

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE LI-  
FRAUMENI-LIKE E PORTADORES DA MUTAÇÃO GERMINATIVA**  
***TP53 p.R337H***

**GABRIEL DE SOUZA MACEDO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Ashton-Prolla**

Porto Alegre, março de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em parceria com o Laboratório 24 do Departamento de Bioquímica da UFRGS e o Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética do HCPA. O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e Programa Instituto do Milênio e Programa de apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Processo10/0051-9, Brasil). Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos em projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelos comitês de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 11-0099.

## AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, obrigado por me incentivar incondicionalmente e estar presente em todos os momentos. Pai, obrigado por confiar em mim e por ter oportunizado minha vinda à Porto Alegre em busca de crescimento profissional. Vó, minha grande amiga e segunda mãe. Obrigado pela dedicação de sempre. Dudu, meu “mano véio”, obrigado pela amizade.

À Profa. Patricia Ashton-Prolla, pela confiança, amizade, oportunidades, pelas discussões científicas, pela presença mesmo no turbulento dia-a-dia. Obrigado pela liberdade que me foi dada para criar e buscar coisas novas. Tenho uma grande admiração pela pessoa e profissional que és.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Medicina Genômica (LMG) do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

Aos meus grandes amigos do LMG: Bárbara, Mari, Jú, Patizinha e Diego. Obrigado pelas discussões científicas que tanto me acrescentam, pelo exemplo de profissionais que são e pelo “ombro amigo” em muitos momentos.

Ao Prof. Fábio Klamt e ao Leonardo Motta, por terem aceitado a colaboração e por terem aberto o laboratório para que eu realizasse boa parte dos experimentos deste projeto.

À Profa. Carmen Regla Vargas, Vanusa Manfredini e Camila Vanzin, pelo auxílio nos experimentos finais, pela disponibilidade e atenção.

Aos meus amigos da vida mais que especiais: Henrique, Guga, Bel, Alemão, Gui, Kel, Nice, Inácio, Luiza, Renan e Juliana Freitas.

Ao Elmo, pela ajuda em todas as questões burocráticas e pela paciência e atenção de sempre.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO .....	8
<i>I.1. Síndrome de Li-Fraumeni</i> .....	9
<i>I.2. A proteína p53</i>	
<i>I.2.1. Funções clássicas</i> .....	11
<i>I.2.2. p53 e metabolismo redox: uma nova função</i> .....	12
<i>I.2.3. Domínios da proteína p53</i> .....	13
<i>I.3. O gene TP53 e suas alterações</i>	
<i>I.3.1. Mutações e polimorfismos em TP53</i> .....	14
<i>I.3.2. A mutação TP53 p.R337H</i> .....	15
<i>I.4. Espécies reativas</i> .....	18
<i>I.5. Antioxidantes</i> .....	18
<i>I.6. Estresse oxidativo</i> .....	20
CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	21
<i>II.1. Justificativa</i> .....	22
<i>II.2. Objetivos</i> .....	23
CAPÍTULO III. RESULTADOS EM FORMATO DE ARTIGO .....	24
<i>Antioxidants and oxidative stress in Li-Fraumeni-like syndrome patients: imbalance in redox metabolism is present in TP53 p.R337H mutation carriers.</i>	
CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO .....	45
CAPÍTULO V. CONCLUSÃO .....	50
CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
ANEXOS .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

**SLF** – Síndrome de **Li-Fraumeni** (Li-Fraumen Syndrome)

**LFL** – Síndrome **Li-Fraumeni-like** (Li-Fraumeni-like Syndrome)

**CAC** – Carcinoma Adrenocortical (Adrenocortical carcinoma)

**3'UTR** – Região 3' não traduzida (**3' Untranslated region**)

**ATM** – Proteína Mutada da Ataxia Telangiectasia (**Ataxia Telangiectasia Mutated**)

**Bax** – Proteína Bcl2 Associada ao X (**Bcl2-associated X protein**)

**PUMA** - p53 Upregulated Modulator of *Apoptosis*

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive oxygen species)

