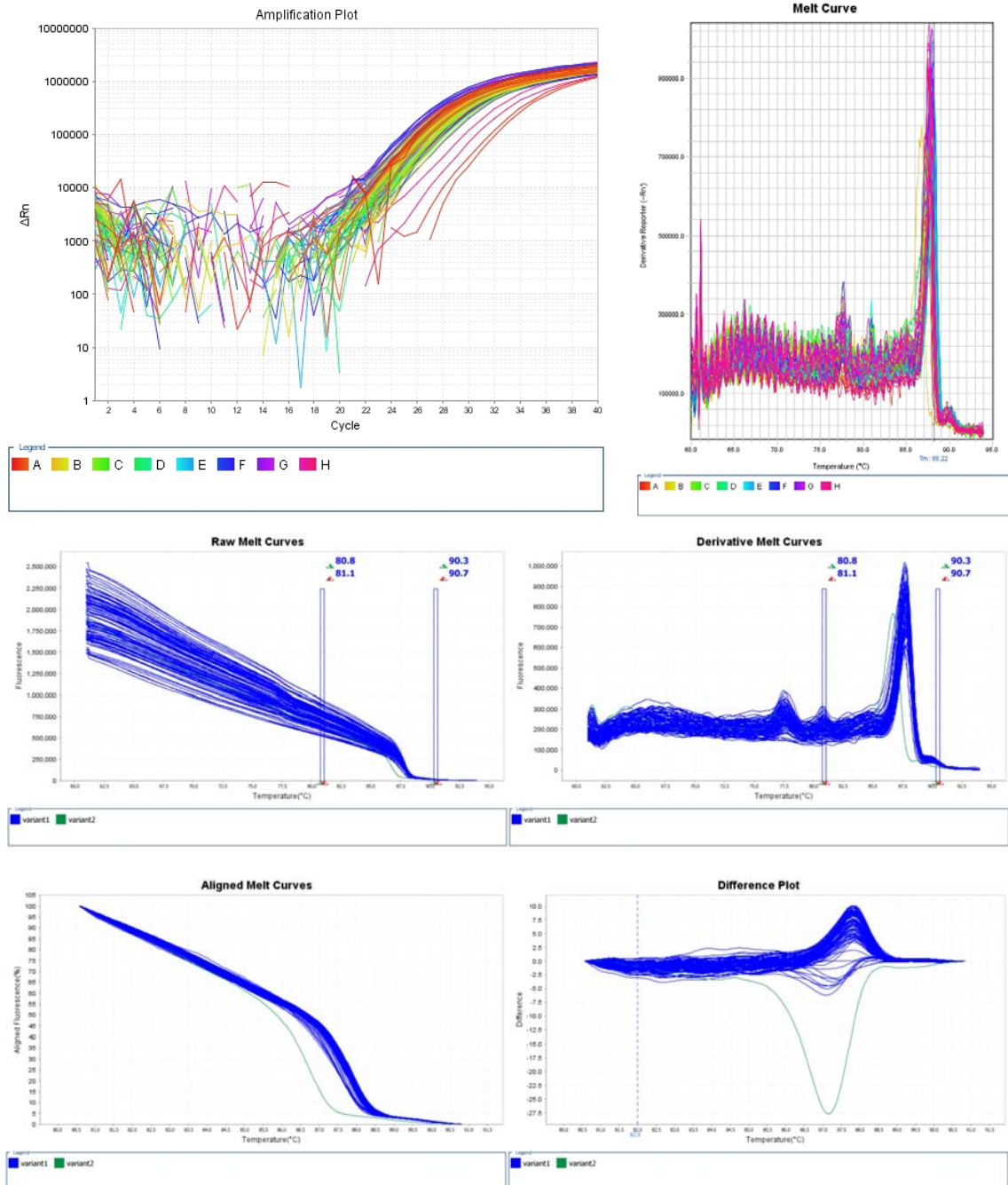


Figura 4 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 5. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6E

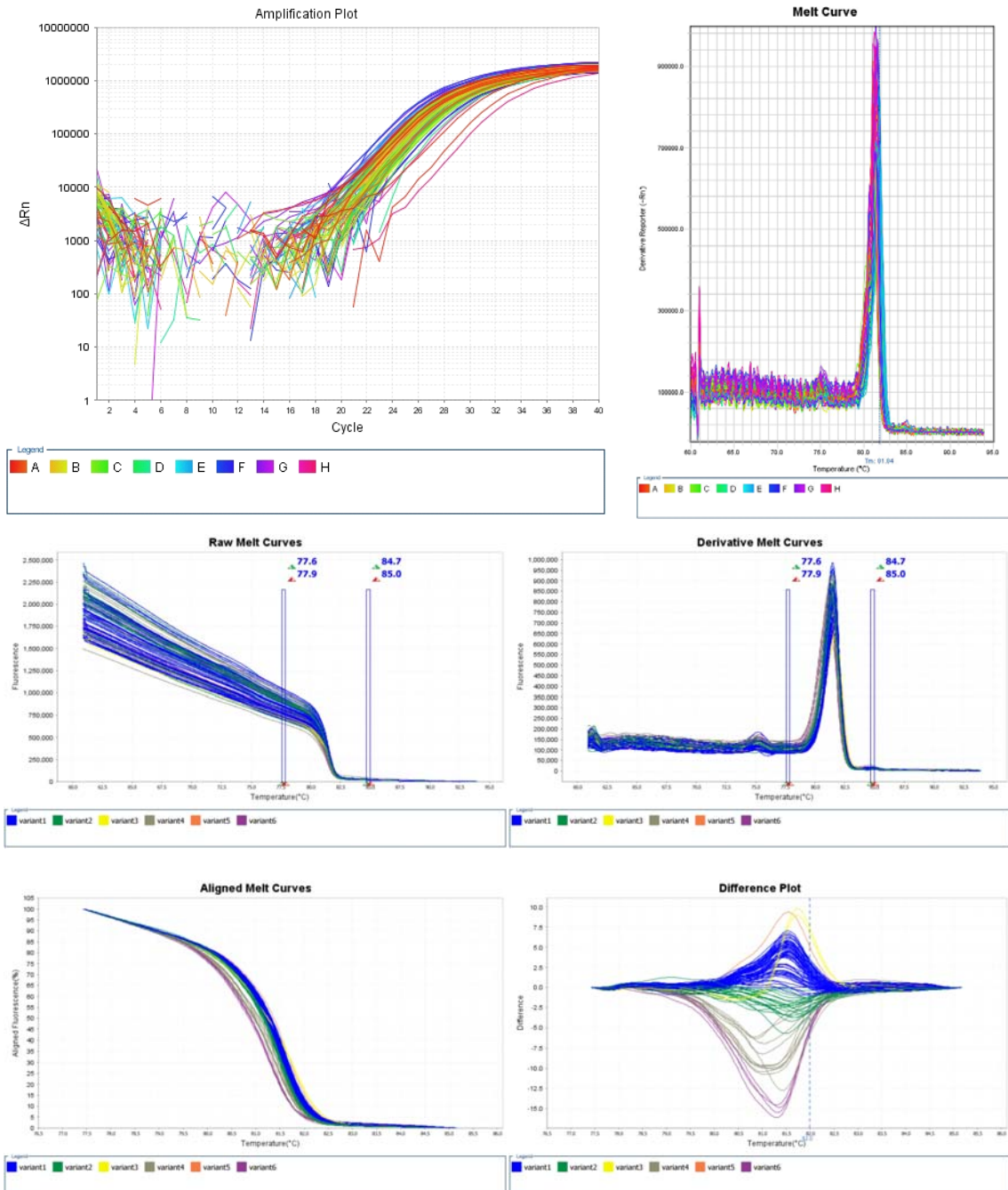


Figura 5 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 6. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6F

