

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Efeitos de proteínas p53 mutantes associadas à síndrome de Li-Fraumeni na viabilidade celular em condições basais e sob estresse genotóxico**

Dissertação de Mestrado

Bruna Valandro Meneghetti

Porto Alegre, março de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Efeitos de proteínas p53 mutantes associadas à síndrome de Li-Fraumeni na viabilidade celular em condições basais e sob estresse genotóxico**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Bruna Valandro Meneghetti

Orientador: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, março de 2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico

A Deus,  
À minha mãe Elice

# Agradecimentos

A Deus por ser a minha força e por tudo o que tem feito por mim.

À minha querida mãe Elice pelo apoio nos momentos difíceis deste mestrado e compreensão.

À minha orientadora Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro, pela orientação, empenho, apoio, soluções para os problemas (“planos A, B, C...”), correções e amizade.

Aos Prof. Dr. Arnaldo Zaha e Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira pela disponibilidade e sugestões.

Aos meus colegas e ex-colegas dos laboratórios 204, 206 e 210: Martín, Edi, Jéssica, Cris, Nina, Helier, Nathan, Gabi, Tati, João, Fernanda, Sérgio, Jéferson, Laís, Lauren, Marcelo, Alexia, Sofia, Bryan, Eduarda, Guilherme B. S., Guilherme F. B., Filipe e Marina pela amizade, momentos de descontração, sugestões e apoio.

À Sílvia, secretária do PPGBCM, pela ajuda nos momentos finais do mestrado.

À todas as pessoas que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

# Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	8
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni- <i>like</i> (LFL) .....	11
1.2. Proteína p53 .....	14
1.3. Mutações em <i>TP53</i> associadas com a SLF .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Mutagênese sítio-dirigida .....	22
4.2. Cultivo da linhagem celular NCI-H1299 .....	24
4.3. Extração de DNA plasmidial para as reações de transfecção.....	24
4.4. Padronização das condições de transfecção de células NCI-H1299 .....	24
4.5. Avaliação da eficiência de transfecção com os vetores da série pCMV_Neo_Bam por citometria de fluxo .....	25
4.6. Ensaio de viabilidade celular.....	25
4.7. Marcação de células apoptóticas com anexina V e iodeto de propídeo .....	26
4.8. Determinação da concentração de G418 para a seleção de transfectantes	26
4.9. Ensaio clonogênico .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
5.1. Mutagênese sítio-dirigida .....	28
5.2. Padronização das condições de transfecção das células NCI-H1299 .....	29
5.3. Efeitos das proteínas p53 wt e mutantes na viabilidade celular em condições basais .....	31

5.4. Efeitos das proteínas p53 wt e mutantes na sobrevivência celular sob condições de estresse genotóxico.....	35
6. DISCUSSÃO .....	42
7. CONCLUSÕES .....	47
8. PERSPECTIVAS.....	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
Curriculum Vitae resumido .....	54

## Lista de Abreviaturas

CAC – Carcinoma Adrenocortical  
CM – Câncer de mama  
DDB2 – *Damage DNA-binding 2 protein*  
DP – Desvio Padrão  
GFP – *Green Fluorescent Protein*;  
GOF – *oncogenic gain of function*  
LFL – Síndrome de Li-Fraumeni-like  
MDM2 – *Mouse Double Minute-2*  
NER – *Nucleotides excision repair*  
p53 wt – proteína p53 selvagem ou *wild type* p53  
PBS – solução tamponada salina com fosfato  
PUMA – p53 upregulated modulator of apoptosis  
SLF – Síndrome de Li-Fraumeni  
SNC – Sistema Nervoso Central  
UV – radiação ultravioleta  
UVC – radiação ultravioleta C  
XPC – *Xeroderma pigmentosum complementation group C*

## Resumo

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome rara de predisposição a câncer associada a mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53*. As vias de sinalização da proteína p53 estão envolvidas na regulação da apoptose, das paradas do ciclo celular, da senescência e do reparo de danos no DNA. As mutações em p53 mais comumente encontradas em tumores estão distribuídas ao longo do domínio de ligação ao DNA, incluindo a mutação G245S associada à SLF. No entanto, a mutação mais frequentemente associada à SLF nas regiões Sul e Sudeste do Brasil é a mutação R337H, que afeta o domínio de oligomerização de p53. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos em células de p53 mutantes associadas à síndrome de SLF na viabilidade em condições basais e na sobrevivência celular sob estresse genotóxico. Células p53 *null* da linhagem NCI-H1299 foram transfectadas com vetores para a expressão de p53 wt e das mutantes G245S e R337H, e ensaios celulares foram realizados. A mutante R337H inibiu a formação de colônias e diminuiu a viabilidade celular de forma similar ao observado para células com expressão p53 wt, enquanto G245S demonstrou menor influência sobre a viabilidade e sobre a proliferação das células. Após submetidas a estresse genotóxico induzido por meio de exposições à radiação UVC, células com expressão de R337H mostraram-se mais sensíveis à morte celular mesmo quando expostas à baixa dose de UVC. Já as células com a expressão de G245S apresentaram aumento nas taxas de apoptose tardia somente quando submetidas a altas doses de radiação de UVC, assim como nas células com expressão de p53 wt. Dessa forma, foram observadas atividades funcionais similares entre R337H e p53 wt quanto à influência sobre a viabilidade e sobre a proliferação celular, enquanto células com expressão de G245S apresentaram fenótipo celular mais próximo ao p53-*null*. Todavia, G245S demonstrou atividade próxima a de p53 wt ao conferir proteção às células contra morte induzida pela radiação UVC, e a mutante R337H gerou maior sensibilidade para morte celular em condições de estresse genotóxico.

## Abstract

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a hereditary cancer predisposition disorder associated with germline mutations in the *TP53* tumor suppressor gene. The p53 signaling pathways are involved in the regulation of apoptosis, cell cycle arrest, senescence and DNA repair. The p53 mutations found in tumors are commonly distributed along the DNA binding domain, including the G245S mutation associated with LFS. However, the most frequent p53 mutation associated with LFS in Southeast and Southern Brazil is the R337H mutation, which affects the oligomerization domain of p53. Thus, the aim of this study is to analyze the effects of mutant p53 associated with LFS on cell viability at basal conditions and on cell survival in genotoxic stress. Null-p53 NCI-H1299 cell line were transfected with vectors for the expression of wild-type, G245S and R337H p53, and cell assays were performed. The R337H mutant inhibited the colony formation and decreased the cell viability similar to that observed in cells with wt p53 expression, while G245S demonstrated less influence on cell viability. After undergoing genotoxic stress induced by UVC radiation exposures, cells with R337H expression were more sensitive to cell death when exposed to low UVC dose. Cells with G245S expression showed an increase in late apoptosis rates only when subjected to high doses of UVC radiation, as well as cells with wt p53 expression. Thus, similar and functional activities were observed between R337H and wt p53 concerning influence on cell viability and proliferation, with the expression of G245S presented cellular phenotype closer to p53-null. However, G245S demonstrated to confer protection for cell death as seen for wt p53, whereas R337H generated increased of sensitivity to cell death under conditions of genotoxic stress.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni-*like* (LFL)

A síndrome de Li-Fraumeni foi descrita pela primeira vez no ano de 1969 pelos pesquisadores Frederick Li e Joseph Fraumeni, a partir da revisão de 280 registros médicos e 418 atestados de óbito de crianças norte-americanas diagnosticadas com rabdomyossarcoma (neoplasia maligna da musculatura esquelética) de 1960 a 1964. Dentre as famílias dos pacientes analisados, 4 famílias apresentavam alta incidência de sarcomas na infância e câncer de mama em idade jovem (Li & Fraumeni, 1969a). Com base na observação de desses tumores pouco frequentes e em idade precoce, com um padrão de transmissibilidade hereditária, foi descrita uma nova síndrome de câncer familiar (Li & Fraumeni, 1969b). Posteriormente, estudos confirmaram a síndrome de Li-Fraumeni como uma síndrome de predisposição ao câncer com herança autossômica dominante (Lynch *et al.*, 1978; Strong *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988).

O espectro de tumores característicos da SLF inclui sarcoma de tecidos moles e osteosarcoma, tumores cerebrais (em especial carcinoma de plexo coroide), câncer de mama pré-menopausa, carcinoma adrenocortical e leucemias (Li *et al.*, 1988; Olivier *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2009). Estima-se que 50% dos portadores da doença desenvolvam câncer até os 40 anos, e que 90% desenvolvam até os 60 anos de idade (Birch *et al.*, 1998; Lustbader *et al.*, 1992; Birch *et al.*, 2001).

O quadro clínico da Síndrome de Li-Fraumeni Clássica se caracteriza por um probando diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos, seguido de um familiar de primeiro grau diagnosticado com câncer antes dos 45 anos, e um familiar de primeiro ou segundo grau diagnosticado com câncer antes dos 45 anos ou diagnosticado com sarcoma em qualquer idade (Li *et al.*, 1988). Entretanto, há famílias que não se encaixam totalmente nos padrões da Li-Fraumeni Clássica, sendo consideradas Li-Fraumeni-*like* (Quadro 1).

**Quadro 1:** Quadro diagnóstico e critérios clínicos para classificação de pacientes em Síndrome de Li-Fraumeni Clássica e Síndrome de Li-Fraumeni-*like*. SNC – Sistema Nervoso Central; CM – Câncer de mama; CAC – Carcinoma Adrenocortical; SLF – Síndrome de Li-Fraumeni; LFL – Li-Fraumeni-*like*. Modificado de Giacomazzi *et al.*, 2015.

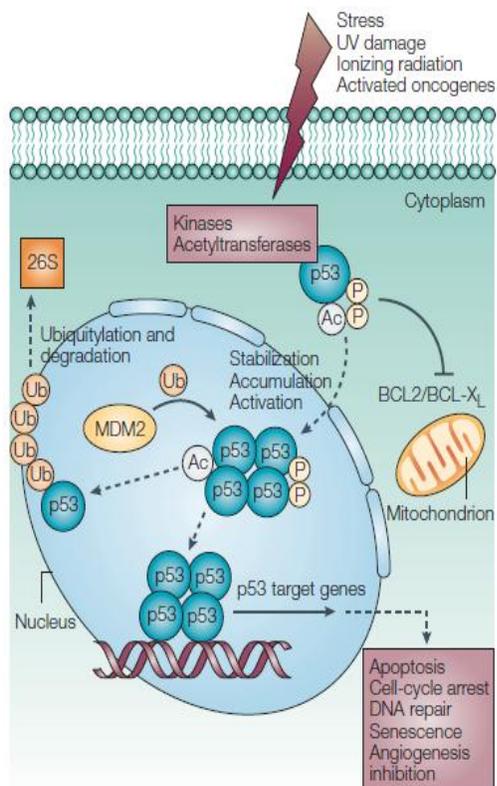
Diagnóstico	Quadro Clínico
SLF – Clássica (Li <i>et al.</i> , 1988)	<p>I - Sarcoma na infância ou em idade jovem (<math>\leq 45</math> anos) <b>e</b></p> <p>II – Familiar de primeiro grau com qualquer tipo de câncer em idade jovem (<math>\leq 45</math> anos) <b>e</b></p> <p>III – Familiar de primeiro e de segundo grau com diagnóstico de câncer em idade jovem (<math>\leq 45</math> anos) ou sarcoma em qualquer idade.</p>
LFL – Birch (Birch <i>et al.</i> , 1994)	<p>I – Câncer na infância (qualquer idade) ou sarcoma, tumor SNC ou CAC (<math>\leq 45</math> anos) <b>e</b></p> <p>II – Familiar de primeiro ou de segundo grau com câncer típico da SLF (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC ou leucemia) em qualquer idade <b>e</b></p> <p>III – Familiar de primeiro ou de segundo grau com câncer <math>&lt; 60</math> anos.</p>
LFL – Eeles (Eeles, 1995)	<p>1)</p> <p>I – Presença de familiares de primeiro ou de segundo com tumor típico de SLF em qualquer idade (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC, leucemia, melanoma, câncer de próstata, câncer de pâncreas).</p> <p>2)</p> <p>I – Diagnóstico de sarcoma em qualquer idade <b>e</b></p>

	<p>II – Diagnóstico de pelo menos outros 2 tumores em familiares de primeiro ou de segundo grau (podendo estar presente no mesmo indivíduo): CM&lt;50 anos, tumor de SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata, câncer de pâncreas &lt;60 anos ou sarcoma em qualquer idade.</p>
<p>LFL – Chompret (Frebourg <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>I – Diagnóstico de sarcoma, tumor SNC, CM ou CAC &lt;36 anos <b>e</b></p> <p>II – Familiar de primeiro ou de segundo grau com câncer (qualquer um dos descritos acima, exceto CM se o probando teve CM) ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade <b>ou</b></p> <p>III – Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo: sarcoma, tumor SNC, CM ou CAC, com o primeiro tumor diagnosticado &lt; 36 anos independente da história familiar <b>ou</b></p> <p>IV – CAC em qualquer idade, independente da história familiar.</p>
<p>LFL – Chompret modificado (Bougeard <i>et al.</i>, 2008; Tinat <i>et al.</i>, 2009)</p>	<p>I – Caso índice com câncer típico da SLF (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC, leucemia e carcinoma brônquio alveolar de pulmão &lt;46 anos <b>e</b></p> <p>II – Familiar de primeiro grau e de segundo grau com câncer típico da SLF &lt; 56 anos (exceto CM se o caso índice tiver esse tumor) ou múltiplos tumores <b>ou</b></p> <p>III – Paciente índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da SLF e o primeiro com &lt;46 anos <b>ou</b></p> <p>IV – CAC ou carcinoma do plexo coroide em qualquer idade ou CM &lt; 36 anos sem mutação dos genes <i>BCRA1</i> ou <i>BCRA2</i>.</p>

A SLF está comumente associada a mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53*. Mutações no gene *TP53* podem ser identificadas em 70% das famílias portadoras da SLF e em 20-40% das famílias portadoras da LFL (Varley *et al.*, 1997). A idade média de diagnóstico de câncer em pacientes com SLF e mutações germinativas em *TP53* é de 25 anos, e o risco cumulativo de desenvolver câncer aos 30 anos de idade é de 50%, chegando a 90% aos 60 anos. Mutações germinativas nos gene *TP53* são consideradas de alta penetrância para a SLF clássica. A penetrância estimada de câncer em homens com mutações no gene *TP53* é de aproximadamente 73%. Em mulheres, a penetrância é completa (100%), devido à alta ocorrência observada de câncer de mama. As mulheres portadoras da SLF tem um risco cumulativo de 49% de desenvolver câncer aos 30 anos, enquanto homens com mutações no gene *TP53* tem um risco de 21% de desenvolver câncer para a mesma idade (McBride *et al.*, 2014; Giacomazzi *et al.*, 2015).