**ER** – Espécies Reativas

**GADD45** - Growth Arrest and DNA Damage genes (Genes de parada de crescimento e dano ao DNA)

**PAI-1** - Plasminogen Activator Inhibitor-1 (inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1)

**CAT** - Catalase

**SOD** – Superoxide dismutase

**GPX** – Glutathione peroxidase

**Wt** – Wild Type (selvagem)

## RESUMO

Mutações germinativas no gene *TP53* estão associadas com a Síndrome de Li-Fraumeni e sua variante, a Síndrome de Li-Fraumeni-Like, ambas doenças autossômicas dominantes caracterizadas pela predisposição a múltiplos tumores em idade precoce. Recentemente p53 foi descrita como uma proteína com funções antioxidantes, atuando na manutenção da estabilidade genômica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar parâmetros de estresse oxidativo em sangue periférico de indivíduos portadores da mutação germinativa *TP53* p.R337H em comparação com indivíduos não portadores da alteração. Foi verificado que a atividade eritrocitária da enzima GPx, uma importante defesa antioxidante, diferiu significativamente entre portadores e não portadores da mutação, com um aumento da atividade nos primeiros ( $p=0.048$ ). O conteúdo de grupamentos carbonila e de malondialdeído, indicadores de dano à proteína e a lipídios, respectivamente, também foram significativamente maiores no grupo dos portadores ( $p=0.04$  e  $p<0.0001$ ). Por fim, indivíduos portadores da mutação apresentaram um aumento no estado antioxidante total, mas uma diminuição no conteúdo de ácido ascórbico em plasma. Nossos resultados apontam para alterações da função antioxidante de p53 em indivíduos portadores da mutação germinativa *TP53* p.R337H, independentemente da idade e do diagnóstico prévio de um tumor. Estas alterações podem estar diretamente relacionadas à predisposição ao câncer neste grupo de pacientes.

## ABSTRACT

Germline mutations in the *TP53* gene are the underlying genetic defect of Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant, Li-Fraumeni-like (LFL) Syndrome, autosomal dominant disorders characterized by predisposition to multiple early-onset cancers. More recently, p53 is emerging as an important player in redox metabolism and important enzymes involved in defenses against oxidative stress have shown to be regulated by p53, including glutathione peroxidase 1 (GPX1) and mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2). The aim of the present study was to investigate the redox profile parameters in blood of p.R337H mutation carriers and non-carriers individuals. A total of 34 individuals were included in the study and they were divided in two groups: mutation carriers (C) (n=17) and non-carriers (NC) (n=17). Erythrocyte GPx activity, an important enzymatic antioxidant defense, differed significantly between carriers and non carriers, with an increased activity in the latter ( $p = 0.048$ ). Plasma Carbonyl content, an indicative of protein damage related to ROS overgeneration, was also increased in carriers ( $p = 0.04$ ). Furthermore, an association between malondialdehyde (MDA, a lipidic peroxidation product) levels and mutation status was found in plasma. Mutation carriers had a four-fold increase in MDA levels (C=  $40.20 \pm 2.84$ , NC=  $160.5 \pm 3.64$ ,  $p < 0.0001$ ) when compared to non carriers. Finally, mutation carriers showed an increased total antioxidant status (TAS), but a decrease in the Vitamin C content in plasma, when compared to non-carriers. Our findings suggest that *TP53* p.R337H mutation carriers present an imbalance in oxidative metabolism parameters, which could be directly related to the pathophysiological mechanisms of cancer predisposition in these individuals.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**



### ***1.1. Síndrome de Li-Fraumeni***

No ano de 1969, Frederick Li e Joseph Fraumeni revisaram registros médicos de crianças norte-americanas diagnosticadas com rhabdomyosarcoma, uma neoplasia maligna da musculatura esquelética. Dentre as histórias familiares dos pacientes analisados, identificaram quatro famílias com história de sarcomas de partes moles, câncer de mama e outros tumores em crianças ou jovens adultos (Li e Fraumeni, 1969a), que seguiam certos padrões de transmissão e agregação familiar. Baseado na ocorrência de tumores nestes agregados familiares, que indicavam um padrão de herança autossômico dominante, os pesquisadores descreveram uma nova síndrome de câncer familiar chamada de Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (Li e Fraumeni, 1969b).