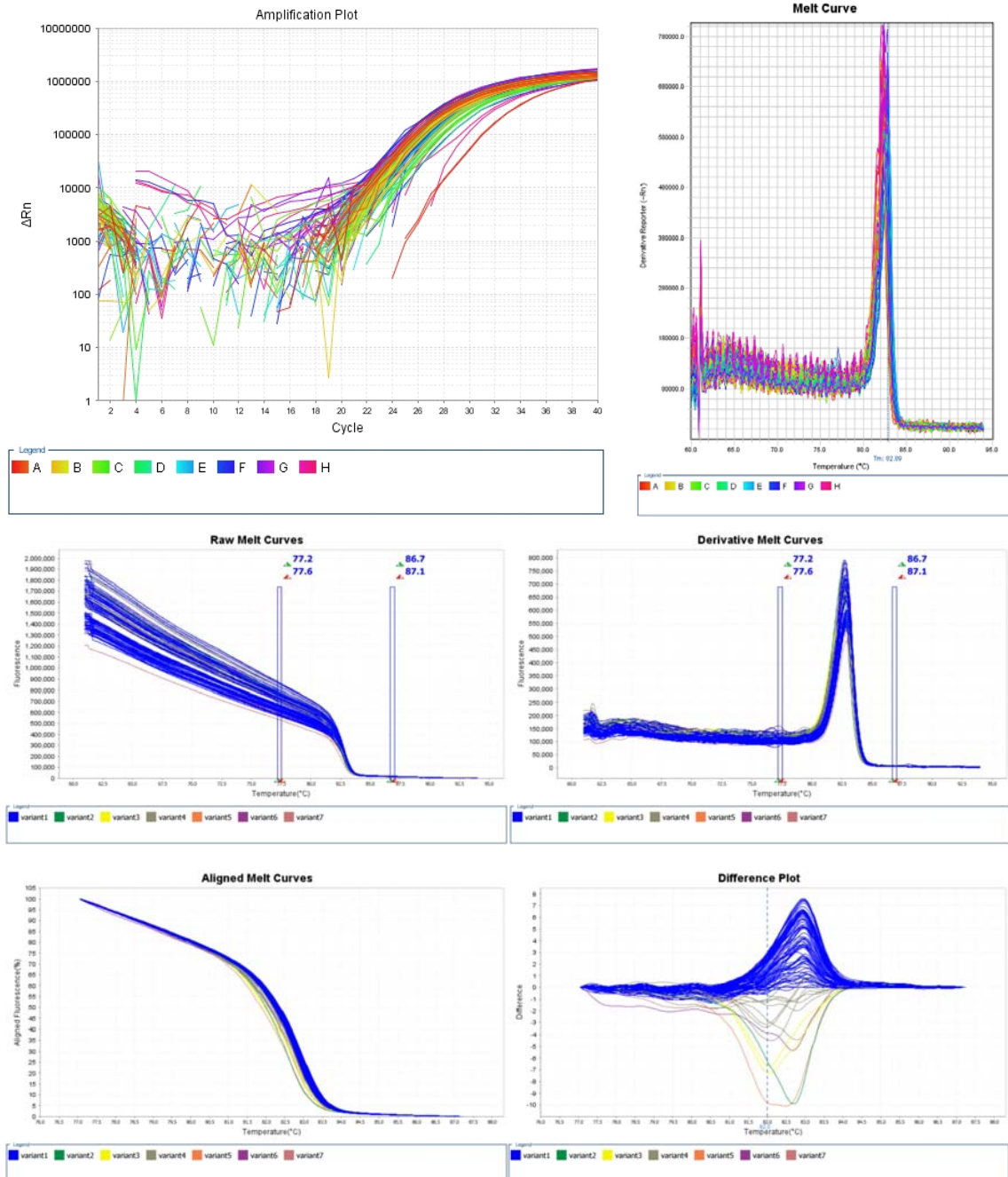


Figura 6 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 7. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6G

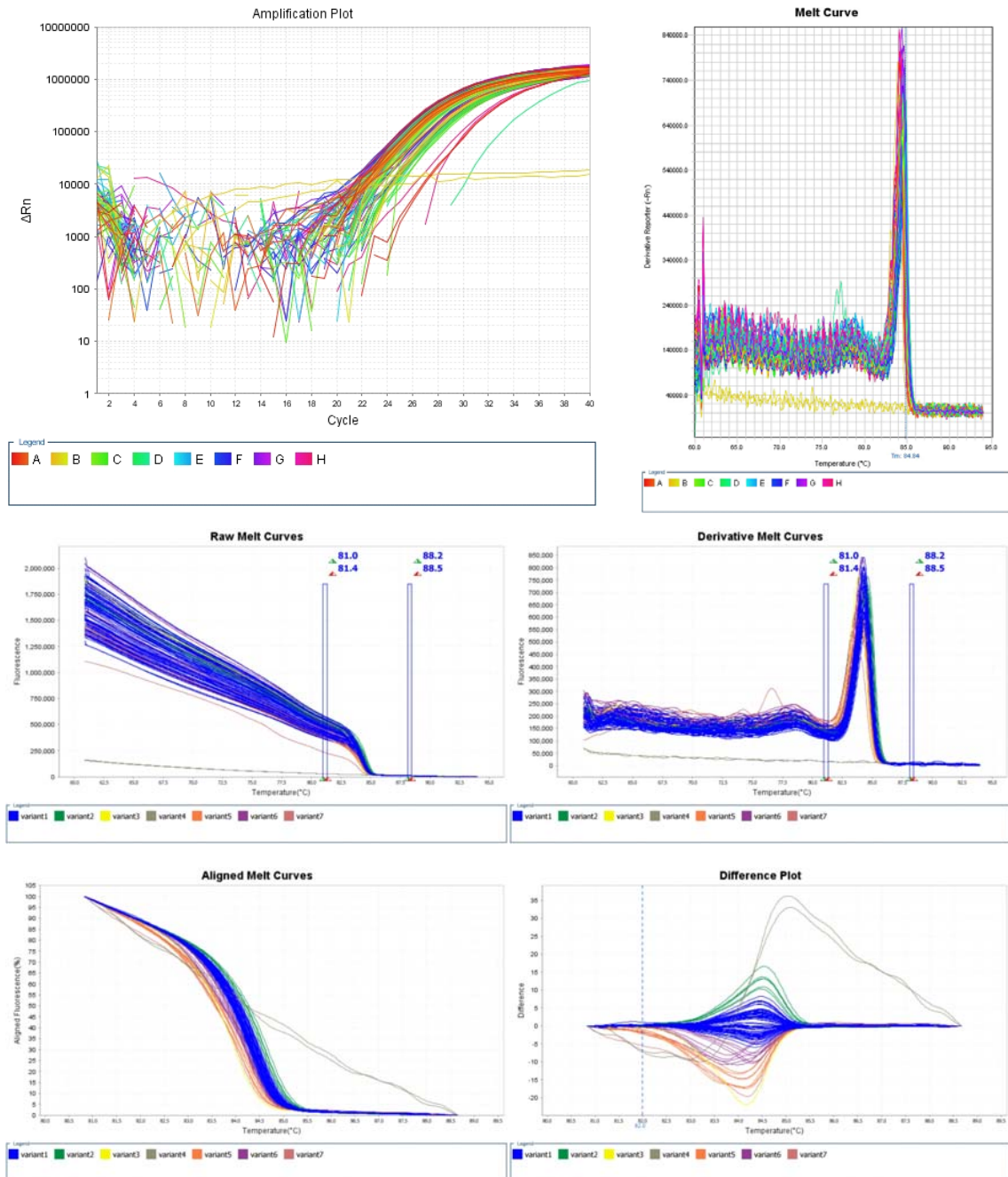


Figura 7 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 8. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6H

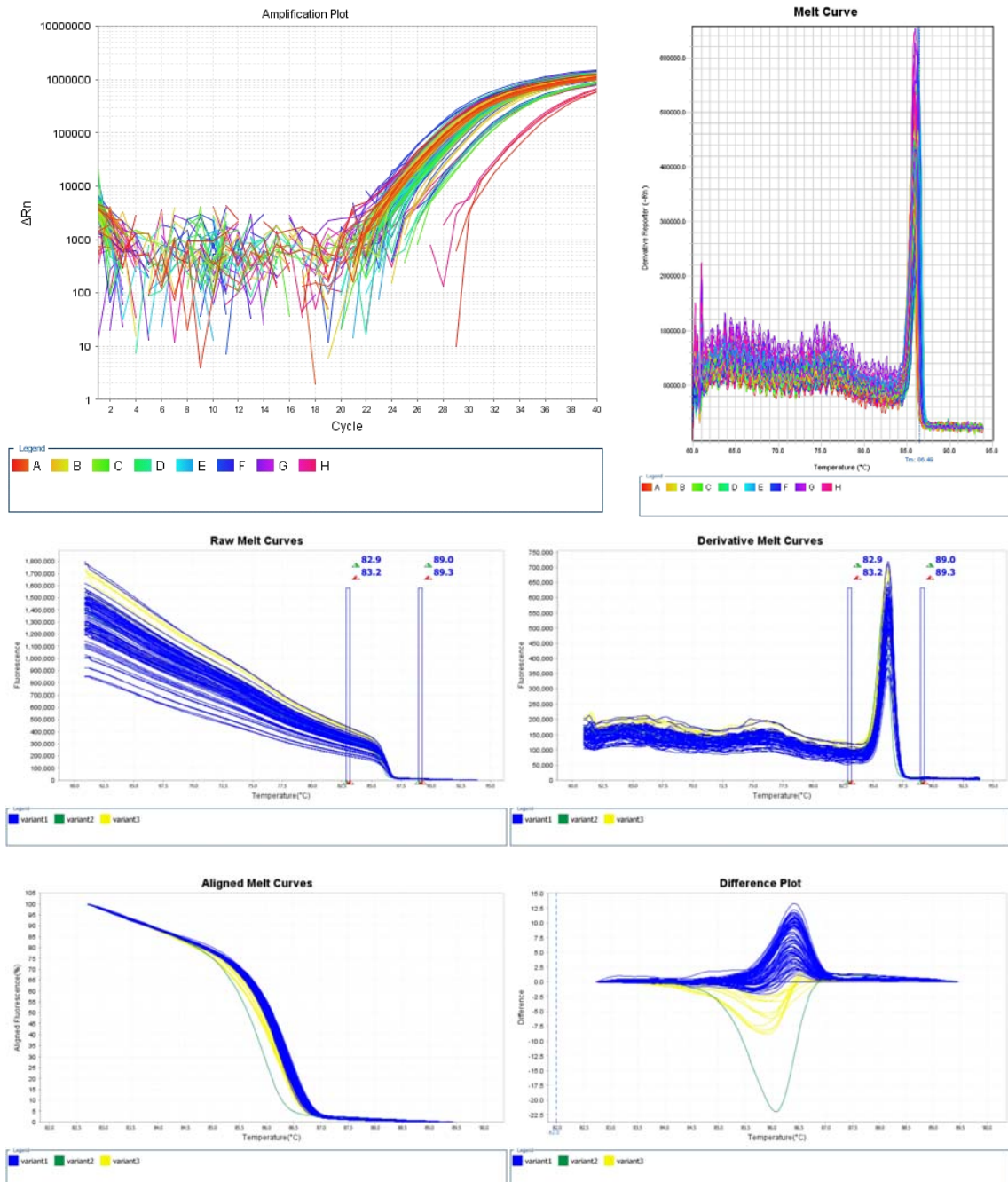


Figura 8 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 10. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6I