## 1.2. Proteína p53

O gene *TP53* codifica a proteína p53, a qual está envolvida em uma série de rotas de resposta a estresse dentro da célula (Figura 1). A via de sinalização da p53 está envolvida na regulação da apoptose, senescência, autofagia, migração celular e reparo de DNA (Lakin & Jackson, 1999; Fridman & Lowe, 2003; Muller *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2015) as quais são rotas de funções vitais na prevenção do processo de carcinogênese (Hanahan & Weinberg, 2011). Além disso, a p53 é considerada a “guardiã do genoma” visto que desempenha papel central no monitoramento da integridade do genoma (Lane, 1992). A ativação da p53 ocorre em resposta a vários tipos de estresse celular, por exemplo, em resposta a danos no DNA que induzidos pela radiação ultravioleta (UV) (Lakin & Jackson, 1999).



**Figura 1: Ativação da proteína p53 e a resposta celular.**

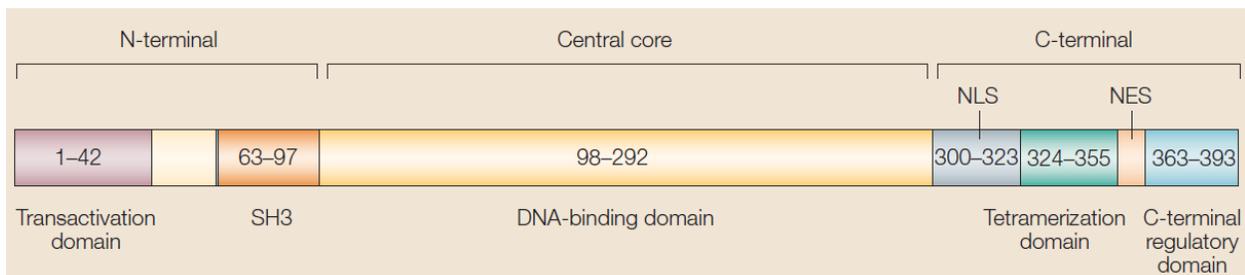
Sinais de estresse ativam a proteína p53 e várias proteínas cinases e/ou acetiltransferases, as quais fosforilam ou acetilam a p53, respectivamente. Essas modificações pós-traducionais geralmente resultam na estabilização e na ativação da p53 no núcleo, onde a p53 interage e liga-se a sítios específicos no DNA de genes-alvo. A ativação transcricional induzida pela p53 leva a diversas respostas celulares, como apoptose, paradas no ciclo celular ou reparo de DNA. Quando a p53 não é mais necessária, sofre ubiquitinação pela proteína MDM2, e é direcionada do núcleo para o citoplasma para ser degradada pelo proteossomo 26S. A p53 pode atuar fora do núcleo para induzir a apoptose por meio da ligação a proteínas anti-apoptóticas, como a proteína Bcl-2. Modificado de Bode & Dong, 2004.

A proteína p53 possui a capacidade de ativar as vias apoptóticas extrínseca e intrínseca na célula. A via extrínseca é ativada por p53 pela indução de genes que codificam os receptores de superfície Fas, DR5 e PERP. A via apoptótica intrínseca é comandada pela família de proteínas Bcl-2, que dirige a liberação de citocromo c das mitocôndrias. Um subconjunto de genes da família Bcl-2 possui promotores que abrigam elementos consenso de resposta a p53, fazendo dos genes codificadores das proteínas Bax, Noxa, PUMA e Bid alvos de ativação de p53. Além disso, p53 também participa diretamente da indução da apoptose na mitocôndria. A localização de p53 na mitocôndria ocorre em resposta a sinais apoptóticos e precede a liberação do citocromo c e a ativação de procaspase-3. A p53 promove a permeabilização da membrana mitocondrial externa formando complexos com as proteínas Bcl-XL e Bcl-2 (Haupt *et al.*, 2003).

A proteína p53 está envolvida na regulação das cinco vias de reparo de dano ao DNA: reparo por excisão de nucleotídeo, reparo por excisão de base, reparo de pareamentos errados, recombinação não-homóloga e recombinação homóloga. p53

mostra-se essencial na via de reparo por excisão de nucleotídeo, que opera em dímeros de pirimidina e em fotoprodutos gerados por radiação UV. Existem duas vias de reparo por excisão de nucleotídeo, a via de reparo genômico global (GGR), que varre todo o genoma, e a via de reparo acoplado à transcrição (TCR), que reconhece lesões associadas à transcrição. A proteína p53 regula a expressão das proteínas XPC e DDB2 da via GGR (Sengupta & Harris, 2005).

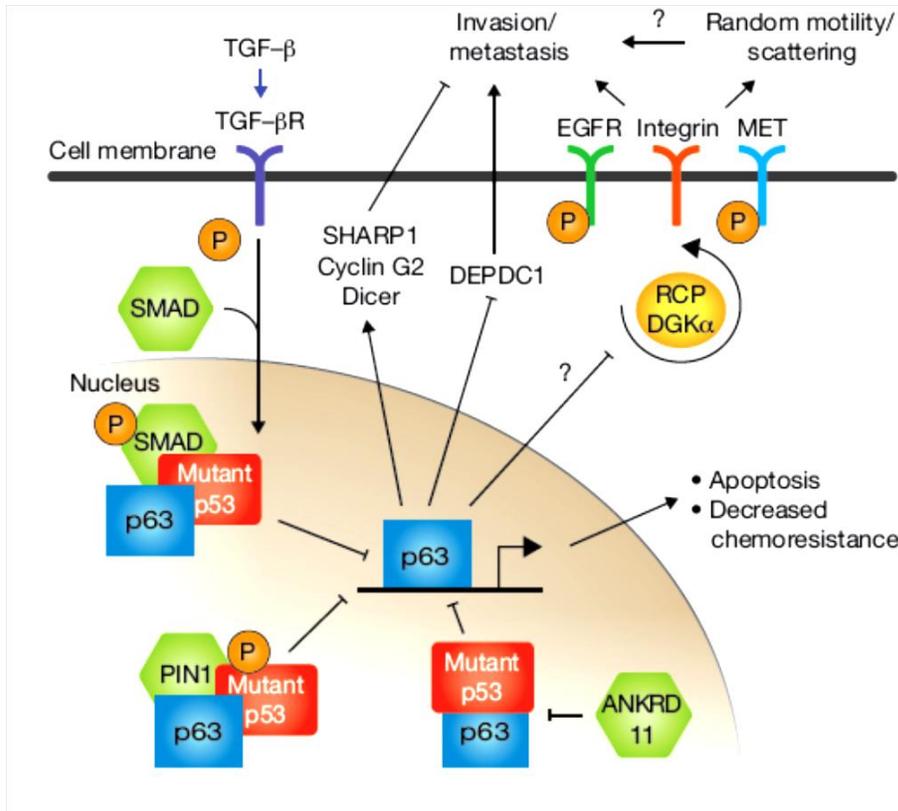
A proteína p53 é composta por 393 aminoácidos e sua cadeia polipeptídica está dividida em 3 regiões principais (Figura 2). A região amino-terminal possui o domínio de ativação transcricional. A região central possui o domínio de ligação ao DNA, e é onde também ocorre a interação da p53 com outras proteínas. A região carboxi-terminal possui o domínio de oligomerização, o qual está envolvido na formação dos tetrâmeros de p53, e os domínios regulatórios com sequências sinal para localização nuclear e para exportação nuclear da proteína (Bode & Dong, 2004).



**Figura 2: Domínios funcionais da proteína p53.** A porção amino-terminal consiste no domínio de transativação e um domínio *Src homology 3-like* (SH3). O domínio de transativação é requerido para a atividade de transativação e interação com vários fatores de transcrição, acetiltransferases e a ubiquitina-ligase MDM2. MDM2 interage com o domínio de transativação da região N-terminal para inibir a atividade transcricional da p53. O domínio SH3 é um domínio rico em prolina que é requerido para interação da p53 com SIN3, o qual protege a p53 da degradação. A porção central consiste no domínio de ligação ao DNA, que é onde ocorre maioria das interações da p53 e suas proteínas-alvo. A porção carboxi-terminal é composta pelo domínio de tetramerização, sinal de exportação nuclear (NES), sinal de localização nuclear (NLS) e domínio regulatório. Modificado de Bode & Dong, 2004.

### 1.3. Mutações em *TP53* associadas com a SLF

A maioria das mutações encontradas no gene *TP53*, tanto em tumores esporádicos quanto em linhagens germinativas, ocorre nos códons 175, 245, 248, 273 e 282 (<http://p53.iarc.fr/>) e são comumente denominadas de mutações *hotspots*. Essas mutações estão amplamente distribuídas ao longo do domínio de ligação ao DNA na região central da p53. A região central de p53 é altamente flexível e cicla rapidamente entre os estados enovelado e desestruturado, tornando essa região frágil. Proteínas p53 mutantes são funcionalmente distintas e podem ativar diferentes rotas em resposta a estresses genotóxicos. As diferentes mutações de p53 apresentam heterogeneidade quanto a perda total de estrutura e função, por exemplo, enquanto certos mutantes apresentam perda total da capacidade de transativação, outros retêm uma capacidade parcial de transativação de um pequeno conjunto de genes alvo (Soussi & Klas, 2007). Proteínas p53 mutantes também podem adquirir funções novas que propiciem o desenvolvimento de tumores, a habilidade chamada ganho de função oncogênico ou *gain of function* (GOF), promovendo em células o aumento da capacidade de invasão, migração, dispersão, angiogênese, sobrevivência e proliferação (Muller & Vousden, 2013); ainda p53 mutantes podem interagir fisicamente com a proteína p63 e inibir a sua atividade antimetastática (Figura 3) (Melino, 2011).



**Figura 3: Proteínas p53 mutantes inibem a função de p63.** A inibição de p63 pela p53 mutante leva a mudanças na expressão de genes como Dicer, DEPDC1, SHARP1 e ciclina G2, e a aumenta a ciclagem de integrinas e de receptores de fatores de crescimento, resultando em invasão e metástase. Várias proteínas, incluindo SMAD2, PIN1 e ANKRD11 podem inibir a capacidade de ligação da mutante p53 à p63. Retirado de Muller & Vousden, 2013.

Mutações em *TP53* associadas a SLF e LFL incluem as mutações G245S, onde ocorre a troca de uma glicina por uma serina no códon 245, a qual está localizada no domínio de ligação ao DNA, e R337H, onde ocorre uma troca de uma arginina por uma histidina no códon 337, localizada no domínio de oligomerização de p53. Essas duas mutações possuem ocorrência nas região sul e sudeste do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2001; Achatz *et al.*, 2007; Giacomazzi *et al.*, 2013; Giacomazzi *et al.*, 2014).

O estudo *in vitro* realizado por DiGiammarino *et al.* (2002) aponta que a mutação R337H afeta a estabilidade do domínio de tetramerização da p53 de forma pH-

dependente. O resíduo de arginina do códon 337 faz parte de uma alfa-hélice envolvida na oligomerização da proteína e a troca da arginina pela histidina romperia a oligomerização em condições mais alcalinas de pH, uma vez que o pKa da histidina é mais baixo que o da arginina. O aumento do pH (pH 8,0) causaria a desprotonação da histidina afetando a ponte salina entre os monômeros, enquanto a ponte salina permaneceria estável entre o pH 5,0 a 9,0 na p53 selvagem. Segundo Ribeiro *et al.* (2001), R337H possui a capacidade de regular genes p53-responsivos e de inibir o crescimento de colônias de células cancerígenas *in vitro*. Entretanto, outro estudo demonstrou que R337H possui capacidade de transativação alterada, necessitando de níveis proteicos mais elevados que o da p53 selvagem para iniciar a transativação de genes (Jordan *et al.*, 2010). Células normais possuem um gradiente de pH intracelular levemente mais ácido que o pH extracelular, e muitas células tumorais mostram um gradiente de pH contrário possuindo um pH intracelular levemente alcalino (Webb *et al.*, 2011). Esse gradiente contrário contribui para a ativação de enzimas da via da glicólise. A atividade de p53 reprime vários componentes da glicólise, e a baixa atividade da mutante R337H sob elevado pH poderia facilitar a adaptação metabólica de células tumorais a glicólise aeróbia (Hafsi & Hainaut, 2011).