A SLF é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer com padrão de herança autossômico dominante e de manifestações clínicas bastante heterogêneas. Indivíduos com SLF apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de um amplo espectro de tumores em idade precoce. Os tumores mais comuns em indivíduos com a doença são os sarcomas de partes moles e osteosarcomas, câncer de mama, tumores cerebrais (em especial meduloblastoma e carcinoma de plexo coróide), leucemias e carcinoma adrenocortical (CAC) (Li e cols., 1988). Este conjunto de neoplasias corresponde aos chamados tumores centrais da síndrome (“core tumors”). Posteriormente, alguns outros estudos encontraram famílias com tumores do espectro da SLF com a predisposição aumentada para outras neoplasias, como melanoma, carcinoma bronquioloalveolar de pulmão, câncer gástrico e de próstata, tumores de células germinativas e tumor de Wilms (Hartley e cols., 1989; Frebourg e cols., 2001; Masciari e cols., 2011). No entanto, ainda há controvérsias sobre uma associação definitiva de alguns destes tumores com a síndrome.

Atualmente, a definição clássica e mais bem aceita da SLF é a presença de um probando com diagnóstico de sarcoma antes dos 45 anos de idade, acompanhado de um familiar em primeiro grau com algum câncer antes dos 45 anos de idade, e outro familiar em primeiro ou segundo grau também com câncer antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma em qualquer idade (Li e cols., 1988). Sempre que presentes, estes critérios indicam claramente o teste genético para diagnóstico da síndrome. Posteriormente, alguns outros critérios menos restritivos foram propostos para indicar a investigação da SLF e de suas variantes, denominadas globalmente Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL). Para estas,

incluem os critérios de Birch, Chompret e Eeles (Birch e cols., 1994; Eeles, 1995; Frebourg e cols., 2001).

Apesar do mecanismo molecular associado com a SLF e LFL ainda não ser conhecido até o final da década de 80, análises de segregação indicavam que a doença tinha uma etiologia genética (Willians e Strong, 1987). Mutações inativadoras no gene *TP53* já haviam sido encontradas em osteossarcomas esporádicos, sarcomas de partes moles, leucemias e carcinomas de mama, todos estes tumores do espectro da SLF (Nigro e cols., 1989). Além disso, camundongos transgênicos com *p53* mutantes também apresentavam incidência aumentada para os mesmos tumores citados anteriormente (Laviguer e cols., 1989). A partir do sequenciamento de DNA genômico extraído de fibroblastos e sangue periférico de indivíduos portadores da síndrome, verificou-se que os éxons 5-8 continham as mesmas mutações que eram identificadas em tumores esporádicos, mostrando assim que mutações germinativas no gene *TP53* estavam associadas à predisposição ao câncer em uma significativa proporção de famílias com os critérios clínicos para SLF (Malkin e cols., 1990).

Olivier e colaboradores (2002) revisaram registros de 99 famílias com critérios clássicos para a SLF e encontraram mutações germinativas em *TP53* em 83 (aproximadamente 83%) destas. Já em famílias que preenchem critérios menos restritivos para o diagnóstico da SLF, como os critérios de Chompret e Eeles, a prevalência de mutações em *TP53* tem apresentado variação entre os diferentes estudos (Varley e cols., 2003). Utilizando sequenciamento direto do DNA genômico do primeiro éxon não-codificante, região promotora, região 3' não traduzida (3'UTR), exons 2-11 codificantes e todos os sítios de processamento do gene *TP53*, Varley e colaboradores (2003) encontraram mutações germinativas em 77% (23/30) e 40% (12/30) das famílias com SLF e LFL, respectivamente. Algumas correlações genótipo-fenótipo foram estabelecidas, com algumas mutações pontuais mostrando maior associação com determinados tipos tumorais e de grandes deleções de *TP53* com fenótipos mais agressivos ou múltiplos tumores primários em indivíduos de famílias com SLF (Bougeard e cols., 2003).