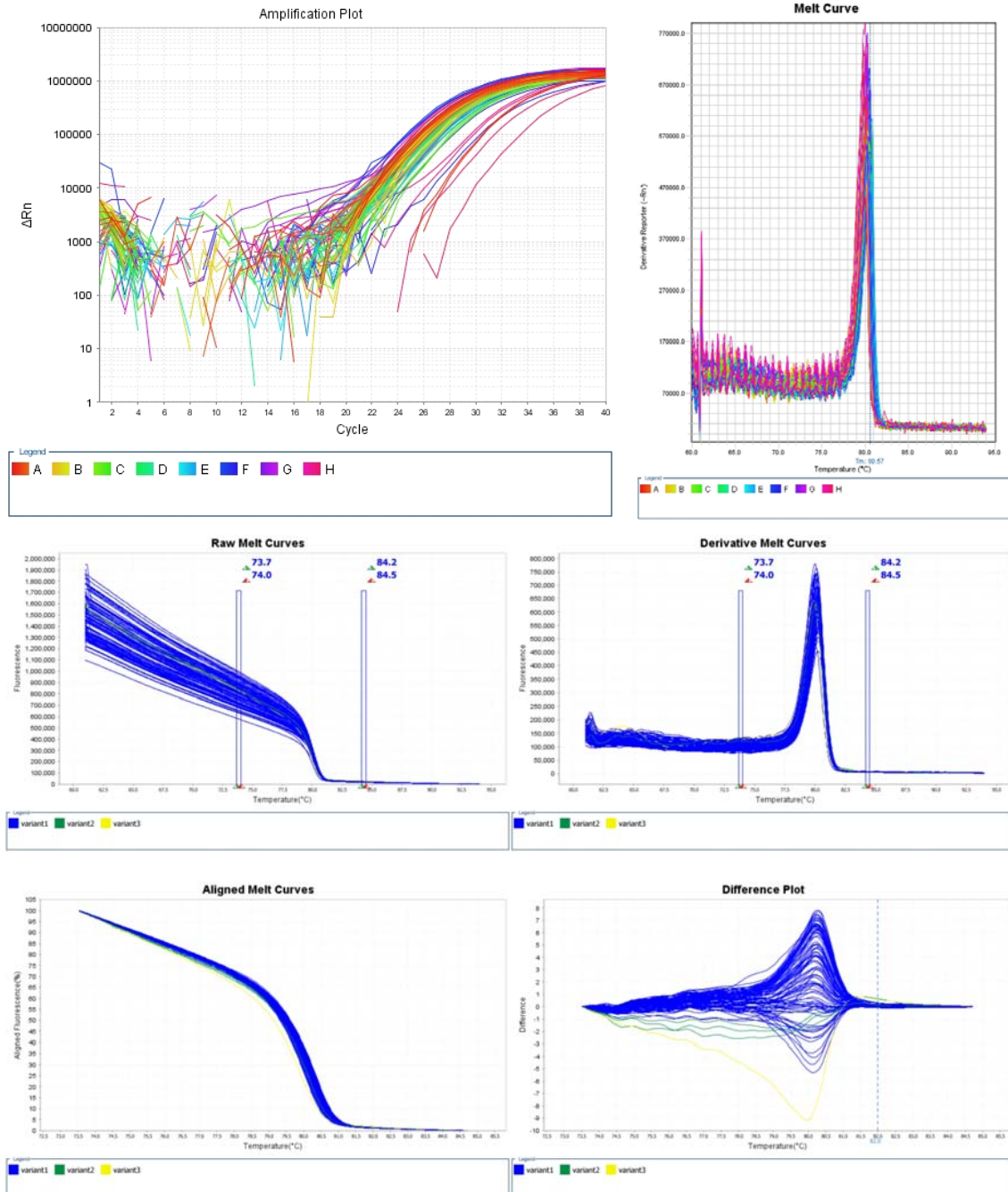


Figura 9 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 9. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 6J

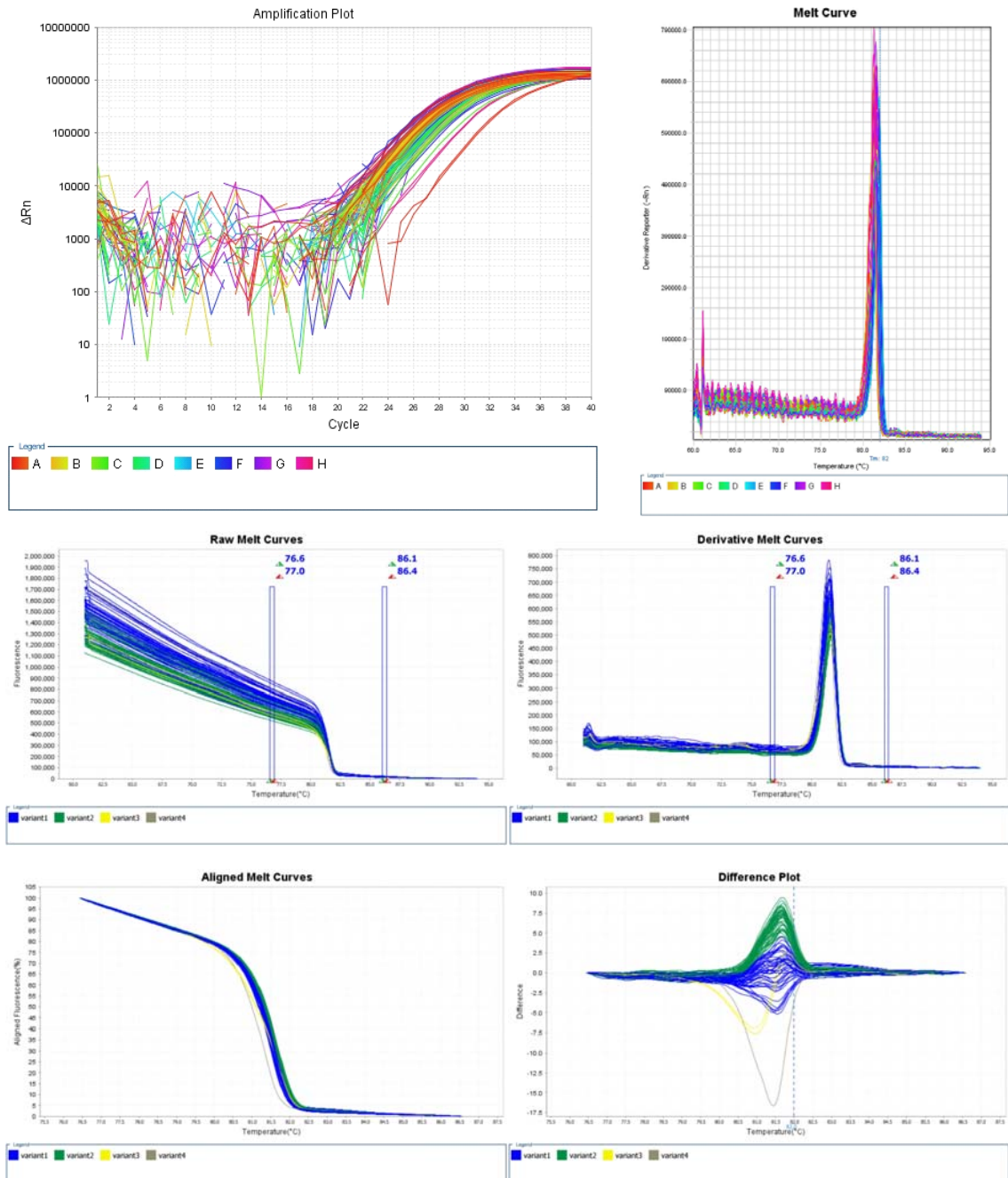


Figura 10 - Gráficos representativos das análises de HRM para o exon 11. Amplificação das amostras, curva de dissociação, dados brutos, derivados e alinhados da curva de dissociação, e gráfico com a diferença relativa entre as amostras.

Anexo 7 - Tabela da Descrição das mutações encontradas no estudo.

Amostra	Mutação	Genótipo	Domínio	Exón	Troca	Codón WT	Codón		Resultado	Splicing		Funcionalidade	Predição				Expressão
							mutante	CGC		NNSPLICE 0,9	HSF_V2.3		AGVDG	SIFT	DNE	Estrut./Func.	P53
LC6T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
LC12T	troca complexa															0	
LC14T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
	c.586C>T	Hetero	p53C	6	196Arg>Stop	CGA	TGA	219 T / 6 GL	NS	NS	SE	SE	SE	SE	SE		
LC18T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90	
	c.524G>A	Homo	p53C	5	175Arg>His	CGC	CAC	1130 T / 25 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional		
LC20T	Inserção (399 TGAT)	Hetero	p53C	5	leitura											0	
LC24T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80	
	c.329G>T	Homo	p53C	4	110Arg>Leu	CGT	CTT	26 T / 2 GL	NS	Ruptura doador	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional		
LC29T	Sem trocas															0	
LC30T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
LC31T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90	
	c.455C>T	Homo	p53C	5	152Pro>Leu	CCG	CTG	77 T / 10 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional		
LC34T	Inserção (217 C)	Hetero	PRR	4	leitura											0	
LC36T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
LC37T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
LC39T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0	
LC40T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80	

	c.844C>T	Hetero	p53C	8	282Arg>Trp	CGG	TGG	551 T / 15 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC42T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC43T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	70
	c.535C>T	Homo	p53C	5	179His>Tyr	CAT	TAT	104 T / 3 GL	NS	NS	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC46T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC47T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.742C>T	Homo	p53C	7	248Arg>Trp	CGG	TGG	691 T / 16 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC53T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.524G>A	Homo	p53C	5	175Arg>His	CGC	CAC	1130 T / 25 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC54T	Sem trocas															60
LC55T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	100
	c.817C>T	Homo	p53C	8	273Arg>Cys	CGT	TGT	650 T / 11 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC56T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC57T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	70
	c.632C>T	Homo	p53C	6	211Thr>Ile	ACT	ATT	19 T / 0 GL	NS	NS	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC58T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
LC60T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC61T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	100
	c.844C>T	Homo	p53C	8	282Arg>Trp	CGG	TGG	551 T / 15 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC64T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC65T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.523C>T	Hetero	p53C	5	175Arg>Cys	CGC	TGC	28 T / 0 GL	NS	Novo doador	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	