A incidência da SLF/LFL tem sido estimada entre 1:2.000-5.000 na Europa e na América do Norte. No entanto, no Brasil, casos em série de pacientes das regiões Sul e Sudeste sugerem que a mutação R337H possui frequência de 1 para cada 300 indivíduos na população em geral. Além disso, em crianças portadoras de tumores adrenocorticais e de tumores do plexo coroide a mutação R337H é encontrada em 80% e 100% dos casos, respectivamente (Giacomazzi *et al.*, 2015). Estudos de haplótipos apontam para a origem da mutação R337H em um efeito fundador. A hipótese é que a mutação teria sido disseminada por tropeiros (mercadores de origem portuguesa), uma vez que as famílias brasileiras portadoras da mutação R337H estão distribuídas ao longo de uma rodovia que liga as cidades de São Paulo e Porto Alegre que historicamente havia sido muito utilizada nos séculos XVIII e XIX por esses mercadores (Garritano *et al.*, 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

A SLF é uma síndrome de predisposição a câncer considerada rara. No Brasil, há a ocorrência de duas mutações na proteína p53 relacionadas à SLF/LFL, G245S e R337H. A mutação R337H possui uma alta frequência na região sul do país, com uma ocorrência estimada em 1 a cada 300 indivíduos. Todavia, ainda são escassos estudos que esclareçam as atividades funcionais a nível celular dessas proteínas mutantes no desenvolvimento de tumores. Assim, estudos comparativos realizados com células que expressam proteínas p53 mutantes, avaliando a sobrevivência, a morte celular e a resposta a danos no DNA, poderá gerar informações sobre as atividades funcionais dessas proteínas e seus possíveis papéis no processo de carcinogênese da SLF/LFL.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de mutações em *TP53* associadas à síndrome de Li-Fraumeni na viabilidade celular em condições basais e em condições de estresse genotóxico.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Construir plasmídeos contendo as sequências codificadoras das proteínas p53 mutantes G245S e R337H para expressão em células humanas *p53-null* NCI-H1299;
- Confirmar a presença das mutações G245S e R337H nos plasmídeos pCMV-Neo-Bam mutados;
- Padronizar as condições de transfecção de células NCI-H1299, utilizando plasmídeo codificador da proteína GFP;
- Transfectar de forma transitória células NCI-H1299 *p53-null* com os vetores de expressão codificadores das proteínas p53 wt, R337H e G245S;
- Avaliar o efeito das mutações R337H e G245S na viabilidade celular em condições basais;
- Avaliar a capacidade clonogênica e a taxa de apoptose de células com expressão das proteínas p53 wt, R337H e G245S sob condições de estresse genotóxico induzido por radiação UVC.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

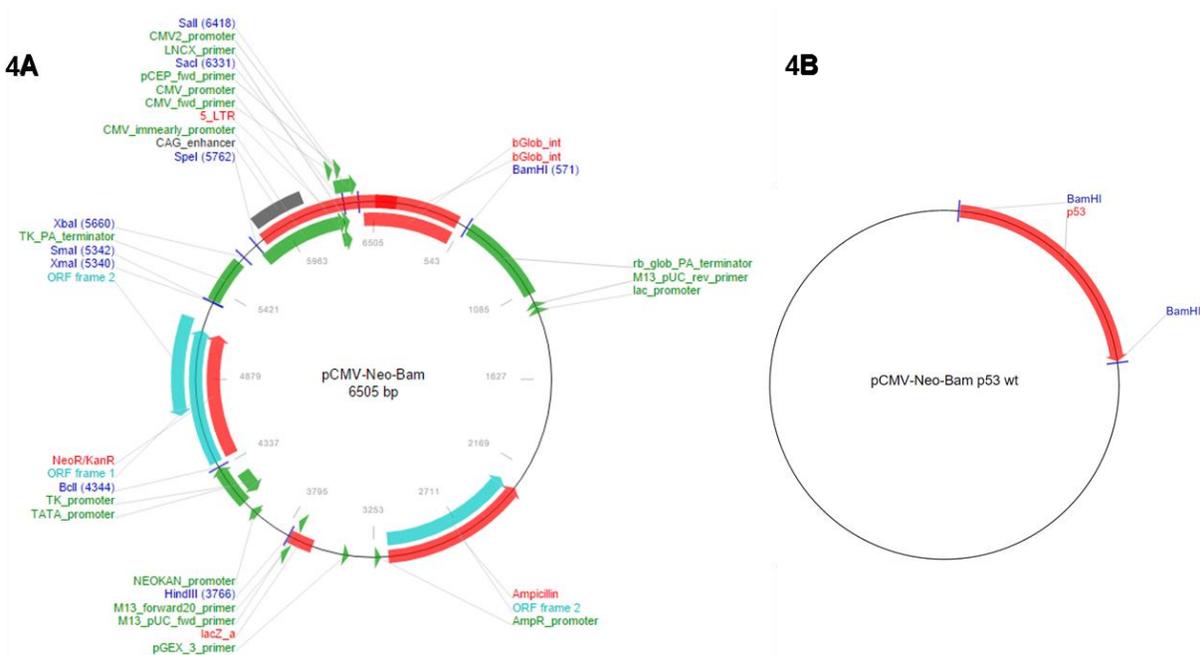
### 4.1. Mutagênese sítio-dirigida

Os vetores pCMV-Neo-Bam (addgene #16440) (Figura 4A) e pCMV-Neo-Bam p53 wt (addgene #16434) (Figura 4B) foram cedidos gentilmente pela Dra. Joanna E. Burdette (University of Illinois at Chicago, USA) e pelo Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, USA). Os plasmídeos pCMV-Neo-Bam p53 G245S e pCMV-Neo-Bam p53 R337H contendo os genes mutantes *TP53* R337H e G245S, respectivamente, foram obtidos por mutagênese sítio-dirigida a partir do vetor pCMV-Neo-Bam p53 wt, utilizando o kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies), conforme recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na geração das mutações G245S (oligonucleotídeos iniciadores G245S\_F e G245S\_R) e R337H (oligonucleotídeos iniciadores R337H\_F e R337H\_R) foram projetados utilizando o programa QuikChange Primer Design ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd)) (Tabela 1). A reação de mutagênese foi utilizada na transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* XL10-Gold (Agilent Technologies). A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001).

As sequências mutantes de *TP53* foram confirmadas por sequenciamento em equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Seqp53\_F e Seqp53\_R (Tabela 1).

**Tabela 1:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de mutagênese sítio-dirigida e sequenciamento.

Nome	Sequência do oligonucleotídeo iniciador
G245S_F	5' – cctccggttcattgctgccatgcaggaac – 3'
G245S_R	5' – gttcctgcatggcagcatgaaccggagg – 3'
R337H_F	5' – ggaacatctcgaagtgtctcacgcccacgg – 3'
R337H_R	5' – ccgtgggcgtgagcacttcgagatgttcc – 3'
Seqp53_F	5' – ttgcgtgtggagtatttgg – 3'
Seqp53_R	5' – tttatggcgggaggttagac – 3'



**Figura 4:** Mapas dos vetores pCMV-Neo-Bam (addgene #16440) (4A) e pCMV-Neo-Bam p53 wt (addgene #16434) (4B). Retirado de <https://www.addgene.org/16440/>

## 4.2. Cultivo da linhagem celular NCI-H1299

A linhagem celular NCI-H1299 (ATCC CRL-5803) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, 4,5 g/L glicose, 10 mM piruvato de sódio, 25 mM HEPES, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) a 37 °C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

## 4.3. Extração de DNA plasmidial para as reações de transfecção

Os plasmídeos pLL3.7 (addgene #11795), pCMV-Neo-Bam (addgene #16440), pCMV-Neo-Bam p53 wt (addgene #16434), pCMV-Neo-Bam p53 G245S e pCMV-Neo-Bam p53 R337H utilizados nas reações de transfecção foram utilizados para transformações por eletroporação em *E. coli* XL-1 *Blue*, e o DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o kit GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep (Sigma Aldrich), segundo recomendações do fabricante.

## 4.4. Padronização das condições de transfecção de células NCI-H1299

Células NCI-H1299 foram cultivadas em placa de 96 poços por 24 h antes das reações de transfecção. As células foram transfectadas com 100 ng do plasmídeo codificador da proteína GFP, o vetor pLL3.7, utilizando diferentes reagentes de transfecção. O vetor pLL3.7 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Guido Lenz (UFRGS). Conforme recomendações dos fabricantes, foram utilizadas para as transfecções 5 x 10<sup>3</sup> células (50% de confluência) e 0,4 µl do reagente FuGENE HD (Promega); 9 x 10<sup>3</sup> células (90% de confluência) e 0,2 µl de Lipofectamine 2000 (Life Technologies); e 7 x 10<sup>3</sup> células (70% de confluência) e 0,2 µl de Lipofectamine LTX com 0,1 µl do reagente PLUS (Life Technologies). As transfecções foram realizadas em duplicata. Após a

transfecção, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino na ausência de antibióticos. A luminescência foi monitorada no equipamento SpectraMax i3 (Molecular Devices).

#### **4.5. Avaliação da eficiência de transfecção com os vetores da série pCMV-Neo-Bam por citometria de fluxo**

A eficiência das transfecções com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam (addgene #16440), pCMV-Neo-Bam p53 wt (addgene #16434), pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S nas condições padronizadas foi avaliada por citometria de fluxo. Quarenta e oito horas e 72 h após a transfecção, as células foram tripsinizadas, fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS pH 7,4 por 30 min em gelo e incubadas em etanol 80% a -20°C por pelo menos 16 h. Após, as células foram centrifugadas a 300 x g por 10 min e ressuspensas em 1 ml de tampão de incubação (0,5% BSA/ 0,5% Tween-20 em PBS pH 7,4) por 2 vezes, e centrifugadas novamente. As células foram incubadas com o anticorpo primário anti-p53 (sc-126, Santa Cruz) na diluição 1:50 por 16 h e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (sc-2092, Santa Cruz) na diluição 1:100 por 1 h, ambos diluídos no tampão de incubação. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Guava easyCyte (Millipore). Como controle negativo foi utilizada a linhagem NCI-H1299 transfectada com o plasmídeo pCMV-Neo-Bam, e como controle positivo foi utilizada a linhagem celular A549 após 6 h de exposição a 30 J/m<sup>2</sup> de UVC totais.

#### **4.6. Ensaio de viabilidade celular**

Foram transfectadas 6X10<sup>5</sup> células da linhagem NCI-H1299 com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam (addgene #16440), pCMV-Neo-Bam p53 wt (addgene #16434), pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S utilizando o reagente Lipofectamine LTX Plus nas mesmas condições do item 4.5. As células foram

semeadas 24 horas antes das transfecções para adesão em garrafas T-25. Após 24 h e 48h de ocorridas as transfecções, as células foram tripsinizadas e coradas com azul de tripan. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

#### **4.7. Marcação de células apoptóticas com anexina V e iodeto de propídeo**

Vinte e quatro horas após as transfecções, as células foram tripsinizadas,  $1 \times 10^5$  células foram semeadas e cultivadas por 24 h em placas de 24 poços. As células foram então expostas a 0, 10 J/m<sup>2</sup> e 50 J/m<sup>2</sup> de UVC totais para indução de estresse genotóxico. Após 24 h, o meio foi coletado e as células foram tripsinizadas, marcadas com anexina V e iodeto de propídeo utilizando o kit Dead Cell Apoptosis Kit (Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. As células foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento Guava easyCyte (Millipore).

#### **4.8. Determinação da concentração de G418 para a seleção de transfectantes**

Células NCI-H1299 foram cultivadas em placas de 12 poços a 80% de confluência e tratadas por 10 dias com diferentes concentrações do antibiótico G418 (200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml e 600 µg/ml) (Sigma Aldrich). O meio seletivo foi renovado a cada 2-3 dias. A morte celular foi inspecionada diariamente de forma visual e, ao final de 10 dias, as células foram coradas com azul de tripan a fim de determinar a concentração mínima necessária para provocar 100% de morte celular. O experimento foi realizado em duplicata.