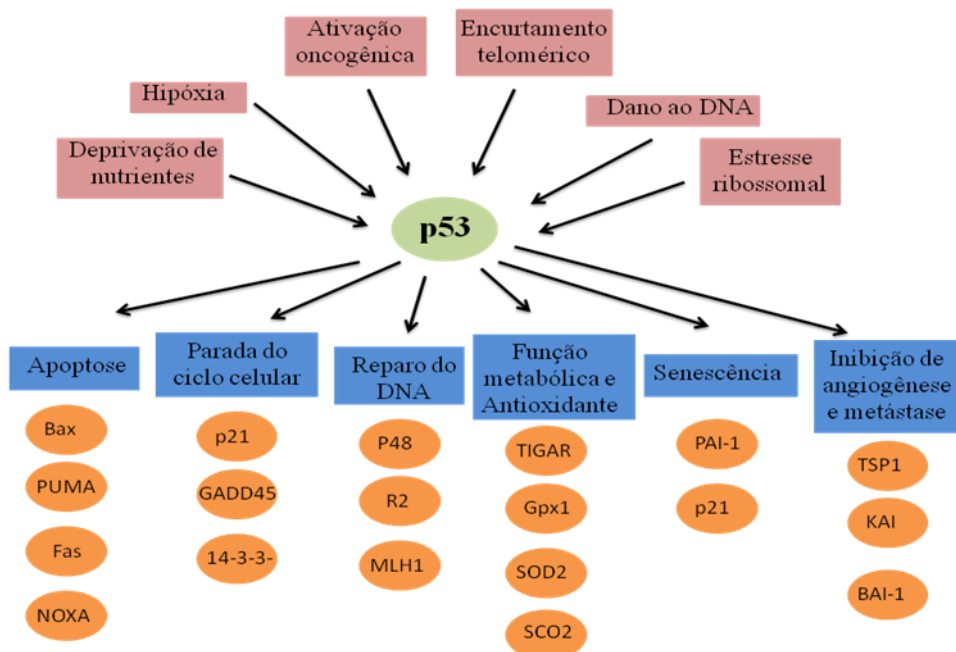
A SLF é uma síndrome altamente penetrante. Portadores de uma mutação germinativa no gene *TP53* apresentam, em média, 50% de chance de desenvolver câncer antes dos 40 anos de idade, comparado com 1% da população geral. Além disso, 90% dos

portadores de mutação serão diagnosticados com câncer até os 60 anos de idade (Birch e cols., 1998; Strong e cols., 1992).

## 1.2. A proteína p53

### 1.2.1. Funções Clássicas

De todas as proteínas supressoras de tumor, poucas são tão versáteis e exercem funções tão antagônicas como p53. Conhecida como “guardiã do genoma”, p53 é um fator de transcrição de vida curta ativado por dano ao DNA, sinalização oncogênica, hipóxia, estresse oxidativo, encurtamento telomérico, entre outros (Oren, 2003). Mediante ativação, alguns fatores-chave tais como a natureza e intensidade do estresse, tipo celular e “background genético” irão determinar o tipo de resposta celular a ser desencadeado (Murray-Zmijewski e cols., 2008). (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismos ativadores da proteína p53 e suas atividades supressoras de tumor.** p53 tem como função integrar respostas celulares (em azul) a diferentes tipos de estresse (em vermelho). Cada uma das vias de sinalização mediadas por p53 é ativada pela expressão de diferentes proteínas (em laranja). **Modificado de Vousden e Lane (2007).**