	c.731G>A	Hetero	p53C	7	244Gly>Asp	GGC	GAC	60 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC66T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
	c.833C>T	Homo	p53C	8	278Pro>Leu	CCT	CTT	79 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC67T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	30
LC70T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC75T	c.817C>T	Homo	p53C	8	273Arg>Cys	CGT	TGT	650 T / 11 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	90
LC76T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	30
LC78T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	Deleção (G159)	Hetero	PRR	4	leitura											
LC83T	c.817C>T	Homo	p53C	8	273Arg>Cys	CGT	TGT	650 T / 11 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	100
LC90T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC96T	c.328C>T	Homo	p53C	4	110Arg>Cys	CGT	TGT	12 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	40
	c.587G>T	Homo	p53C	6	196Arg>Leu	CGA	CTA	2 T / 0 GL	NS	NS	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC98T	c.1045G>T	Hetero	TET	10	349Glu>Stop	GAA	TAA	7 T / 0 GL	NS	Novo doador	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC100T	Sem trocas															0
LC103T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC112T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.695T>C	Homo	p53C	7	232Ile>Thr	ATC	ACC	16 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC113T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.743G>A	Hetero	p53C	7	248Arg>Gln	CGG	CAG	846 T / 16 GL	NS	Novo acceptor	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC115T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
LC117T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90

	c.815T>C	Hetero	p53C	8	272Val>Ala	GTG	GCG	9 T / 1 GL	Ruptura doador	Ruptura doador	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC118T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC121T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC123T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	Deleção (513-558)	Hetero	p53C	5	leitura											
LC125T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
	c.473G>A	Homo	p53C	5	158Arg>His	CGC	CAC	98 T / 6 GL	NS	Ruptura doador	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC127T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
LC129T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC130T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	Deleção (376-396)	Homo	p53C	5	leitura											
LC131T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	30
LC132T	c.725G>A	Homo	p53C	7	242Cys>Tyr	TGC	TAC	55 T / 3 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	80
LC137T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
	c.833C>T	Homo	p53C	8	278Pro>Leu	CCT	CTT	79 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC138T	c.659A>C	Homo	p53C	6	220Tyr>Ser	TAT	TCT	12 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	90
LC141T	c.833C>T	Homo	p53C	8	278Pro>Leu	CCT	CTT	79 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	90
LC142T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.659A>G	Homo	p53C	6	220Tyr>Cys	TAT	TGT	340 T / 6 GL	NS	Novo acceptor	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC145T	c.672G>A	hetero	p53C	6	224Glu>Glu	GAG>GAA	GAA	8 T/0 GL	NS	Novo acceptor	NA	NA	NA	NA	NA	20
	Inserção (673 GTCTG)	Hetero	p53C	6	leitura											
LC148T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0

LC149T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	60
	c.742C>T	Homo	p53C	7	248Arg>Trp	CGG	TGG	691 T / 16 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC150T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	60
	c.743G>A	Hetero	p53C	7	248Arg>Gln	CGG	CAG	846 T / 16 GL	NS	Novo acceptor	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC151T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	20
LC152T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC153T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.734G>C	Homo	p53C	7	245Gly>Ala	GGC	GCC	12 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC154T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
	c.524G>A	Homo	p53C	5	175Arg>His	CGC	CAC	1130 T / 25 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC155T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC156T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC157T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	70
	c.476C>T	Homo	p53C	5	159Ala>Val	GCC	GTC	48 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC158T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.733G>A	Homo	p53C	7	245Gly>Ser	GGC	AGC	423 T / 18 GL	NS	Novo acceptor	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC160T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC162T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	100
	c.743G>A	Hetero	p53C	7	248Arg>Gln	CGG	CAG	846 T / 16 GL	NS	Novo acceptor	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC165T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.523C>T	Hetero	p53C	5	175Arg>Cys	CGC	TGC	28 T / 0 GL	NS	Novo doador	Parcialmente	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC166T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80

	c.524G>A	Homo	p53C	5	175Arg>His	CGC	CAC	1130 T / 25 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC169T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC170T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	100
	c.818G>A	Homo	p53C	8	273Arg>His	CGT	CAT	792 T / 17 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC171T	c.722C>G	Homo	p53C	7	241Ser>Cys	TCC	TGC	34 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	80
LC172T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC173T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC180T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC181T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC184T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC185T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	30
LC186T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	60
	c.844C>T	Homo	p53C	8	282Arg>Trp	CGG	TGG	551 T / 15 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	
LC187T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	80
	c.488A>G	Homo	p53C	5	163Tyr>Cys	TAC	TGC	146 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC188T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	Inserção (455 C)	Hetero	p53C	5	leitura											
LC189T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	30
	c.476C>A	Hetero	p53C	5	159Ala>Asp	GCC	GAC	10 T / 1 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC192T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo acceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.583A>T	Homo	p53C	6	195Ile>Phe	ATC	TTC	27 T / 0 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	SE	Não funcional	
LC194T	c.844C>T	Homo	p53C	8	282Arg>Trp	CGG	TGG	551 T / 15 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Não	Não funcional	70

LC196T	c.215C>G	Hetero	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC197T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
LC199T	Deleção (792-796)	Hetero	p53C	8	leitura											0
LC200T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.818G>A	Homo	p53C	8	273Arg>His	CGT	CAT	792 T / 17 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC201T	c.108G>A	Homo	TAD	4	36Pro>Pro	CCG/CCA	CCA	Polimorfismo (MAF= 0,012)	NS	NS	SE	SE	SE	SE	SE	90
	c.742C>T	Homo	p53C	7	248Arg>Trp	CGG	TGG	691 T / 16 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC204T	Sem trocas															0
LC205T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	100
	c.742C>T	Homo	p53C	7	248Arg>Trp	CGG	TGG	691 T / 16 GL	NS	NS	Não funcional	Deletéria	Deletéria	Sim	Não funcional	
LC206T	Sem trocas															0
LC208T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0
	c.1014C>T	Hetero	TET	10	338Phe>Phe	TTC	TTT	1 T / 0 GL	NS	NS	SE	SE	SE	SE	SE	
LC210T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	20
LC212T	c.215C>G	Homo	PRR	4	72Pro>Arg	CCC/CGC	CGC	Polimorfismo (MAF= 0,398)	NS	Novo aceptor	SE	SE	SE	SE	SE	0

Legenda: PRR = *proline rich domain*; TET = *tetramerization domain*; p53C = C-terminal; TAD = *transactivation domain*; MAF = valor do alelo de menor frequência; T = tumor; GL = germinativo (*germline*); NS = não significativo; SE = sem estudos.

DESCRIÇÃO DA TABELA:

A Tabela 1 do Anexo 7 descreve todos os resultados referente aos achados de mutações obtidos através do sequenciamento do cDNA. “Amostra” se refere aos casos estudados. “Mutação” se refere à alteração encontrada na sequência de p53. “Genótipo” se refere à forma como se apresenta a mutação, em homozigose ou heterozigose. “Domínio” se refere à região onde se encontra a mutação, sendo: PRR (*Proline Rich Region*), p53C (*DNA binding domain – Core*), TET (*Tetramerization domain*) e TAD (*Transactivation domain*). “Exon” se refere ao número do exon onde ocorreu a mutação. “Troca” se refere ao tipo de mudança na proteína. “Códon WT” descreve qual o códon selvagem da região (que inclui o polimorfismo). “Códon mutante” descreve qual o códon resultante da mutação correspondente. “Resultado” se refere ao número de vezes em que determinada mutação foi encontrada, sendo “T” para diferentes tumores esporádicos e “GL” para tumores germinativos. MAF (*global Minor Allele Frequency*) se refere ao valor do alelo de menor frequência do polimorfismo. “*Splicing*” se refere a programas que predizem, através da sequência, se a troca gera ou destrói alguma região envolvida em *splicing*: NNSPLICE 0,9 e HSF_V2.3. “Funcionalidade” se refere à predição da funcionalidade da proteína mutante estudada em sistemas de leveduras segundo KATO et al. (2003). “Predição” se refere à predição de estrutura e função da proteína mutante por programas de bioinformática. “AVGDG” e “SIFT” classificam as mutações como neutras, deletérias ou não-classificadas baseados na conservação dos resíduos de aminoácidos dos peixes aos mamíferos, de acordo com sua composição, polaridade e volume (GRANTHAM 1974). “DNE” prediz se a proteína mutante exerce um efeito dominante-negativo sobre as proteínas p53 selvagens em ensaios de transativação (atividade transcricional promotor-específico medida em ensaios de levedura e expressa como porcentagem de atividade do tipo selvagem) ou crescimento celular. E “Estrutura/Função” classifica as alterações levando em consideração as estruturas primárias e terciárias das proteínas selvagem e mutante, como funcional ou não funcional. “Expressão de p53” se refere à expressão de p53 detectada por imunistoquímica nos tumores. O “Número” se refere à porcentagem de células tumorais marcadas no material examinado.



Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer

Ignacio López ^{a,*}, Ligia P. Oliveira ^b, Paula Tucci ^a, Fernando Álvarez-Valín ^c,
Renata A. Coudry ^b, Mónica Marín ^a

^a Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE), Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brazil

^c Sección Biomatemática, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 8 February 2012

Available online 21 February 2012

Keywords:

Colorectal cancer
TP53 mutation pattern
TP53 mRNA

ABSTRACT

The tumor suppressor *TP53* gene is one of the most frequently mutated in different types of human cancer. Particularly in colorectal cancer (CRC), it is believed that *TP53* mutations play a role in the adenoma–carcinoma transition of tumors during pathological process. In order to analyze *TP53* expressed alleles in CRC, we examined *TP53* mRNA in tumor samples from 101 patients with sporadic CRC. Samples were divided in two groups defined according to whether they exhibit positive or negative P53 protein expression as detected by immunohistochemistry (IHC). The presence of *TP53* mutation was a common event in tumors with an overall frequency of 54.5%. By direct sequencing, we report 42 different *TP53* sequence changes in 55 CRC patients, being two of them validated polymorphisms. *TP53* mutations were more frequent in positive than in negative P53 detection group ($p < 0.0001$), being the precise figures 79.6% and 30.8%, respectively. In addition, the mutation profiles were also different between the two groups of samples; while most of the mutations detected in P53 positive group were missense (38 out of 39), changes in P53 negative detection group include 7 insertions/deletions, 6 missense, 2 nonsense and 1 silent mutation. As previously observed, most mutations were concentrated in regions encoding P53 DNA binding domain (DBD). Codons 175, 248 and 273 together account for 36.7% of point mutations, in agreement with previous observations provided that these codons are considered mutation hotspots. Interestingly, we detected two new deletions and two new insertions. In addition, in three samples we detected two deletions and one insertion that could be explained as putative splicing variants or splicing errors.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The tumor suppressor protein P53 is a transcription factor that induces and/or represses the expression of target genes involved in central pathways, such as control of the cell cycle and apoptosis, among other pivotal functions (Joerger and Fersht, 2008; Soussi and Wiman, 2007). Mutations in *TP53* coding gene are found in approximately 50% of different types of human cancers (Guimaraes

and Hainaut, 2002; Joerger and Fersht, 2008; Petitjean, et al., 2007; Soussi and Wiman, 2007), being the vast majority missense mutations, preferentially localized in the DNA binding domain (DBD) of P53 (Lamolle, et al., 2006; Petitjean, et al., 2007; Soussi and Wiman, 2007). Such type of mutations could induce loss of protein function by inactivating the binding property of P53 and thus, acting as a possible cause of cell transformation (Kato, et al., 2003; Petitjean, et al., 2007).

In normal cellular conditions, synthesis and degradation of P53 are tightly regulated and the expression level is maintained very low. Thus, in such conditions, P53 is generally not detectable by usual immunohistochemical techniques (Cooper and Haffajee, 1997; Levine, et al., 1991; Renninson, et al., 1994).

Whereas other tumor suppressor genes, such as retinoblastoma or *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), are commonly inactivated by frameshift or nonsense mutations (Olivier, et al., 2010; Vousden and Lane, 2007), in the case of *TP53*, many cancers retain protein expression with only a single amino-acid change. These changes lead to both the disruption of normal P53 function and the accumulation of mutant P53 attaining levels that are high enough to be detected by routine immunohistochemical techniques (Soussi and Lozano, 2005). Many studies have indicated that the consequences of expressing

Abbreviations: Δ, Deletion; 5mC, 5-methylcytosine; A, Adenosine; Ab, Antibody; APC, Adenomatous polyposis coli gene; C, Cytidine; cDNA, DNA complementary to RNA; CRC, Colorectal Cancer; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DBD, DNA-Binding Domain; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; ExoSAP, Exonuclease I and recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase; FFPE, Formalin-Fixed paraffin-embedded; G, Guanosine; HRP, Horseradish Peroxidase; I, Insertion; IARC, International Agency for Research on Cancer; IHC, Immunohistochemistry; min, minutes; mRNA, Messenger RNA; NMD, Nonsense-Mediated Decay; P53, Tumor Suppressor Protein 53; PCR, Polymerase Chain Reaction; RNAase, ribonuclease; RT, Room Temperature; T, Thymidine; TAD, Transactivation Domain; TET, Tetramerization domain; *TP53*, Tumor Suppressor Protein 53 gene; U, Enzyme Units; wt, wild-type.

* Corresponding author at: Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2525 2095; fax: +598 2525 8617.

E-mail address: lopez@fcien.edu.uy (I. López).

these mutant forms of P53 are not equivalent to the simple loss of P53. How these mutant P53 proteins exert this influence on tumor spreading is being explored, and there is evidence that they can alter P53 wild-type (wt) conformation, leading to protein stabilization and accumulation in cells (Gannon, et al., 1990; Maslon and Hupp, 2010).

Colorectal cancer (CRC) is the third cancer in terms of worldwide incidence, and the second in terms of death from cancer, around 655,000 per year (<http://www.who.int/en/>). Specifically, in CRC, somatic mutations in *TP53* gene are found in 43.3% of samples (Petitjean, et al., 2007) (International Agency for Research on Cancer, IARC *TP53*, R15 release, November 2010). A molecular model for tumor progression has been well defined in CRC. The progression from adenoma to carcinoma is correlated with an accumulation of specific genetic and epigenetic alterations, being *TP53* gene a critical player (Fearon, 2011; Fearon and Vogelstein, 1990).

The aim of this study was to determine the *TP53* mutation pattern in CRC samples through complete mRNA coding region sequence analysis in order to achieve a complete characterization of expressed allele in a Brazilian population, and analyze the putative association with protein accumulation. Samples were classified according to their P53 expression status, positive or negative P53 protein expression as detected by immunohistochemistry (IHC). This approach should contribute to the identification of mutations associated with P53 nuclear accumulation in CRC.

2. Materials and methods

2.1. Tumor samples

The samples analyzed in this study came from 101 patients with sporadic colorectal tumors not treated with preoperative chemo radiotherapy operated in the Hospital A.C. Camargo (São Paulo, Brazil). Samples were divided into two groups, according to the expression status of P53 as evaluated by immunohistochemistry (IHC) (Supplementary Table 1). Fresh samples were matched with the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of the same patients used for IHC. The study was reviewed and approved by a duly constituted ethics committee (1042/08).

2.2. Immunohistochemistry

IHC staining was performed on 3 μm -thick FFPE tumor sections filed from the same fresh sample studied. IHC studies were performed using Horseradish Peroxidase (HRP) method, Advance HRP Link Polymer Amplification system (Dako, Glostrup, Denmark), and revealed using 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB (Dako, Glostrup, Denmark).

Briefly, tissues were deparaffinized using xylene and washed with ethanol 100%. Then, sections were processed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) and heated for 40 min at 96 °C in pressure cooker for antigen retrieval. Prior incubation with the primary antibody (Ab), tissues were incubated 3 times for 5 min with 10% H₂O₂ in order to block endogenous peroxidase, washed with deionized water, and blocked with 100 μL of Protein Block Serum-Free (Dako, Glostrup, Denmark) during 20 min. Sections were then incubated with 100 μL of 1:100 dilution of a monoclonal Ab against P53 (clone DO-7, Dako, Glostrup, Denmark) during 2 h in moist chamber at room temperature. 100 μL of Advance HRP Link (Dako, Glostrup, Denmark) was used to amplify the signal and 100 μL of a 1:50 dilution of DAB was used as a chromogen in a 5 min treatment. Tumoral cells showing a clearly brown reaction in nuclei were classified as positive for P53 detection. Less than 20% positive cells were established as cut-off to define negative tumors. Based on these criteria, two groups containing similar number of samples were generated, positive and negative for P53 staining detection.

2.3. RNA isolation

RNA was extracted from frozen tissues using a Trizol protocol and a Precellys® (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France) homogenizer. Briefly, cells were lysed and homogenized during 10 s at 6500 rpm in tubes containing magnetic beads and 1 mL of Trizol per 50–100 mg of tissue. Then, lysates were transferred to a new 1.5 mL tube and incubated for 5 min at RT. After that, samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. Finally, supernatants were transferred to a 1.5 mL tube where a phenol-chloroform extraction was performed. The aqueous phase was recovered and the RNA was precipitated with 1 volume of isopropanol and 20 μg of glycogen, then washed with 70% ethanol and solubilised in RNAase-free water. The concentration and quality of RNA were evaluated using a Picochip 6000 on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Foster City, USA).

2.4. cDNA preparation, PCR amplification and DNA sequencing

Reverse transcription reactions were performed on a Mastercycler EppGradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 20 μL using 1 μg of total RNA and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to manufacturer's instructions.

1 μL of the unpurified cDNA product was used to amplify two overlapping fragments of the entire *TP53* coding region by PCR, the 5' (nucleotides –54 to 654) and 3' region (nucleotides 571 to 1215). The reaction mix containing 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1.5 mM MgCl₂, 0.3 μM of specific primers and 1.5 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), was incubated on Mastercycler EppGradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: 30 cycles at 95 °C for 1 min, 30 s at 52 °C for 5' region (E2ForE GACGGTGACACGCTTCCCTG and E6RevE CACCACCACACATATGTCG) or 51 °C for 3' region (E6ForE CCTCAGCATTTATCCGAG and E11RevE AGGCTGTCAGTGGGAAC), and 2 min at 72 °C.

TP53 PCR products were purified using ExoSAP-IT (Exonuclease I and recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase) (USB, Cleveland, USA). The DNA sequencing reaction was performed using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Both strands of PCR fragments were sequenced in order to obtain more reliable results. Sequencing products were resolved in an ABI PRISM 3130xl Automated Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Sequencing results were analyzed and edited using BioEdit v7.0.9 and assembled using artemis v8. Products identities were confirmed by nucleotide blast at NCBI webpage, and detected mutations were validated using mutation validation tools at IARC webpage (<http://www-p53.iarc.fr/MutationValidationCriteria.asp>) (Petitjean, et al., 2007).