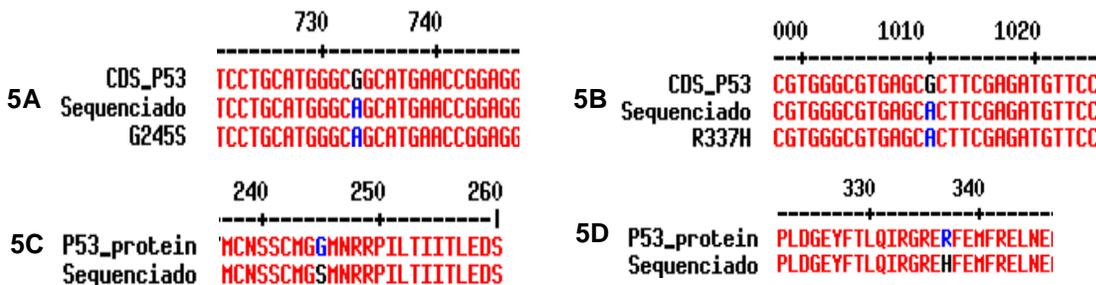
#### 4.9. Ensaio clonogênico

Vinte e quatro horas após as transfecções, as células foram recuperadas por tripsinização e  $3 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas por 24 h. Em seguida, as células foram expostas a diferentes doses de UVC (0 J/m<sup>2</sup>, 10 J/m<sup>2</sup> e 50 J/m<sup>2</sup> de radiação UVC totais) para indução de estresse genotóxico. Vinte e quatro horas após a exposição ao UVC, as células foram mantidas meio contendo G418 (500 µg/ml). Após 10 dias de crescimento, as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4, fixadas com glutaraldeído (6,0% v/v), coradas com solução de cristal violeta (5% cristal violeta, 25% metanol em água destilada), e as colônias foram contadas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A fração de sobrevivência das células foi calculado conforme Franken *et al.* (2006). As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.01, utilizando ANOVA (um fator) com teste de Tukey para múltiplas comparações.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Mutagênese sítio-dirigida

As mutações G245S e R337H na sequência codificadora da proteína p53 foram confirmadas por sequenciamento (Figura 1) nos plasmídeos mutantes pCMV-Neo-Bam p53 G245S e pCMV-Neo-Bam p53 R337H, respectivamente, obtidos a partir de mutagênese sítio-dirigida do vetor pCMV-Neo-Bam p53 wt. Para a mutação G245S ocorreu a troca do nucleotídeo 733 de uma guanina por uma adenina, assim ocorreu a troca no códon 245 de uma glicina por uma serina. Para a mutação R337H ocorreu a troca do 1010 nucleotídeo de uma guanina por uma adenina, assim ocorreu a troca no códon 337 de uma arginina por uma histidina.

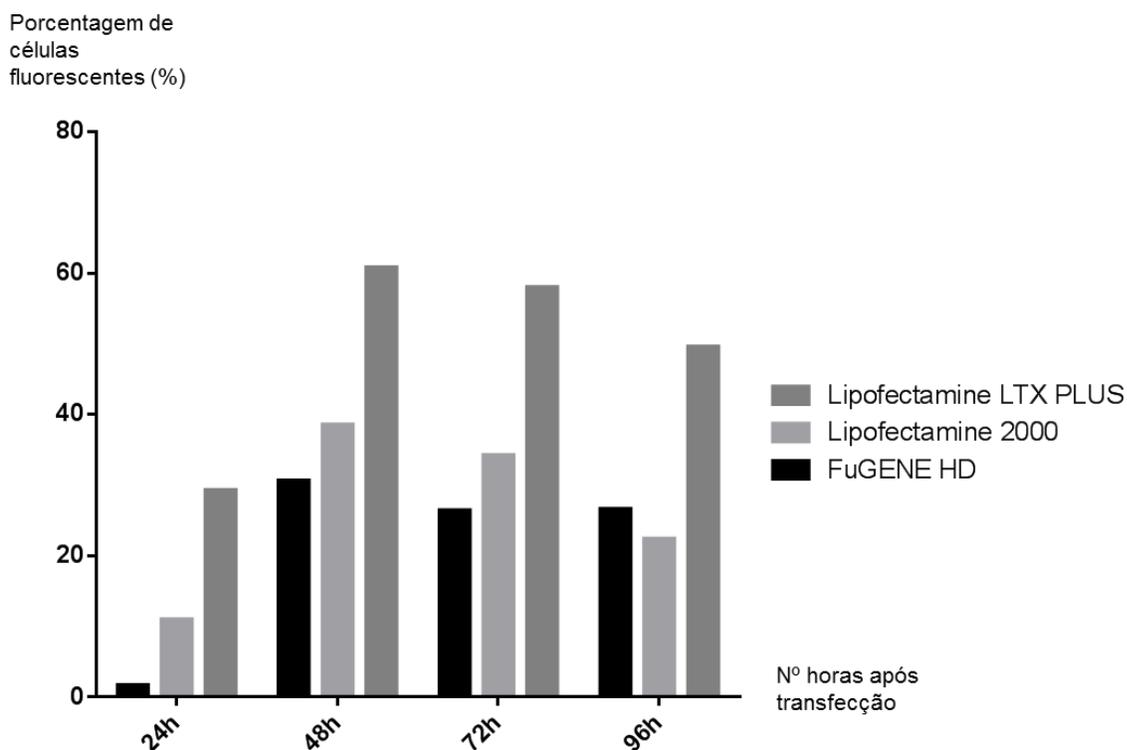


**Figura 5: Plasmídeos pCMV-Neo-Bam contendo as mutações G245S e R337H no gene TP53.**

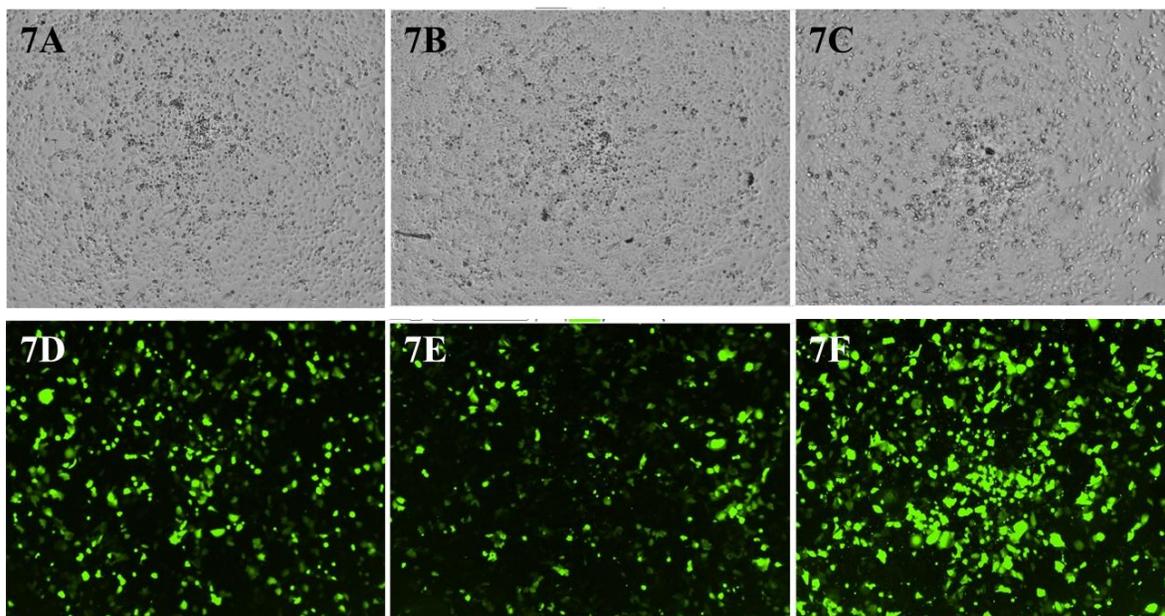
São apresentados os resultados obtidos do sequenciamento dos plasmídeos contendo as mutações G245S (**5A**) e R337H (**5B**) nas quais ocorreu a troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 733 e 1010, respectivamente. Para mutação G245S (**5C**) ocorreu a troca da guanina por uma adenina no códon 245. Para mutação R337H (**5D**) ocorreu troca da glicina por uma serina no códon 337. São mostrados alinhamentos de sequência de nucleotídeos e de aminoácidos realizados no programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Para testar as condições ótimas de transfecção das células NCI-H1299 de modo a obter uma boa eficiência de transfecção plasmidial para os experimentos subsequentes, foram realizados ensaios utilizando o plasmídeo pLL3.7, que codifica a

proteína GFP, e diferentes reagentes de transfecção comercialmente disponíveis (Figuras 6 e 7). O reagente não-lipossomal FuGENE HD apresentou baixa eficiência de transfecção quando comparado aos reagentes baseados em lipossomos, Lipofectamine 2000 e Lipofectamine LTX Plus. Para todos os reagentes, a porcentagem máxima de células fluorescentes foi observada 48 h após a transfecção, correspondendo a 31%, 39% e 61% para os reagentes FuGENE HD, Lipofectamine 2000 e Lipofectamine LTX Plus, respectivamente (Figura 6). Esses números se mantiveram relativamente estáveis 72 h após a transfecção e apresentaram uma pequena diminuição em 96 h. Sendo assim, o reagente Lipofectamine LTX Plus foi escolhido para os experimentos de transfecção subsequentes e o tempo de 48-72 h padronizado para a máxima expressão do transgene.



**Figura 6: Avaliação da eficiência de transfecção de células NCI-H1299 utilizando o plasmídeo pLL3.7 e diferentes reagentes de transfecção.** A fluorescência foi monitorada de 24 h a 96 h após as transfecções com o plasmídeo pLL3.7 codificador da proteína GFP, utilizando os reagentes FuGENE HD, Lipofectamine 2000 e Lipofectamine LTX Plus. Os dados representam a média das porcentagens de células fluorescentes devido à expressão da proteína GFP, e os experimentos foram realizados em duplicata.

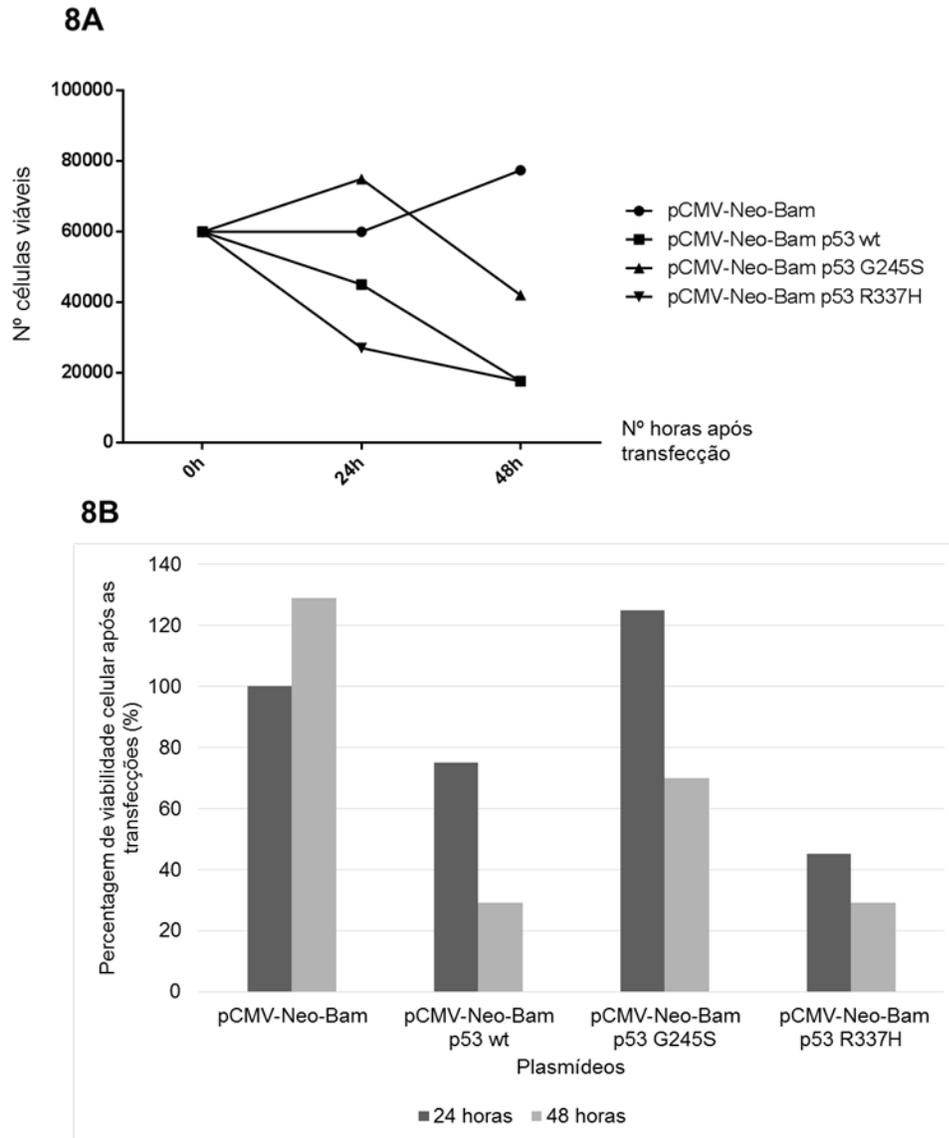


**Figura 7: Células NCI-H1299 transfectadas com o plasmídeo pLL3.7, utilizando diferentes reagentes de transfecção após 72 horas.** Células transfectadas com o reagente FuGENE HD são mostradas em microscopia de luz (7A) e em microscopia de fluorescência (7D). Células transfectadas com o reagente Lipofectamine 2000 são mostradas em microscopia de luz (7B) e em microscopia de fluorescência (7E). Células transfectadas com o reagente Lipofectamine LTX Plus são mostradas em microscopia de luz (7C) e em microscopia de fluorescência (7F). Expressão da proteína GFP visualizada pela emissão de fluorescência verde. Imagens obtidas com aumento de 40X.