A habilidade de bloquear o ciclo celular e promover apoptose é um mecanismo eficiente de proteção contra tumores. Quando ativada por quebras duplas no DNA, por exemplo, a proteína ATM fosforila e estabiliza p53. Esta atua bloqueando o ciclo celular por ativação de p21 e indução de apoptose por transativar BAX, PUMA e o receptor FAS (Roos e cols., 2006). Uma observação interessante em modelos animais é que camundongos que expressam proteínas p53 mutantes perdem a habilidade de indução de parada de ciclo celular, mas suas células não perdem funções apoptóticas, o que ainda os mantém protegidos contra o desenvolvimento de tumores espontâneos (Toledo e cols., 2008).

Outra importante atividade supressora de tumor mediada por p53 é a inibição de crescimento e proliferação celular. A ativação de p21, Gadd45 e 14-3-3 sigma tem se mostrado extremamente sensível a baixos níveis de p53. Esse mecanismo é de fundamental importância na garantia de que células que apresentam algum tipo de dano não severo sobrevivam e possam restabelecer a homeostase (Vousden e cols., 2009).

Senescência, uma resposta irreversível de parada do ciclo celular, também desempenha um papel importante na proteção contra tumores. Alguns estudos tem demonstrado que tanto a ativação oncogênica quanto o encurtamento telomérico desencadeiam senescência induzida por p53. Lesões pré-cancerosas, que surgem diariamente em inúmeras células humanas, parecem ser eficientemente desviadas da progressão maligna por senescência envolvendo a sinalização de p53. Além disso, já foi demonstrado que carcinomas e sarcomas utilizam preferencialmente esta via, em detrimento da via de apoptose, mesmo sendo esta uma resposta que atua muito mais na estabilização do que na eliminação de um tumor (Deng e cols., 2008; Ventura e cols., 2007; Xue e cols., 2007). Assim como ocorre com as vias de sinalização mediados por p53 citadas anteriormente, a senescência resulta de mudanças na expressão de inúmeras proteínas, tais como o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (Leal e cols., 2008). Já foi demonstrado que a supressão de tumor por defeitos na via de apoptose (mutação p.R172P em *TP53*) é dependente da ativação de p21 e senescência (Cosme-Blanco e cols., 2007).

### ***1.2.2. p53 e Metabolismo Redox: uma nova função***

Recentemente foi demonstrado que sob determinadas condições p53 exerce funções muito distintas das anteriormente descritas. Em situações fisiológicas ou de baixo estresse celular, a atividade de p53 é fortemente regulada por dois mecanismos complementares: controle do metabolismo redox e controle transcricional da expressão de p53 com produção de isoformas desta proteína (Hafsi e Hainaut, 2011).