2.5. Statistical analysis

Correlation between *TP53* mutations and immunohistochemical staining was assessed by two-tailed Fisher's exact test (GraphPad Prism 5, Version 5.04, GraphPad Software Inc.). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

The purpose of this study was to analyze the complete coding region of *TP53* mRNA aiming to determine its mutation pattern in colorectal cancer and the association with protein detection by IHC.

3.1. Alterations of P53 expression level

The concentration of P53 is normally very low, however in some tumoral cells or tissues carrying a *TP53* mutation, or mutations in

related genes, the half-life of this protein can be modified (Gannon, et al., 1990), leading to detectable P53 levels (Levine, et al., 1991; Renninson, et al., 1994; Steele and Lane, 2005). The accumulation of P53 in selected tumoral samples was assessed by IHC using a monoclonal Ab against P53, which recognizes an epitope located between the N-terminal aminoacids 37 and 45 of the Transactivation Domain (TAD) as described above. In negative tumors for P53 detection, as well as in normal cells, P53 protein level is very low and as expected, no signal was detected in the conditions used in this study (Fig. 1A). Samples showing nuclear P53 signal in at least 20% of the cells were classified as positive (Fig. 1B). Among the 101 tumor samples analyzed in this work, 52 (51.5%) were negative for P53 detection, and 49 (48.5%) showed a strong signal for P53 in more than 20% of cells, namely they were classified as positive.

3.2. TP53 mutations

TP53 sequence in CRC samples was analyzed. For this purpose, total RNA was extracted, cDNA was synthesized and the complete TP53 coding region was amplified as two overlapping fragments, sequenced and compared with the reference (wt) genomic TP53 sequence (GenBank accession number NC_000017). Among the 101 tumor samples analyzed in this study, 55 presented TP53 mutations (54.5%) (Table 1, Supplementary Table 2).

In the P53 detection negative group, only 16 tumors (30.8%) exhibited at least one TP53 alteration, being grouped according to the type of mutation as follows: missense (n=6), insertions (n=3), deletions (n=4), nonsense (n=2), synonymous (n=1). Three insertions and three deletions led to frameshift, whereas the other deletion did not produce any change in the open reading frame (named as “other” in Table 1).

On the other hand, in the P53 positive detection group, 39 out of 49 (79.6%) tumors showed at least one mutation in the coding sequence of the protein. Among these, most were missense mutations (38 out of 39), and one was a frame shift producing deletion (Table 1).

These results clearly show that the frequency and profile of TP53 mutations is different between P53 positive and negative detection groups. The presence of mutations in TP53, in particular missense mutations, is statistically associated with P53 accumulation in cells (Fisher Exact test, $p < 0.0001$). However, we could not detect any association between TP53 mutations or P53 accumulation with clinical data, such as advance or differentiation stage of tumors, sex, ancestry, or external factors as smoking (Supplementary Table 1).

Table 1
TP53 mutations in CRC tissue samples.

Mutation type	P53 positive	P53 negative	Total
	n = 49	n = 52	n = 101
Missense	38	6	44*
Nonsense	0	2	2
Frameshift	1	6	7
Silent	0	1	1
Others	0	1	1
Total	39 (79.6%)	16 (30.8%)	55**

Tissue samples from colorectal tumors exhibiting mutations in gene encoding P53 protein. The samples are discriminated according to the following criteria: pattern of reaction with a P53 monoclonal antibody that indicates detectable levels of the proteins (referred as positive or negative) and the type of mutation they exhibit. Statistical association in two-tailed Fisher Exact Test are shown (* $p < 0.0001$, ** $p < 0.0001$), where samples were grouped as follows: (*) Group 1: Samples bearing missense mutation, Group 2: Samples bearing a mutation other than missense, Outcome 1: positive for P53 IHC, Outcome 2: negative for P53 IHC; (**) Group 1: Samples bearing a mutation, Group 2: Samples bearing no mutation, Outcome 1: positive for P53 IHC, Outcome 2: negative for P53 IHC.

Analyzing the study population as a whole, 42 different sequence changes were detected, being 2 of them well described polymorphisms (see below) and the 40 remaining cancer related mutations (Supplementary Table 2). Except for the missense substitutions, the other mutation types were not seen in more than one sample. Of these, two deletions (c.159del1, c.792_796del5) and two insertions (c.672_673ins5, c.398-399ins4) were detected, to our knowledge, for the first time (Supplementary Table 3). Regarding missense mutations we could identify 29 different events in 44 samples.

In our study 24 out of the 40 different mutations identified were found only in P53 positive detection samples and correspond to 23 missense mutations in DNA binding domain and one frameshift producing insertion. Of the 15 different mutations found exclusively in P53 negative samples, 5 were missense mutations on DNA binding domain, 6 correspond to insertions and deletions that produce frameshift, 2 nonsense changes; one located in the DNA binding domain and another in the Tetramerization domain (TET), 1 deletion located in the DNA binding domain but does not change the reading frame, and 1 synonymous mutation located in the Tetramerization domain. Finally, 1 missense mutation affecting DNA binding domain was found in two P53 positive samples and in one P53 negative sample.

Related to the TP53 sequence taken as wt, two of the detected changes are validated polymorphisms: 1) the c.108G>A (Rs1800370) synonymous mutation detected in one sample, which corresponds to a Proline coding codon, located in the Transactivation

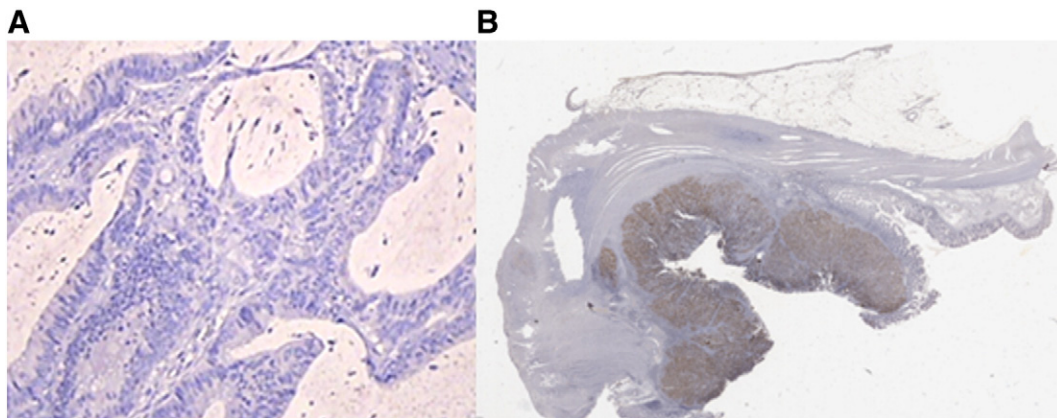


Fig. 1. Immunohistochemical detection of P53 in negative (A) and positive (B) tumoral samples using monoclonal antibody against P53. In negative samples, as well as in normal tissues, there is no brown signal corresponding to precipitated DAB, while in positive tumoral cells, the strong brown color indicates the presence of P53 in relatively high level. A: 0% of cells with positive signal, B: 90% of cells with positive signal. Midrange of P53 positive cells in positive samples: 71.6%.

Domain, with an average frequency of heterozygotes of 0.0127 in normal population (Petitjean, et al., 2007), and 2) the c.215C>G (Rs1042522) substitution present in 82 samples, produces a change from Proline to Arginine. This aminoacid altering substitution has an average frequency of heterozygotes of 0.4923 in normal population (Petitjean, et al., 2007). Polymorphisms were not considered for further analysis.

3.3. Spatial distribution of TP53 mutations

The point mutations detected in this work were scattered over a few codons; indeed out of the 393 codons that constitute this gene, only 24 were affected by single base substitutions (polymorphisms excluded). As in other human tumors (Holmila, et al., 2010; Petitjean, et al., 2007; Rodrigues, et al., 1990; Walker, et al., 1994), codons most frequently altered are located in the DNA binding domain of TP53, 22 of 24 (91.7%), and 2 (8.3%) mutated codons localized outside this domain, are located at the Tetramerization Domain (Fig. 2). Most mutations identified in this work were localized at nucleotide sites commonly mutated in other human cancers (Petitjean, et al., 2007). The only exception is c.1014C>T, that is synonymous and was reported only once. Among these, the most frequently mutated codons were 175, 248 and 273 (all three located in the DNA binding domain of P53), which together comprise 36.7% of the point mutations found (6, 7 and 5 mutations, respectively).

3.4. Mutation pattern

Analysis of the pattern of point mutations reported in this work from the point of view of the wt and mutated nucleotide, showed that C to T transitions were by far the most abundant, representing

49.0% of the changes, followed by the G→A transitions representing 26.5%. In turn, transversions were vastly less frequent with G→T transversion with 6.1%, T→C and A→G transitions accounting for 4.1% each, and finally A→C, G→C, C→G, C→A and A→T each representing 2.0% of the changes seen (Table 2). The scarcity of G→T mutations is an interesting observation given that this type of mutations are extremely frequent in other type of tumors, like lung and liver (Hainaut and Pfeifer, 2001), and this has been associated to the type of mutagenic agents to which the tissues or organs have been exposed.

3.5. Putative splicing variants

Two deletions and one insertion detected could be explained as splicing variants. As seen in Fig. 3, the region deleted or inserted contains sequences that could be used as alternative splicing sites. One sample, contains in the 3' end of the deleted region (Δ E55', c.376_396del21) AG bases which are the canonical 3' splice site (Hastings and Krainer, 2001; Tazi, et al., 2009). The same AG bases are localized at the 3' normal splice site in intron 4, and the surrounding nucleotides present in both the 5' and 3' splice sites correspond to canonical sequences too, suggesting that errors in mRNA edition could be a putative and interesting explanation. In this case, the 21 nucleotide deletion does not alter the reading frame of the protein, producing a shorter P53 protein lacking 7 residues from the DNA binding domain.