### 5.3. Efeitos das proteínas p53 wt e mutantes na viabilidade celular em condições basais

A viabilidade celular foi avaliada 24 h e 48 h após as transfecções. A expressão de p53 wt e da mutante R337H apresentou impacto negativo sobre a viabilidade celular, ocorrendo diminuição no número de células viáveis em 24 h e 48 h após as transfecções (Figura 8A). Vinte e quatro horas após as transfecções, o número de células viáveis expressando p53 wt e R337H diminuiu ~25% e ~55%, respectivamente, e em 48 h os números de células viáveis diminuíram ~70% para ambos os transgenes. A expressão da proteína p53 mutante G245, por sua vez, levou a um aumento de 25%

no número de células viáveis 24 h após a transfecção e uma redução de ~50% no número de células viáveis 48 h após a transfecção (Figura 8B).



**Figura 8: Número de células viáveis (8A) e porcentage de células viáveis (8B) após transfecções com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam, pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S em condições basais. A viabilidade celular foi avaliada 24 h e 48 h após as transfecções (n=1).**

A eficiência de transfecção das células NCI-H1299 com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam p53 wt e mutantes e a expressão das proteínas correspondentes foi avaliada por citometria de fluxo 48 h e 72 h após a transfecção (dados não mostrados). Apenas ~15-30% das células viáveis após 48 h e 72 h da transfecção com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam p53 wt e pCMV-Neo-Bam p53 R337H expressavam as proteínas correspondentes. Esses baixos números provavelmente refletem o efeito negativo da expressão das proteínas p53 wt e R337H na viabilidade celular, como demonstrado no ensaio de viabilidade celular com azul de tripan (Figuras 8A e 8B). Por outro lado, 87% das células transfectadas com o vetor pCMV-Neo-Bam p53 G245S expressavam a proteína correspondente em 72 h. Esse resultado pode estar relacionado com a maior sobrevivência desses transfectantes em relação aos transfectantes pCMV-Neo-Bam p53 wt e pCMV-Neo-Bam p53 R337H, como observado também no ensaio de viabilidade celular. Além disso, o resultado obtido com os transfectantes pCMV-Neo-Bam p53 G245S demonstra que a eficiência de transfecção obtida com os plasmídeo da série pCMV-Neo-Bam é alta.

Sendo assim, a diferença na porcentagem de células expressando as diferentes proteínas p53 após transfecção com os vetores pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S provavelmente se deve ao efeito de cada proteína na viabilidade celular. A maioria das células com expressão das proteínas p53 wt e R337H morreu 24-48 h após a transfecção, por isso apenas uma pequena porcentagem das células sobreviventes expressa as proteínas correspondentes em 48-72 h.

A sobrevivência dos transfectantes também foi avaliada por ensaio clonogênico. As células foram mantidas por 10 dias em meio seletivo contendo 500 µg/ml de G418, conforme determinado no ensaio de curva de morte (dados não mostrados). As diferentes construções mostraram diferenças estatisticamente significativas na capacidade clonogênica dos transfectantes (Figura 9). Enquanto as células transfectadas com o vetor pCMV-Neo-Bam formaram um grande número de colônias, os transfectantes expressando p53 wt e mutantes apresentaram capacidade clonogênica significativamente menor. Entre as células expressando p53, foi observada

uma capacidade clonogênica maior nas células com expressão de G245S, e a menor capacidade clonogênica nas células com expressão de p53 wt e R337H.

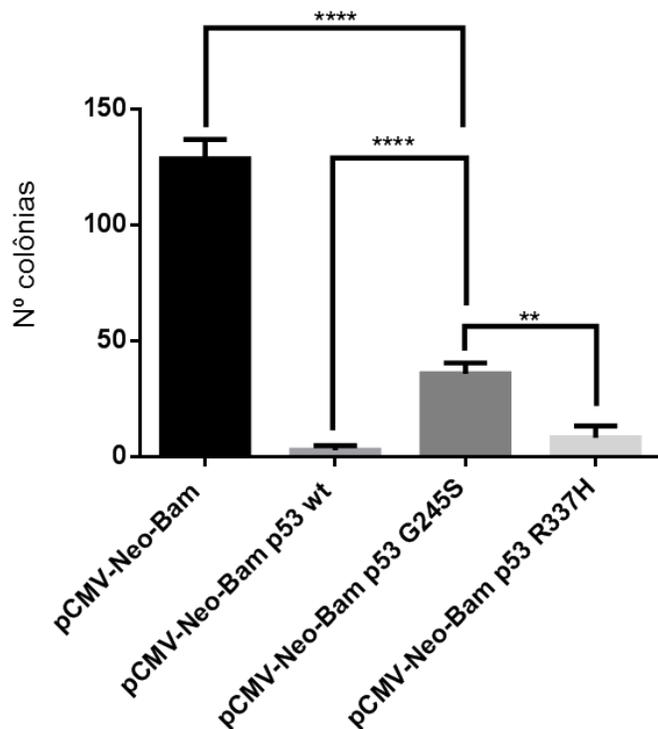
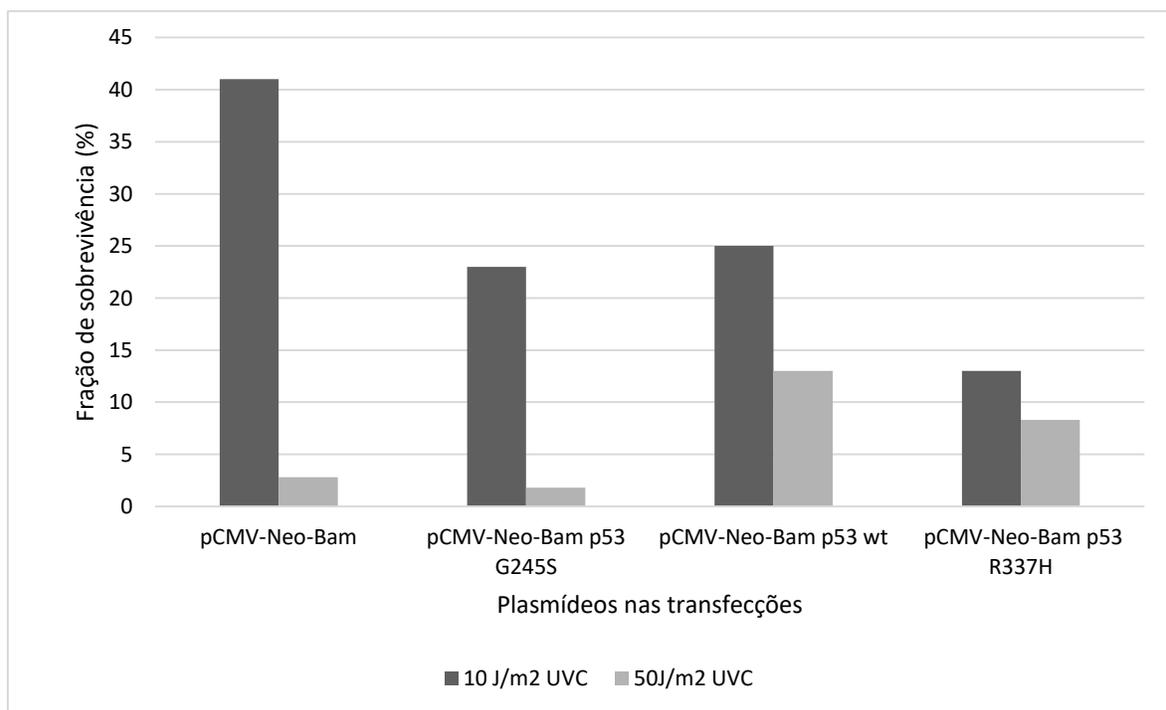


Figura 9: Formação de colônias de células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam, pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S em condições basais. Dados representam média ± DP do número de colônias formado nas amostras (\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, n = 3).

#### 5.4. Efeitos das proteínas p53 wt e mutantes na sobrevivência celular sob condições de estresse genotóxico

O efeito das diferentes proteínas p53 na sobrevivência celular em resposta ao dano no DNA foi avaliado. O cálculo da fração sobrevivente do ensaio clonogênico após o tratamento com 10 J/m<sup>2</sup> de UVC totais apresentou números variados entre os

transfectantes expressando p53 (~13-25%), correspondendo a metade da fração sobrevivente observada para as células transfectadas com o plasmídeo controle pCMV-Neo-Bam (~40%) (Figura 10). Para as células expostas a 50 J/m<sup>2</sup> de UVC totais, observa-se a maior fração celular sobrevivente para células com expressão de p53 wt seguido pelas células com expressão de R337H, enquanto as células com expressão de G245S e do plasmídeo controle apresentam as menores frações de sobrevivência celular. Os resultados sugerem que na presença de dano no DNA gerado por uma alta dose de radiação (50 J/m<sup>2</sup> UVC totais) uma maior funcionalidade das proteínas p53 pode estar relacionada com uma maior sobrevivência celular. Isso se deve ao fato de que proteínas capazes de ativar uma resposta transcricional frente ao dano no DNA (p53 wt e R337H) contribuem para uma maior sobrevivência celular em comparação com os transfectantes que não expressam p53 (pCMV-Neo-Bam) ou expressam uma proteína incapaz de realizar transativação (p53 G245S).



**Figura 10: Fração de sobrevivência das células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam, pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 G245S e pCMV-Neo-Bam p53 R337H sob condições de estresse genotóxico após a exposição a diferentes doses de radiação UVC.**

Os transfectantes foram também avaliados quanto as taxas de apoptose inicial (células marcadas com anexina V<sup>+</sup>/ iodeto de propídio<sup>-</sup>) e de apoptose tardia (células marcadas com anexina V<sup>+</sup>/ iodeto de propídio<sup>+</sup>) 24 h após exposição à radiação UVC (Figuras 11 a 14). As células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam, pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam G245S e pCMV-Neo-Bam R337H não apresentaram diferenças nas taxas de apoptose inicial para ambas as condições exposta à radiação UVC e não exposta à radiação UVC. Houve um aumento na porcentagem de apoptose tardia nos transfectantes com expressão das proteínas p53 wt, G245S e R337H após tratamento com UVC, enquanto as células transfectadas com o plasmídeo controle pCMV-Neo-Bam não pareceram responder à radiação. As células com expressão de p53 wt e de G245S apresentaram maior porcentagem de apoptose tardia (~38%) quando tratadas com 50 J/m<sup>2</sup> de UVC, contudo quando tratadas com 10 J/m<sup>2</sup> de UVC totais não apresentaram diferenças nas taxas de apoptose tardia em relação ao controle (não exposto à radiação). Células com expressão de R337H apresentaram taxas semelhantes de apoptose tardia quando tratadas com 10 J/m<sup>2</sup> e 50 J/m<sup>2</sup> de radiação UVC totais (~35% e ~38%, respectivamente), já apresentando ativação de morte celular por apoptose com a dose de radiação mais baixa.