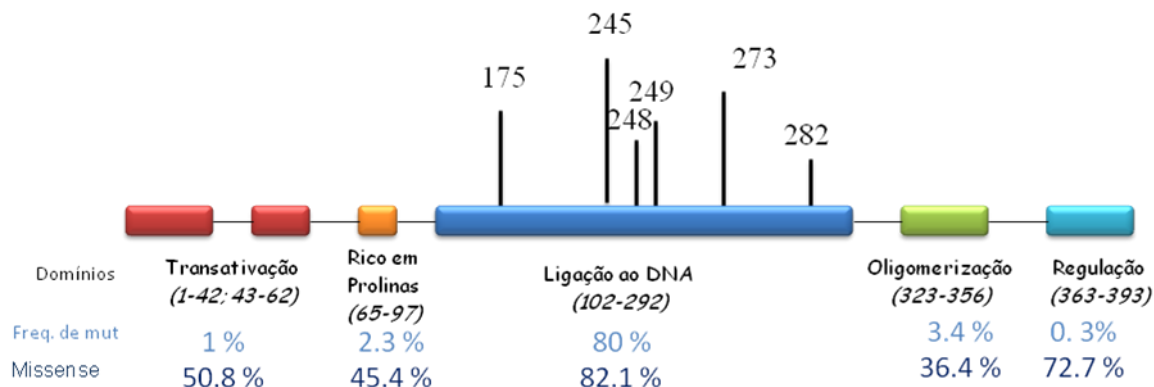
Sablina e colaboradores (2005) demonstraram claramente a função antioxidante de p53. Neste estudo, os pesquisadores observaram que células humanas apresentaram uma produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) duas vezes maior após o silenciamento do gene. Esse fenótipo se manteve em tecidos de camundongos *TP53*<sup>-/-</sup> e também após a inibição da função da proteína por outros mecanismos, como superexpressão de mutantes oncogênicos (p53 Arg175His) e ativação de inibidores de p53 (MDM2 e HPV16 E6). O bloqueio da expressão de p53 também foi acompanhado por diminuição e ausência da expressão de algumas outras proteínas que atuam como defesas antioxidantes, como GPx1 e SESN2, no aumento da oxidação do DNA, mutagênese e anormalidades no cariótipo, mais comumente aneuploidias. Por último, o estudo demonstrou que camundongos *knock-out* (*TP53*<sup>-/-</sup>) suplementados com uma dieta rica em antioxidantes foram significativamente menos propensos a tumores do que os mesmos animais sem suplementação.

Alguns estudos anteriores já haviam identificado o papel de p53 na modulação da expressão de proteínas com funções antioxidantes, como superóxido dismutase 2 mitocondrial (SOD2) (Hussain e cols., 2004), glutationa peroxidase 1 (GPX1) (Tan e cols., 1999), aldeido desidrogenase 4, membro A1 (ALDH4A1) (Yoon e cols., 2004), e sestrinas (*HI95* e *PA26*) (Budanov e cols., 2004).

### ***1.2.3. Domínios da proteína p53***

Funcionando como um fator de transcrição tetramérico, cada monômero de p53 é composto de 393 aminoácidos organizados em domínios bem definidos. Os primeiros 73 aminoácidos constituem o **domínio N-terminal de transativação**, uma região proteica que interage com a maquinaria de transcrição de genes regulados positivamente. A seguir, há um **domínio rico em prolinas** (resíduos 63-97) envolvido na interação proteína-proteína e na função pró-apoptótica de p53. Na região central, se observa um **domínio de ligação ao DNA** altamente conservado evolutivamente que interage diretamente com sequências

nucleotídicas específicas (resíduos 94-312), e onde se encontra a grande maioria das mutações associadas a tumores. Por fim, há uma região C-terminal com um **domínio de oligomerização** (resíduos 325-355) fundamental para dimerização e posterior tetramerização, e um **domínio básico não estruturado** (Levine, 1997; Laptenko e cols., 2006). (Figura 2)



**Figura 2. Domínios de p53.** Representação esquemática dos diferentes domínios de p53, resíduos correspondentes, frequência de mutações gênicas e percentuais de mutações de troca de sentido em cada uma destas regiões. Além disso, são mostrados os resíduos onde ocorrem as seis mutações mais prevalentes do gene, consideradas “hot spots”, no domínio de ligação ao DNA. **Modificado de Brosh e Rotter (2009).**

### 1.3. O gene TP53 e suas alterações

#### 1.3.1. Mutações e Polimorfismos em TP53

Ao contrário da maioria dos genes supressores tumorais envolvidos em síndromes hereditárias de predisposição ao câncer, que são inativados por pequenas ou grandes deleções e mutações de troca e perda de sentido, mutações inativadoras no gene *TP53* são prioritariamente mutações do tipo troca de sentido (Hainaut e Hollstein, 2000).