Likewise, the other deletion (Δ E53', c.514_559del46) could be considered as a modification of splicing pattern since the bases located at the 5' end of the deleted region, GT, are the same as the normal 5' splicing site from the intron 5. Once again, all surrounding sequences correspond to consensus bases for each region. This deletion

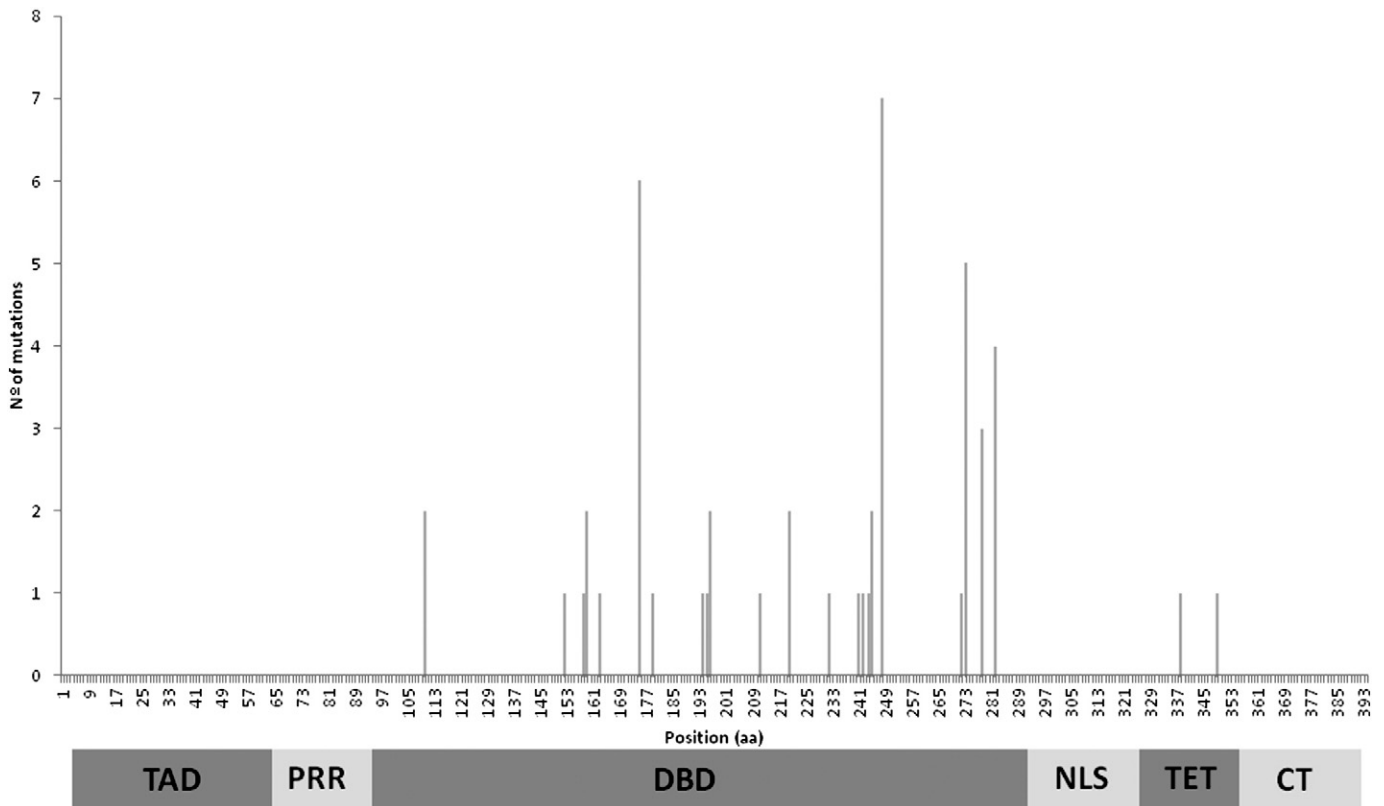


Fig. 2. Spatial distribution of mutations along the TP53 coding gene. This figure shows the number of point mutations affecting each codon. For functional reference the different protein domains are represented at the bottom in the colored box. TAD; Trans Activation Domain, PRR; Proline Rich Region, DBD; DNA Binding Domain, NLS; Nuclear Localization Signal, TET; Tetramerization Domain, CT; Carboxy terminal Domain.

Table 2
Mutation pattern.

Base change	Total event number	%
C>T	24	49.0
G>A	13	26.5
G>T	3	6.1
T>C	2	4.1
A>G	2	4.1
A>C	1	2.0
G>C	1	2.0
C>G	1	2.0
C>A	1	2.0
A>T	1	2.0
Total	49	100.0

Point mutations identified in this work discriminated according to the nucleotides involved (wild type and mutated). It shows the number of times that a particular nucleotide change was seen, including total nucleotide substitutions detected and excluding polymorphisms.

affects the last 46 nucleotides from exon 5 and induces a reading frame change.

In the same line, the insertion (IE63', c.672_673ins5) contains in the 5' end the same GT bases that are located in the putative new 5' splice site of the intron 6, suggesting that errors during edition could be the cause of this change. Clearly, the 5 nucleotides insertion alters the protein reading frame. This insertion was not detected in previous studies.

It is important to note that none of these samples contain another mutation in RNA sequence that could be related to splicing errors, for example, by altering splicing enhancers sites located inside the exons involved. This observation strongly suggests that particular splicing modifications are associated with CRC.

4. Discussion

Here we report 40 different tumor suppressor gene *TP53* mutations in CRC from a Brazilian population. These mutations were

found in 54.5% of samples analyzed, and such value agrees with the average samples mutated in all human tumors (Guimaraes and Hainaut, 2002; Joerger and Fersht, 2008; Petitjean, et al., 2007; Soussi and Wiman, 2007). Particularly, the frequency of *TP53* mutations in colorectal cancer is approximately 40% to 50% (Iacopetta, 2003).

The majority of the *TP53* mutations identified in this work were missense, as it has been seen in previous studies in different types of human cancers, such as hepatocellular carcinoma, epithelial ovarian cancer, non-small cell lung cancer, sinonasal cancer and esophageal squamous cell carcinomas, among others (Audrezet, et al., 1993; Holmila, et al., 2010; Lee, et al., 2010; Petitjean, et al., 2007; Renninson, et al., 1994; Rodrigues, et al., 1990; Walker, et al., 1994).

We further analyzed the relationship between P53 expression level and *TP53* mutation pattern in tumoral cells. As unstressed cells present low expression levels of P53 with a half-life of about 6–20 min (Filippini, et al., 1998; Harris and Levine, 2005; Steele and Lane, 2005), P53 is not normally detected using conventional immunohistochemical techniques (Cooper and Haffajee, 1997; Filippini, et al., 1998; Harris and Levine, 2005; Levine, et al., 1991; Renninson, et al., 1994). However, this pattern could be affected by mutations in *TP53* or in other related genes. Most *TP53* mutations were located in the DNA binding domain of the protein, and were associated with an increase in protein accumulation which in turns leads to P53 detection, as has been seen previously in primary lung cancer (Gannon, et al., 1990; Steele and Lane, 2005). This feature is currently used as a marker of P53 alterations in tumors (Iacopetta, 2003; Rodrigues, et al., 1990; Walker, et al., 1994).

Previous studies have suggested that P53 accumulation is not a general event in all types of CRC and that differences could be found in tumors developed in specific locations, such as in rectum and left-side colon (but not in right-side colon), indicating a different pattern of tumor growth in relation to P53 status (Iacopetta, 2003; Paluszkiwicz, et al., 2004). Thus, the observation of a positive signal in cancer sections could depend on the tumor location as well as on

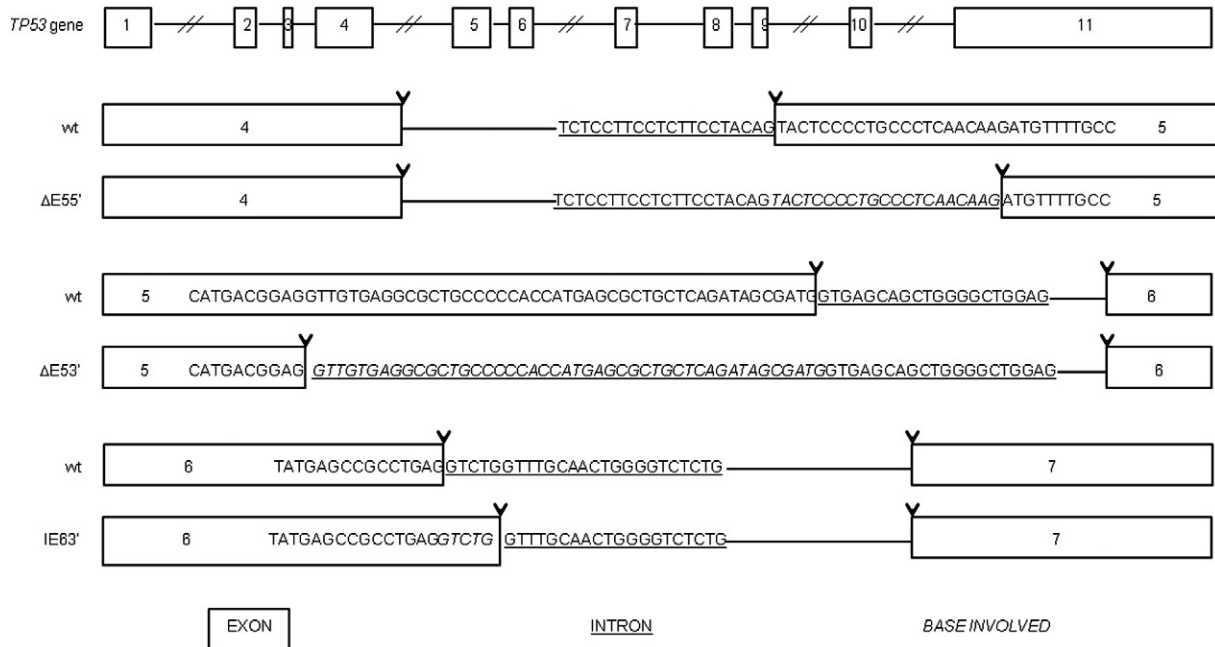


Fig. 3. Schematic representation of deletions and insertion considered as possible splicing mistakes/variants in colorectal tumors. It shows normal (wt) and mutant splicing pattern ($\Delta E55'$ c.376_396del21, $\Delta E53'$ c.514_559del46, and IE63' c.672_673ins5) in each case. Regions detected for each sample in our study are represented with normal letters inside a box, regions corresponding to introns are represented underlined and regions involved in mutations are represented in italics. Sequences surrounding the putative splice sites are represented both in exons and introns involved. $\Delta E55'$: Deletion of 7 aminoacids from the 5' end of exon 5. $\Delta E53'$: Deletion of 12 aminoacids from the 3' end of exon 5. IE63': Insertion of 5 nucleotides to the 3' region of exon 6. E4, E5, E6 and E7: Exons 4, 5, 6, and 7, respectively. I4, I5 and I6: Introns 4, 5 and 6, respectively. Arrows represent the boundaries between introns and exons in both wild type and mutant samples.