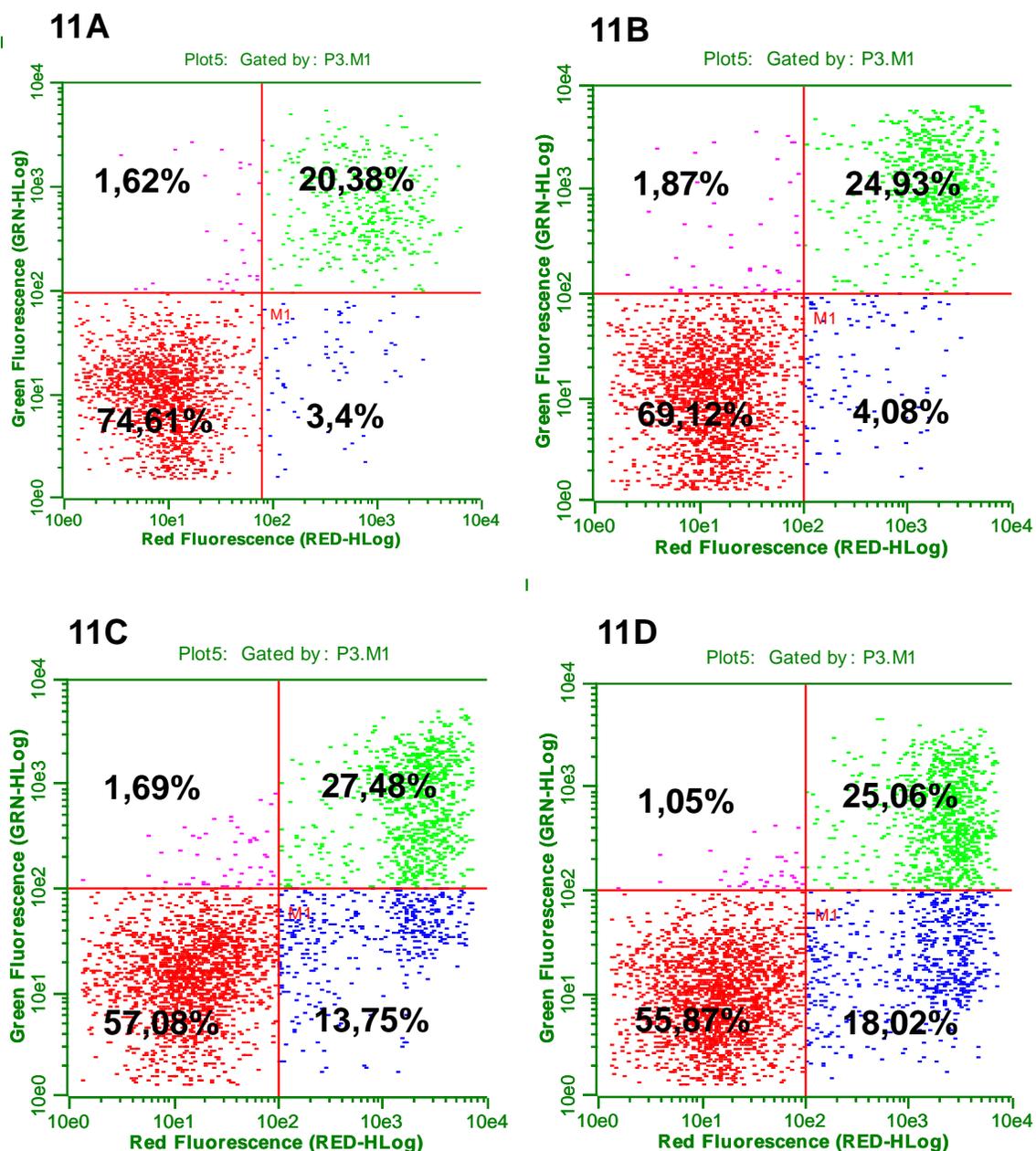
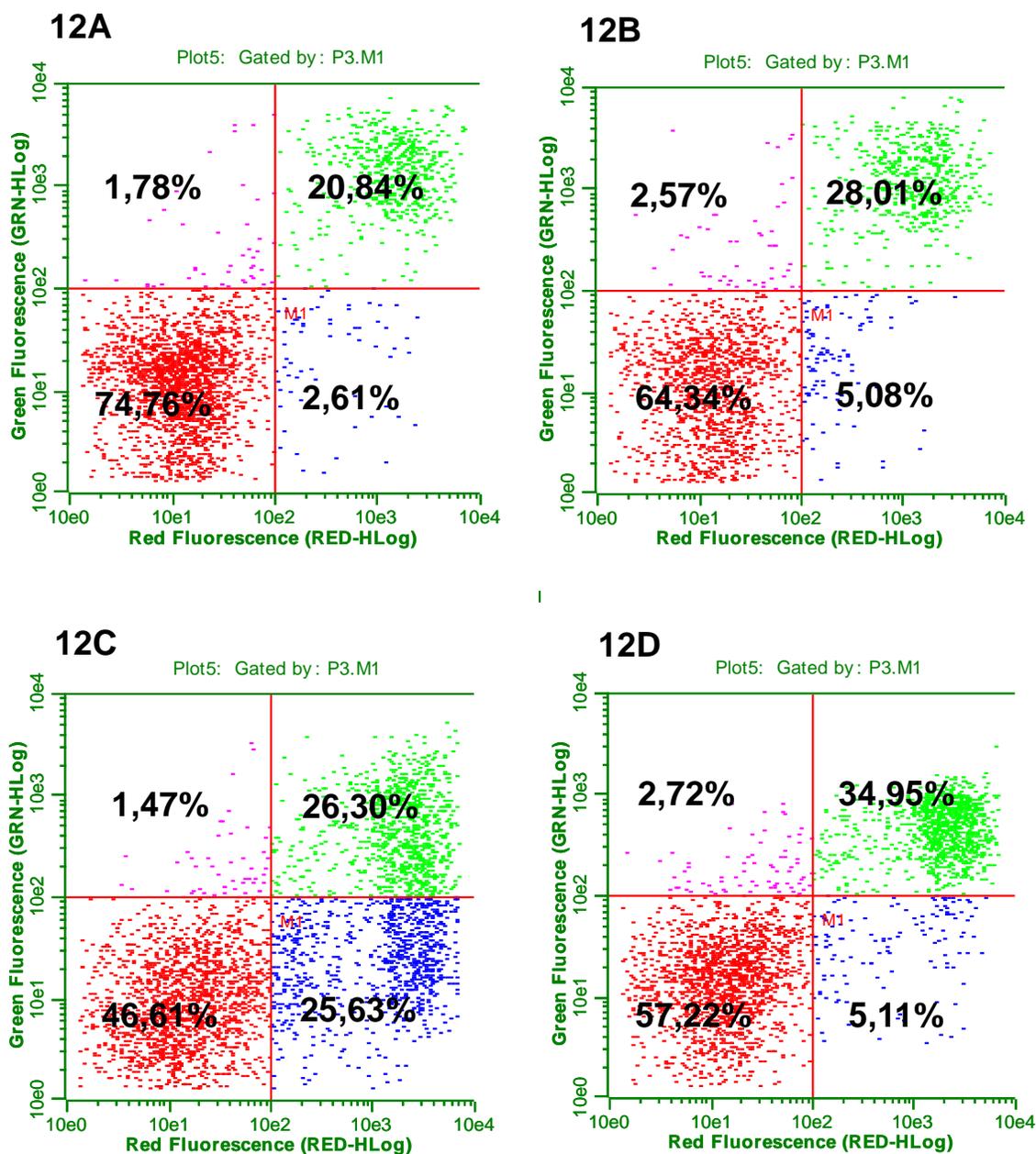
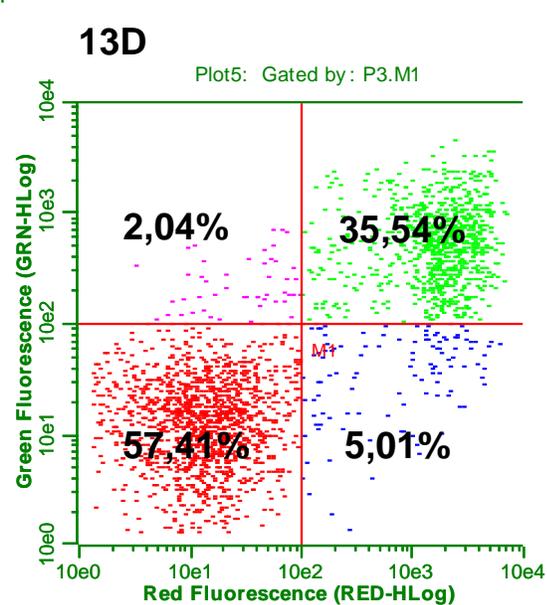
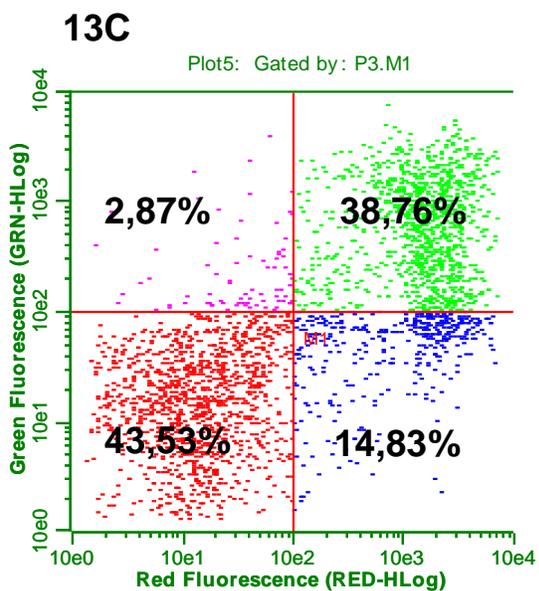
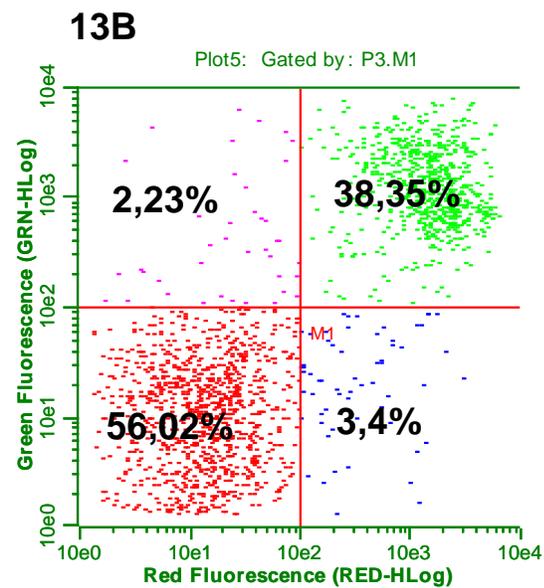
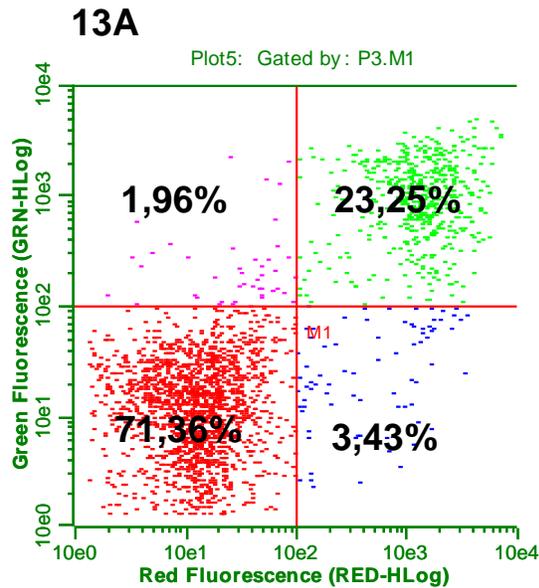


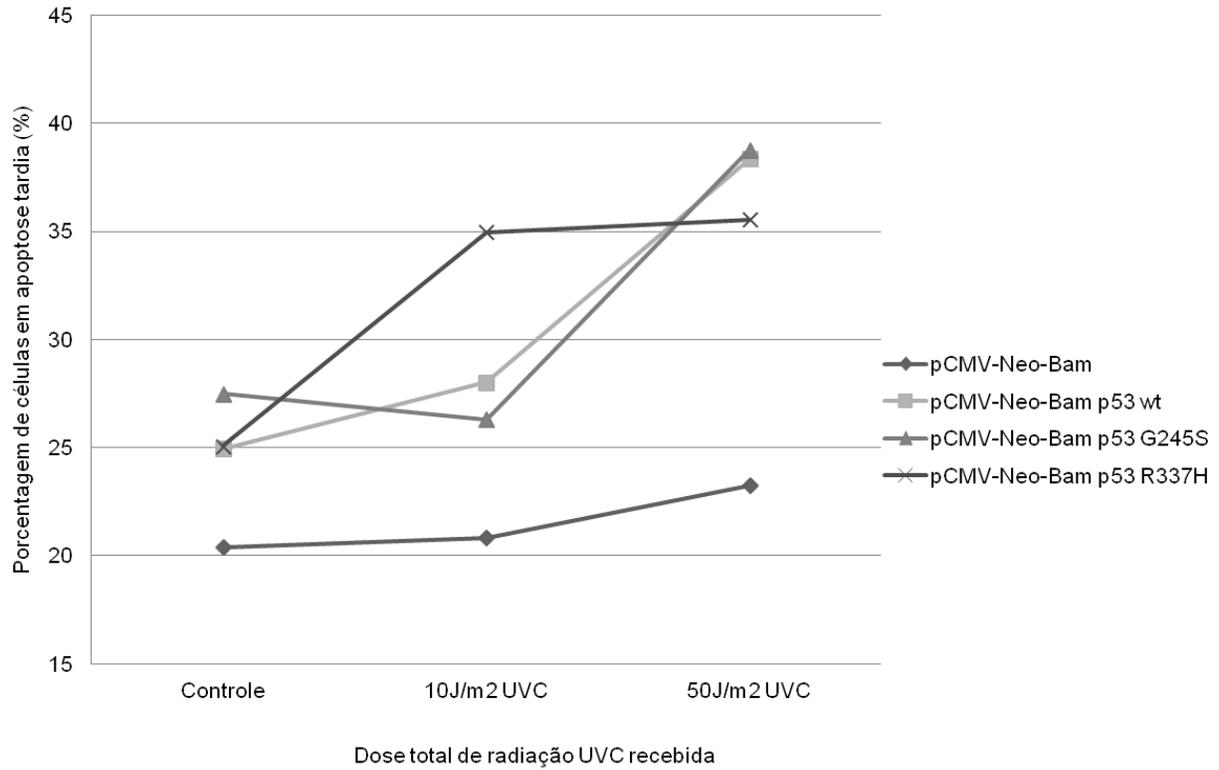
Figura 11: Morte de células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam (11A), pCMV-Neo-Bam p53 wt (11B), pCMV-Neo-Bam p53 G245S (11C) e pCMV-Neo-Bam p53 R337H (11D) sob condições basais em 24 horas sem exposição à radiação UVC. Resultados foram obtidos por citometria de fluxo. No eixo vertical, são mostradas as células com a marcação de anexina V (apoptose). No eixo horizontal, são mostradas as células com a marcação de iodeto de propídio (necrose). As porcentagens de células marcadas são mostradas para cada quadrante (n=1).