Alterações somáticas no gene *TP53* ocorrem em praticamente todos os tipos tumorais, com frequências de mutações variando de até 50% em tumores de ovário, colorretal e esôfago, a 5% dos melanomas metastáticos, leucemias e tumores do colo de útero (Petitjean e cols., 2007b). Aproximadamente 86% das mutações em *TP53* encontram-se entre os códons 125 e 300, sendo que destas, 87.9% são mutações do tipo troca de sentido. Esta região gênica compreende os éxon 5 ao8 e corresponde justamente ao domínio de ligação da proteína ao DNA, fundamental para a efetiva atuação como fator de

transcrição. Interessantemente, mutações que ocorrem fora deste domínio, são em sua maioria do tipo sem sentido e de perda de sentido. Além disso, 30% das mutações ocorrem em seis códons preferenciais (175, 245, 248, 249, 273 e 282), todos eles localizados nas regiões do domínio de ligação ao DNA (Olivier e cols., 2010).

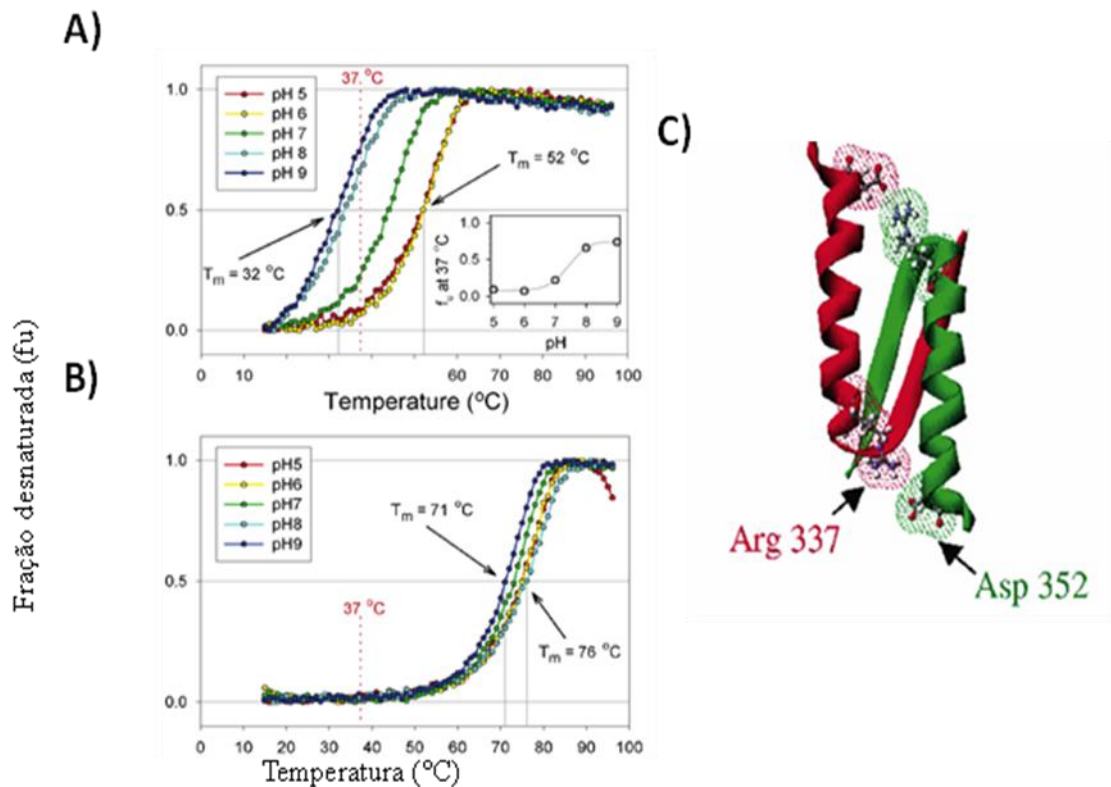
Dezenas de polimorfismos no locus *TP53* já foram identificados e validados em populações humanas, no entanto, para a maioria deles as propriedades biológicas e alterações funcionais associadas ainda não foram testadas. Grande parte destas variantes estão localizadas em íntrons, e parecem não estar associadas a características relacionadas à suscetibilidade ao câncer (Whibley e cols., 2009). A inserção de 16 pares de base no íntron 3 de *TP53* é o polimorfismo mais bem estudado e tem sido associado a um risco aumentado para uma série de neoplasias (Gemignani e cols., 2004; Costa e cols., 2008). A presença deste alelo foi associado com alterações no processamento do transcrito e com menores níveis de mRNA de *TP53*, o que poderia explicar seu envolvimento no risco de câncer (Gemignani e cols., 2004). Em populações humanas, o códon 72 de *TP53* é constituído pela sequência CCC (codificando uma prolina ou p53-P72) ou CGC (codificando uma arginina ou p53-R72). Análises de similaridades de sequências com outros primatas indicam que p53-P72 é o alelo ancestral, apesar de p53-R72 ocorrer em alta frequência (>50%) em algumas populações. Um gradiente de frequências que varia de acordo com a latitude (aumento da variante p53- P72 nos trópicos) parece ocorrer, sugerindo que este alelo poderia conferir proteção contra os efeitos adversos da radiação solar ou de outros fatores de risco ambientais do câncer (Beckman e cols., 1994). Além disso, estudos *in vitro* mostram que o polimorfismo R72P é funcional. A proteína p53-R72 é um indutor mais potente da apoptose quando comparado ao alelo p53-72p (Dumont e cols., 2003)