the number and type of mutations localized in P53 or other related proteins. In this work we analyzed samples that came from tumors developed all over the colon and rectum, and they were treated as a single group. In the P53 positive detection group, 79.6% of the samples carry a *TP53* mutation, being the vast majority missense mutations but also a frameshift producing insertion was observed. In relation to the remaining samples from this group, namely those that exhibit an altered P53 expression pattern but do not bear any mutation in the *TP53* gene, it is conceivable that other proteins that regulate the P53 expression could be affected, such as HDM2, HDM4, COP-1, PIRH-2, ARF, among others, leading to an increase in P53 amount (Levine, et al., 2006).

On the other hand, only 30.8% of negative P53 samples had mutations in *TP53* coding sequence. This group contained 6 missense changes, 6 frameshift alterations, 2 nonsense mutations and 1 synonymous base substitution. In addition, 1 sample contained a deletion that does not change the reading frame of the protein. Needless to say, these mutations do not induce overexpression or increased stability hence indicating that their mechanisms of action could be substantially different. For the missense mutations, this result may reflect a specific effect of those particular mutations failing to stabilize the protein, as was reported previously (Steele and Lane, 2005). Deleted or truncated proteins resulting from nonsense or frameshift mutations are usually not detectable by immunohistochemical method because these proteins are very unstable in the cell (Greenblatt, et al., 1994).

Between P53 positive and negative detection groups, this different percentage of mutated samples was expected since *TP53* mutations, and in particular missense mutations, are tightly associated to protein accumulation pattern in cancer (Renninson, et al., 1994).

Regarding spatial distribution of *TP53* mutations, in this population of CRC samples point mutations were mainly located at nucleotide sites commonly mutated in other human cancers. For example, codons 175, 248 and 273, which are the most frequently mutated codons in this population, are also frequently mutated in most human tumors and are associated with loss of P53 function, being a possible cause of cellular transformation (Kato, et al., 2003; Petitjean, et al., 2007). Furthermore, we also detected point mutations in another 19 codons located in the region encoding the DNA binding domain of the protein, an observation that gives further support to the generally accepted idea that loss of binding ability of P53 to its DNA binding sites could be an important event in the development of the disease.

Outside DNA binding domain, we detected two affected codons, both located in the Tetramerization Domain, that could interfere with the dimer and tetramer formation: the nonsense mutation c.1045G>T due to the generation of truncated monomers unable to establish properly contacts, while the silent mutation in this domain (c.1014C>T) could affect the structure and dynamics of dimer stabilization during protein translation, since both mechanisms occur at the same time (Nicholls, et al., 2002). Then, these two codons could be implicated, somehow, with the loss of P53 function in malignant mutated cells.

We observed here that the most common base change was C→T transitions, accounting for 49.0% of the nucleotides mutations, followed by the G→A transition representing 26.5%. It has been reported that among single-base substitutions in all type of cancers, about 25% are C:G→T:A substitutions located at CpG sites (Olivier, et al., 2010). It is worth reminding that the methylated cytosines at CpG dinucleotides mutate to Thymine at a rate 10 times higher than other nucleotides (Jones, et al., 1992). About 3%–5% of cytosines in the human genome are methylated at position 5' by a postreplicative mechanism that is restricted to CpG dinucleotides and is catalyzed by DNA methyltransferases. The 5'-methylcytosine (5mC) is less stable than cytosine and undergoes spontaneous deamination into thymine at a rate five

times higher than the unmethylated base. This process is enhanced by oxygen and nitrogen radicals, leading to a higher load of CpG transitions in cancers (Ambs, et al., 1999; Schmutte, et al., 1996; Vaninetti, et al., 2008).

In addition, among the 22 CpG located in the P53 DNA-binding domain, three mutational hotspots (codons 175, 248, and 273) represent 60% of all CpG mutations in cancer, and another five residues (196, 213, 245, 282, and 306) account for 26% of these mutations (Olivier, et al., 2010) and at the same time most of them contain CpG sites. Most of these sites were mutated in the Brazilian population analyzed in this work, which is in agreement with these previous observations.

Finally, it is important to note that we decided to analyze complete mRNA coding region sequences in tumor samples, in order to avoid possible detection biases that can arise due to the analysis of only the gene segment that spans from exons 5 to 8. Although using cDNA sequencing some frameshift mutations can be missed due to Nonsense-Mediated Decay (NMD) that lead to RNA degradation (Hentze and Kulozik, 1999), our approach allowed to assess a direct and complete relationship between the P53 protein and its coding sequence. In addition, this strategy facilitated the detection of possible splicing variants that might have been underestimated in previous analyses.

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.gene.2012.02.011.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), from Brazil, and Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (CHLCC) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) from Uruguay.

References

- Ambs, S., Hussain, S.P., Marrogi, A.J., Harris, C.C., 1999. Cancer-prone oxyradical overload disease. *IARC Sci. Publ.* (150), 295–302.
- Audrezet, M.P., et al., 1993. TP53 gene mutation profile in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 53 (23), 5745–5749.
- Cooper, K., Haffajee, Z., 1997. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. *J. Pathol.* 182 (3), 307–310.
- Fearon, E.R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 479–507.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5), 759–767.
- Filippini, G., et al., 1998. A novel flow cytometric method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry* 31 (3), 180–186.
- Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R., Lane, D.P., 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 9 (5), 1595–1602.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54 (18), 4855–4878.
- Guimaraes, D.P., Hainaut, P., 2002. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 84 (1), 83–93.
- Hainaut, P., Pfeifer, G.P., 2001. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 22 (3), 367–374.
- Harris, S.L., Levine, A.J., 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24 (17), 2899–2908.
- Hastings, M.L., Krainer, A.R., 2001. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (3), 302–309.
- Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307–310.
- Holmila, R., et al., 2010. Profile of TP53 gene mutations in sinonasal cancer. *Mutat. Res.* 686 (1–2), 9–14.
- Iacopetta, B., 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum. Mutat.* 21 (3), 271–276.
- Joerger, A.C., Fersht, A.R., 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 557–582.
- Jones, P.A., Rideout III, W.M., Shen, J.C., Spruck, C.H., Tsai, Y.C., 1992. Methylation, mutation and cancer. *Bioessays* 14 (1), 33–36.
- Kato, S., et al., 2003. Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (14), 8424–8429.

- Lamolle, G., Marin, M., Alvarez-Valin, F., 2006. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutat. Res.* 600 (1–2), 102–112.
- Lee, E.B., et al., 2010. TP53 mutations in Korean patients with non-small cell lung cancer. *J. Korean Med. Sci.* 25 (5), 698–705.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351 (6326), 453–456.
- Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z., 2006. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 13 (6), 1027–1036.
- Maslon, M.M., Hupp, T.R., 2010. Drug discovery and mutant p53. *Trends Cell Biol.* 20 (9), 542–555.
- Nicholls, C.D., McLures, K.G., Shields, M.A., Lee, P.W.K., 2002. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. *J. Biol. Chem.* 277 (15), 12937–12945.
- Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P., 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (1), a001008.
- Paluszkiewicz, P., Berbeć, H., Pawłowska-Wakowicz, B., Cybulski, M., Paszkowska, A., 2004. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. *Cancer Detect. Prev.* 28, 252–259.
- Petitjean, A., et al., 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28 (6), 622–629.
- Renninson, J., et al., 1994. Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in epithelial ovarian cancer using polyclonal antibody CMI: correlation with histopathology and clinical features. *Br. J. Cancer* 69 (3), 609–612.
- Rodrigues, N.R., et al., 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (19), 7555–7559.
- Schmutte, C., Yang, A.S., Nguyen, T.T., Beart, R.W., Jones, P.A., 1996. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 56 (10), 2375–2381.
- Soussi, T., Lozano, G., 2005. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (3), 834–842.
- Soussi, T., Wiman, K.G., 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12 (4), 303–312.
- Steele, R.J.C., Lane, D.A., 2005. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. *Surgeon* 3 (3), 197–205.
- Tazi, J., Bakkour, N., Stamm, S., 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (1), 14–26.
- Vaninetti, N.M., et al., 2008. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.* 47 (4), 275–285.
- Vousden, K.H., Lane, D.P., 2007. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (4), 275–283.
- Walker, C., Robertson, L.J., Myskow, M.W., Pendleton, N., Dixon, G.R., 1994. p53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br. J. Cancer* 70 (2), 297–303.