**Figura 12:** Morte de células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam (12A), pCMV-Neo-Bam p53 wt (12B), pCMV-Neo-Bam p53 G245S (12C) e pCMV-Neo-Bam p53 R337H (12D) sob condições de estresse genotóxico após 24 horas de ocorrida a exposição à 10 J/m<sup>2</sup> UVC totais. Resultados foram obtidos por citometria de fluxo. No eixo vertical, são mostradas as células com a marcação de anexina V (apoptose). No eixo horizontal, são mostradas as células com a marcação de iodeto de propídio (necrose). As porcentagens de células marcadas são mostradas para cada quadrante (n=1).



**Figura 13: Morte de células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam (13A), pCMV-Neo-Bam p53 wt (13B), pCMV-Neo-Bam p53 G245S (13C) e pCMV-Neo-Bam p53 R337H (13D) sob condições de estresse genotóxico após 24 horas de ocorrência a exposição à 50 J/m<sup>2</sup> UVC totais. Resultados foram obtidos por citometria de fluxo. No eixo vertical, são mostradas as células com a marcação de anexina V (apoptose). No eixo horizontal, são mostradas as células com a marcação de iodeto de propídio (necrose). As porcentagens de células marcadas são mostradas para cada quadrante (n=1).**



**Figura 14:** Avaliação da porcentagem de células em apoptose tardia transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam, pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 G245S e pCMV-Neo-Bam p53 R337H em 24 h após a exposição a diferentes doses de radiação UVC. Foram avaliadas células em apoptose tardia (anexina V<sup>+</sup>/ iodeto de propídio<sup>+</sup>). Resultados foram obtidos por citometria de fluxo (n=1).

## 6. DISCUSSÃO

A maioria das mutações encontradas no gene *TP53* ocorrem nos códons distribuídos ao longo do domínio de ligação ao DNA, incluindo a mutação G245S associada à SLF e LFL. Já a mutação R337H, que possui uma alta frequência descrita no sul do país, está localizada no domínio de oligomerização e sua estabilidade na forma tetramérica é descrita como pH-dependente (Giacomazzi *et al.*, 2015). Todavia, são escassos estudos funcionais que esclareçam as atividades dessas proteínas mutantes em células. Desse modo, para o estudo de efeitos produzidos pelas mutantes G245S e R337H em células foram gerados plasmídeos que possuíam as sequências codificadoras dessas proteínas no vetor de expressão eucariótico pCMV-Neo-Bam.

O plasmídeo pCMV-Neo-Bam p53 wt possui a sequência codificadora da proteína p53 clonada no sítio BamHI. Assim, os plasmídeos mutantes pCMV-Neo-Bam p53 R337H e pCMV-Neo-Bam p53 G245S puderam ser obtidos a partir de mutagênese sítio-dirigida do vetor pCMV-Neo-Bam p53 wt. A mutagênese consistiu na síntese dos plasmídeos mutantes pela DNA polimerase Pfu Ultra e na digestão do DNA parental (DNA metilado e hemimetilado) para aumento da eficiência na seleção dos vetores mutantes sintetizados, uma vez que o DNA é metilado pela maioria das cepas de *E. coli* (Nelson & McClelland, 1992). Os vetores da série pCMV-Neo-Bam utilizados possuem duas unidades de transcrição independentes. A primeira unidade é composta por um promotor CMV a montante do sítio múltiplo de clonagem BamHI, e sítios de *splicing* e de poliadenilação para um forte nível de expressão. A segunda unidade de transcrição inclui o promotor da timidina quinase do vírus do herpes simples (HSV) a montante do gene de resistência à neomicina (gene neo). O gene neo codifica a enzima amino-glicosídeo 3'-fosfotransferase que permite a utilização do antibiótico G418 para seleção das células transfectadas. O G418 bloqueia a síntese da cadeia polipeptídica nos ribossomos 70S e 80S (Eustice & Wilhelm, 1984).

A linhagem celular de carcinoma de pulmão NCI-H1299 foi escolhida para o desenvolvimento dos modelos celulares isogênicos utilizados nesse trabalho pelo fato de conter uma deleção no gene *TP53*, a qual leva a perda total da expressão da proteína p53 (<https://www.atcc.org/products/all/CRL-5803.aspx#characteristics>). Sendo

assim, essa linhagem celular representa um modelo interessante para o estudo comparativo das diferenças funcionais apresentadas entre proteínas p53 wt e mutantes, visto que permite perceber efeitos diretos causados por mutantes de p53 quando presentes dentro de células. Outra vantagem é a de que por se tratar de uma linhagem celular, as células NCI-H1299 apresentam a mesma composição genética ao contrário do encontrado em cultivos primários de células de pacientes afetados pela SLF/LFL, onde as células apresentam diferenças a nível molecular devido aos diferentes *backgrounds* genéticos presentes em cada indivíduo.

Para padronização das condições de máxima eficiência de transfecção das células NCI-H1299, foram testados diferentes reagentes de transfecção com o plasmídeo pLL3.7, o qual codifica a proteína repórter GFP. O FuGENE HD é um reagente composto por uma mistura de lipídios catiônicos de formulação não-lipossomal capaz de se associar ao DNA formando micelas e direcioná-lo para dentro das células. Os reagentes Lipofectamine 2000 e Lipofectamine LTX Plus são compostos por lipídios catiônicos análogos de fosfolipídios da membrana celular, a combinação do DNA plasmidial com os lipídios catiônicos forma lipossomos que são incorporados pelas células por meio de endocitose. O reagente PLUS é utilizado para a formação de um pré-complexo com o DNA, aumentando a eficiência da associação dos lipídios da Lipofectamine LTX ao DNA. Nos testes realizados, o reagente de formulação lipossomal Lipofectamine LTX acrescido do reagente PLUS se mostrou mais eficiente para a transfecção da linhagem celular NCI-H1299. A eficiência de transfecção celular é descrita ser influenciada de forma significativa por uma série de fatores, como reagente de transfecção, tipo celular, passagem celular, componentes presentes no meio de cultivo celular, quantidade e qualidade do DNA utilizados nas reações. Assim, devido a esses fatores é necessária a padronização das condições individuais de transfecção para obtenção de máxima eficiência para cada linhagem celular (Jager *et al.*, 2015).

p53 participa dos mecanismos de regulação das vias de reparo de dano ao DNA conhecidas, inclusive da via de reparo por excisão de base (NER) que corrige fotoprodutos gerados por radiação UV (Sengupta & Harris, 2005). Nos ensaios foram utilizadas condições de baixa dose (10 J/m<sup>2</sup> totais) e de alta dose (50 J/m<sup>2</sup> totais) de

radiação UVC para a indução de danos no DNA e obtenção de condições de estresse genotóxico, que em outros tipos celulares estão relacionadas a paradas no ciclo celular e à ativação de rotas de reparo de dano ao DNA, e indução de apoptose, respectivamente (Latonen *et al.*, 2005).

A proteína p53 selvagem possui a capacidade de inibir a formação de colônias e de diminuir o número de células viáveis quando expressa em células que não possuem p53 endógena (Scian *et al.*, 2004; West *et al.*, 2006; Hanel *et al.*, 2013), uma vez que a p53 é considerada um potente indutor de apoptose e de senescência celular para células tumorais (Muller & Vousden, 2014). A proteína mutante R337H também foi descrita como possuindo a capacidade de inibir a formação de colônias de forma semelhante à proteína selvagem, e de induzir a apoptose na linhagem celular p53 *null* NCI-H1299 (Ribeiro *et al.*, 2001). Esses dados corroboram com os resultados obtidos com os transfectantes pCMV-Neo-Bam p53 wt e pCMV-Neo-Bam p53 R337H, para os quais foi observada a diminuição do número de células viáveis em comparação com o controle, uma baixa capacidade de formação de colônias e uma baixa porcentagem de células sobreviventes com expressão das proteínas correspondentes. Assim, observam-se efeitos próximos na viabilidade celular causados pela presença de p53 wt e R337H, sugerindo que a capacidade funcional e a atividade de R337H dentro da célula é ainda semelhante a apresentada pela p53 wt.

Além disso, quando expostas à dose de 50 J/m<sup>2</sup> de UVC no ensaio clonogênico, as células com expressão de R337H apresentaram uma capacidade de sobrevivência relativamente próxima à apresentada pelas células com expressão de p53 wt, e uma capacidade de sobrevivência superior em relação às células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam e pCMV-Neo-Bam p53 G245S. Essa maior capacidade de sobrevivência apresentada pelas células com expressão de R337H e de p53 wt quando expostas a doses mais altas de radiação UVC também sugere que R337H apresenta atividade funcional de p53 wt dentro da célula, devido à p53 demonstrar atividade protetora contra apoptose quando células são expostas a danos no DNA causados por radiação UV. Fibroblastos deficientes na expressão de p53 apresentam maior sensibilidade a danos no DNA e menor capacidade de formar colônias depois de expostos à radiação UVC (Smith *et al.*, 2000). Na linhagem NCI-H1299 com expressão

de p53 exógena, foi observada a interação entre p53 e a proteína JNK, onde p53 mostrou capacidade de inibir a atividade cinase de JNK, bloqueando a sinalização de morte celular da mitocôndria e a ativação de caspases induzidas por UV (Lo *et al.*, 2004).

Entretanto para a dose mais baixa de radiação UVC de  $10 \text{ J/m}^2$ , as células com expressão de R337H possuem uma fração de sobrevivência menor do que a apresentada pelas células com expressão de G245S e de p53 wt e também um aumento na taxa de apoptose tardia quando expostas a  $10 \text{ J/m}^2$  de UVC, enquanto nas células com expressão de G245S e p53 wt só há aumento da apoptose tardia quando as células são expostas a  $50 \text{ J/m}^2$  de UVC. Isso demonstra que células com expressão de R337H podem ser mais sensíveis a danos causados pela radiação UVC. Jordan *et al.* (2010) demonstraram que a mutação R337H do domínio de oligomerização resulta em atividade de transativação alterada, necessitando de níveis proteicos mais elevados para iniciar a transativação de genes comparado à atividade de p53 selvagem, uma vez que a oligomerização de p53 é vital para a sua função e desempenha papel central na regulação de sua atividade. Fibroblastos com deficiência nos níveis de p53 se mostraram mais suscetíveis a apoptose causada por UVC do que células com níveis normais de p53 selvagem (McKay & Ljungman, 1999). Células com perda de expressão de p53 apresentam prejuízo na subvia de reparo genômico global (GGR), pertencente à rota de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que é via responsável pelo reparo dos danos causados por UV. Dessa forma, o reduzido nível de reparo e o acúmulo de lesões no DNA geram forte inibição da replicação e da transcrição, induzindo as células à apoptose (Batista *et al.*, 2009).

A mutação G245S é descrita como uma mutação estrutural que rompe a estrutura do domínio de ligação ao DNA da p53 (Bullock *et al.*, 2000). Conforme ensaios de gene-repórter, essa mutante demonstrou a perda da capacidade de transativação, porém não apresentou GOF, como outra mutante do domínio de ligação ao DNA (R248Q) que apresentou capacidade de aumentar a mortalidade e de acelerar o crescimento de tumores em camundongos (Hanel *et al.*, 2013). Vinte e quatro horas após a transfecção da linhagem NCI-H1299 com o plasmídeo pCMV-Neo-Bam p53 G245S, foi observado um aumento no número de células viáveis, além de uma alta

porcentagem de células sobreviventes com expressão de G245S 72 h pós-transfecção. Isso demonstra uma menor toxicidade da proteína G245S dentro da célula, possivelmente devido à menor atividade funcional em comparação à p53 wt. Conseqüentemente, as células transfectadas com o plasmídeo pCMV-Neo-Bam p53 G245S mostraram maior capacidade de formação de colônias em relação as células transfectadas com os plasmídeos pCMV-Neo-Bam p53 wt e pCMV-Neo-Bam p53 R337H, mas apresentaram formação de menor número de colônias em relação ao plasmídeo controle pCMV-Neo-Bam.

Quarenta e oito horas após a transfecção com o plasmídeo pCMV-Neo-Bam p53 G245S foi observada uma diminuição no número de células viáveis em comparação às células transfectadas com o plasmídeo controle. Além disso, apresentaram um comportamento semelhante as células com expressão de p53 wt quanto a morte celular, apresentando um aumento na porcentagem de células em apoptose tardia 24 h após exposição à 50 J/m<sup>2</sup> de UVC e uma fração de sobrevivência celular para a exposição a 10 J/m<sup>2</sup> de UVC semelhante a das células com expressão de p53 wt. Esses resultados indicam que, embora G245S apresente uma menor atividade dentro da célula em comparação a p53 wt, essa mutante ainda possui a capacidade de ativar vias de morte celular. A ligação específica de G245S a estruturas supertorcidas do DNA foi demonstrada *in vitro* (Brazdova *et al.*, 2013). Um estudo realizado em larga escala demonstrou que mutantes do domínio de ligação ao DNA (V157F, Y163C, H179Y, L194R, R282W, V143A, R175H, R273H e D281G) apresentam significativa variabilidade nas capacidades de transativação e de inibição de diferentes promotores-alvo de p53 (Scian *et al.*, 2004). Além disso, p53 também é capaz de ativar a apoptose por meio de mecanismos independentes da transcrição em cooperação com fatores apoptóticos, sendo que mutantes de p53 transcricionalmente inativas mostraram capacidade de induzir apoptose em certos tipos de celulares (Haupt *et al.*, 2003).

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo trouxe novas evidências da proximidade funcional entre a proteína p53 wt e a mutante R337H em relação à influência sobre a viabilidade e a proliferação celular. Todavia, o perfil de resposta ao estresse genotóxico induzido pela radiação UVC divergiu entre as mutantes G245S e R337H, onde G245S demonstrou conferir às células maior proteção contra a morte celular, de forma semelhante ao observado para p53 wt, e as células com expressão de R337H foram mais sensíveis à radiação UVC apresentando entrada mais precoce na apoptose.

## 8. PERSPECTIVAS

A fim de obter dados mais precisos sobre a capacidade funcional e os efeitos moleculares e celulares decorrentes da expressão das proteínas p53 mutantes, G245S e R337H, serão realizadas novas transfecções nas células NCI-H1299 para o isolamento de clones celulares expressando estavelmente as proteínas p53 wt, G245S e R337H. A obtenção de transfectantes estáveis permitirá a realização de novos ensaios celulares para a avaliação do ciclo celular, reparo de danos no DNA, migração, proliferação e morte celular utilizando maiores variações de tempo a fim de obter resultados mais homogêneos. Além disso, esse conjunto de transfectantes estáveis possibilitará a realização de uma análise proteômica do perfil de resposta molecular a danos no DNA de forma temporal e espacial, utilizando exposições a baixas e altas doses de radiação UVC para indução de estresse genotóxico.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHATZ, M. I. *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett*, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, Jan 2007.
- BATISTA, L. F. *et al.* p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res*, v. 7, n. 2, p. 237-46, Feb 2009.
- BIRCH, J. M. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*, v. 20, n. 34, p. 4621-8, Aug 2001.
- BIRCH, J. M. *et al.* Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene*, v. 17, n. 9, p. 1061-8, Sep 1998.
- BIRCH, J. M. *et al.* Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*, v. 54, n. 5, p. 1298-304, Mar 1994.
- BODE, A. M.; DONG, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, v. 4, n. 10, p. 793-805, Oct 2004.
- BOUGEARD, G. *et al.* Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet*, v. 45, n. 8, p. 535-8, Aug 2008.
- BRÁZDOVÁ, M. *et al.* Preferential binding of hot spot mutant p53 proteins to supercoiled DNA in vitro and in cells. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e59567, 2013.
- BULLOCK, A. N.; HENCKEL, J.; FERSHT, A. R. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*, v. 19, n. 10, p. 1245-56, Mar 2000.
- CHOMPRET, A. *et al.* Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet*, v. 38, n. 1, p. 43-7, Jan 2001.
- DAVISON, T. S. *et al.* Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*, v. 17, n. 5, p. 651-6, Aug 1998.
- DIGIAMMARINO, E. L. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*, v. 9, n. 1, p. 12-6, Jan 2002.
- EELES, R. A. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv*, v. 25, p. 101-24, 1995.

EUSTICE, D. C.; WILHELM, J. M. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotic protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 26, n. 1, p. 53-60, Jul 1984.

FRANKEN, N. A. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FREBOURG, T. *et al.* [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. *Bull Cancer*, v. 88, n. 6, p. 581-7, Jun 2001.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, v. 22, n. 56, p. 9030-40, Dec 2003.

GARRITANO, S. *et al.* Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat*, v. 31, n. 2, p. 143-50, Feb 2010.

GIACOMAZZI, C. R. *et al.* Pediatric cancer and Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-like syndromes: a review for the pediatrician. *Rev Assoc Med Bras* (1992), v. 61, n. 3, p. 282-9, 2015 May-Jun 2015.

GIACOMAZZI, J. *et al.* Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One*, v. 9, n. 6, p. e99893, 2014.

GIACOMAZZI, J. *et al.* Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer*, v. 119, n. 24, p. 4341-9, Dec 2013.

GONZALEZ, K. D. *et al.* Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol*, v. 27, n. 8, p. 1250-6, Mar 2009.

HAFSI, H.; HAINAUT, P. Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. *Antioxid Redox Signal*, v. 15, n. 6, p. 1655-67, Sep 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011.

HANEL, W. *et al.* Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, v. 20, n. 7, p. 898-909, Jul 2013.

HAUPT, S. *et al.* Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, v. 116, n. Pt 20, p. 4077-85, Oct 2003.

JAGER, V. *et al.* Chapter 2 - Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells. Springer International Publishing, Animal Cell Culture, Cell Engineering, DOI 10.1007/978-3-319-10320-4\_2, 2015

JORDAN, J. J. *et al.* Altered-function p53 missense mutations identified in breast cancers can have subtle effects on transactivation. *Mol Cancer Res*, v. 8, n. 5, p. 701-16, May 2010.

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, v. 18, n. 53, p. 7644-55, Dec 1999.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, v. 358, n. 6381, p. 15-6, Jul 1992.

LATONEN, L.; LAIHO, M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta*, v. 1755, n. 2, p. 71-89, Jul 2005.

LEE, J. G. *et al.* Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin  $\alpha 4$  and Akt signals. *Sci Rep*, v. 5, p. 12642, Jul 2015.

LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*, v. 43, n. 6, p. 1365-73, Dec 1969a.

LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*, v. 71, n. 4, p. 747-52, Oct 1969b.

LI, F. P. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*, v. 48, n. 18, p. 5358-62, Sep 1988.

LO, P. K. *et al.* The prosurvival activity of p53 protects cells from UV-induced apoptosis by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase activity and mitochondrial death signaling. *Cancer Res*, v. 64, n. 23, p. 8736-45, Dec 2004.

LUSTBADER, E. D. *et al.* Segregation analysis of cancer in families of childhood soft-tissue-sarcoma patients. *Am J Hum Genet*, v. 51, n. 2, p. 344-56, Aug 1992.

LYNCH, H. T. *et al.* Genetic and pathologic findings in a kindred with hereditary sarcoma, breast cancer, brain tumors, leukemia, lung, laryngeal, and adrenal cortical carcinoma. *Cancer*, v. 41, n. 5, p. 2055-64, May 1978.

MCBRIDE, K. A. *et al.* Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol*, v. 11, n. 5, p. 260-71, May 2014.

MELINO, G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ*, v. 18, n. 9, p. 1487-99, Sep 2011.

MCKAY, B. C.; LJUNGMAN, M. Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light. *Neoplasia*, v. 1, n. 3, p. 276-84, Aug 1999.

MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*, v. 15, n. 1, p. 2-8, Jan 2013.

MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, v. 25, n. 3, p. 304-17, Mar 2014.

MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H.; NORMAN, J. C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*, v. 192, n. 2, p. 209-18, Jan 2011.

NELSON, M.; MCCLELLAND, M. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol*, v. 216, p. 279-303, 1992.

OLIVIER, M. *et al.* Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*, v. 63, n. 20, p. 6643-50, Oct 2003.

PALMERO, E. I. *et al.* Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett*, v. 261, n. 1, p. 21-5, Mar 2008.

RIBEIRO, R. C. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 16, p. 9330-5, Jul 2001.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor, v. 3, p. 1.32-34, 2001.

SCIAN, M. J. *et al.* Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene*, v. 23, n. 25, p. 4430-43, May 2004.

SENGUPTA, S.; HARRIS, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, n. 1, p. 44-55, Jan 2005.

SMITH, M. L. *et al.* p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol*, v. 20, n. 10, p. 3705-14, May 2000.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell*, v. 12, n. 4, p. 303-12, Oct 2007.

STRONG, L. C.; STINE, M.; NORSTED, T. L. Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives. *J Natl Cancer Inst*, v. 79, n. 6, p. 1213-20, Dec 1987.

SUI, X.; HAN, W.; PAN, H. p53-induced autophagy and senescence. *Oncotarget*, v. 6, n. 14, p. 11723-4, May 2015.

TINAT, J. *et al.* 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol*, v. 27, n. 26, p. e108-9; author reply e110, Sep 2009.

VARLEY, J. M. *et al.* Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res*, v. 57, n. 15, p. 3245-52, Aug 1997.

WEBB, B. A. *et al.* Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*, v. 11, n. 9, p. 671-7, 08 2011. ISSN 1474-1768.

WEST, A. N. *et al.* Identification of a novel germ line variant hotspot mutant p53-R175L in pediatric adrenal cortical carcinoma. *Cancer Res*, v. 66, n. 10, p. 5056-62, May 2006.

## **CURRICULUM VITAE resumido**

MENEGHETTI, B. V.

### **1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Bruna Valandro Meneghetti

Local e data de nascimento: Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil – 04/01/1991

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Centro de Biotecnologia.

Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43421, salas 204/206.

Agronomia - Porto Alegre.

CEP: 91501-970, RS – Brasil.

Telefone profissional: 051-33086070

E-mail: bvalandromeneghetti@gmail.com

### **2. FORMAÇÃO:**

#### **2015 - 2017**

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Efeitos de proteínas p53 mutantes associadas à síndrome de Li-Fraumeni na viabilidade celular em condições basais e sob estresse genotóxico.

Orientador: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

## **2010 - 2015**

Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Histonas H2A e SET metiltransferase de *Echinococcus granulosus*: Clonagem e Expressão em *Escherichia coli*

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS, Brasil.

## **3. ESTÁGIOS:**

### **2014**

Estágio Curricular Obrigatório - Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado da UFRGS.

Laboratório de Microbiologia, Hospital Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre - RS

Carga horária total: 300 h

### **2010 - 2015**

Estágio de Iniciação científica

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos - Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Bolsista PROBIC-FAPERGS

Carga horária: 20 h/semanais

## **4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

TEICHMANN, A.; VARGAS, DAIANI M.; MONTEIRO, KARINA M.; **MENEGHETTI, BRUNA V.**; DUTRA, CRISTINE S.; PAREDES, RODOLFO; GALANTI, NORBEL; ZAHA, ARNALDO; FERREIRA, HENRIQUE B. Characterization of 14-3-3 Isoforms

Expressed in the *Echinococcus granulosus* Pathogenic Larval Stage. Journal of Proteome Research (Print), v. 14, p. 1700-1715, 2015.

## 5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

**MENEGHETTI, B. V.**; TEICHMANN, A.; ZAHA, A. Histonas H2A e SETMAR de *Echinococcus granulosus*: Análise da Potencialidade para Secreção. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, Florianópolis, 2013.

TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; VARGAS, D. M.; **MENEGHETTI, B. V.**; DUTRA, C. S.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Caracterização das proteínas 14-3-3 $\epsilon$ 1 e 14-3-3 $\epsilon$ 2 do parasito *Echinococcus granulosus*. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, Florianópolis, 2013.

**MENEGHETTI, B. V.**; TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; VARGAS, D. M.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Analysis of the expression pattern of 14-3-3 $\epsilon$ 1 and 14-3-3 $\epsilon$ 2 proteins from *Echinococcus granulosus*. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 2012.

TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; VARGAS, D. M.; **MENEGHETTI, B. V.**; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Characterization of 14-3-3 epsilon isoforms from the parasite *Echinococcus granulosus*. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 2012.

VARGAS, D. M.; MONTEIRO, K. M.; TEICHMANN, A.; **MENEGHETTI, B. V.**; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Characterization of two *Echinococcus granulosus* 14-3-3 protein

isoforms (Eg14-3-3ζ2 and Eg14-3-3ζ3) expressed in the parasites pathogenic larval stage. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 2012.

**MENEGHETTI, B. V.;** TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; VARGAS, D. M.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Caracterização das proteínas 14-3-3 epsilon 1 e 14-3-3 epsilon 2 do parasito *Echinococcus granulosus*. In: SIC2012 - XXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, 2012.

**MENEGHETTI, B. V.;** TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Caracterização das proteínas 14-3-3ε1 e 14-3-3ε2 do parasito *Echinococcus granulosus*. In: SIC2011 - XXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, 2011.

TEICHMANN, A.; MONTEIRO, K. M.; VARGAS, D. M.; **MENEGHETTI, B. V.;** ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Identificação de ligantes proteicos da proteína 14-3-3ε1 de *Echinococcus granulosus*. In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo, 2011.

## **6. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS**

SIC2014 - XXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. Histonas H2A e SETMAR de *Echinococcus granulosus*: Análise *in silico* da Potencialidade para Secreção e Expressão em *Escherichia coli*. 2014.

SIC2012 - XXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. Caracterização das proteínas 14-3-3 epsilon 1 e 14-3-3 epsilon 2 do parasito *Echinococcus granulosus*. 2012.

SIC2011 - XXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. Caracterização das proteínas 14-3-3 epsilon 1 e 14-3-3 epsilon 2 do parasito *Echinococcus granulosus*. 2011.