### ***I. 3.2. A mutação TP53 p.R337H***

No ano de 2001, um grupo de pesquisadores do Paraná identificou a mutação p.R337H (substituição de uma Arginina por uma Histidina no códon 337 do éxon 10 do gene *TP53*) em 35 de 36 pacientes com CAC. Apesar deste tipo de neoplasia ser um indicativo de SLF e LFL, a frequência e os tipos de câncer observados nas famílias dos pacientes não eram típicos das síndromes e em duas famílias não havia outros casos de câncer além do caso-índice. Neste primeiro estudo, os pesquisadores sugeriram que a

mutação tinha baixa penetrância para câncer e apresentava um efeito tecido-específico, estando relacionada unicamente com a ocorrência de CAC.

Por ser uma mutação localizada no domínio de oligomerização de p53, acreditou-se inicialmente que a proteína mutante R337H era incapaz de se oligomerizar, e conseqüentemente, de exercer suas funções supressoras de tumor. Então, utilizando métodos de transativação, demonstrou-se que p53-R337H apresentava atividade muito similar a de p53 selvagem (wt) quando expressa em fibroblastos e células de osteosarcoma (Ribeiro e cols., 2001). DiGiammarino e colaboradores (2002) avaliaram a estrutura e estabilidade de p53-R337H por análise cromatográfica e verificaram que a mutante é muito similar estruturalmente à p53 selvagem, no entanto apresentava um estabilidade dependente de pH. O estudo demonstrou que p53-R337H torna-se menos estável com o aumento do pH, sendo que aproximadamente 70% das proteínas encontram-se desnaturadas em pH 8, enquanto que p53 wt só é desnaturada em temperaturas acima de 50 °C. Na proteína selvagem, uma ponte de sal forma-se entre a Arg337 e Asp352. Esta é fundamental para a dimerização e posterior formação do tetrâmero. A substituição por uma His na posição 337 introduz diferenças químicas nesta região, levando a uma desestabilização da ponte de sal e desestruturação do tetrâmero (Figura 3).





**Figura 3. Estabilidade de p53-R337H e p53-wt e estrutura tridimensional de monômeros de p53.** A esquerda é mostrado um gráfico de estabilidade. (A) a figura mostra que à 37 °C em pH 8 aproximadamente 70% dos tetrâmeros de p53-R337H estão desnaturados. Ao contrário, (B) p53-wt só é desnaturada a temperaturas superiores a 50 °C. (C) Estrutura tridimensional do domínio de oligomerização de p53, destacando a posição 337 e a posição 352, que formam uma ponte de sal que atua na estabilização do tetrâmero. A mudança por uma Histidina na posição 337 desestabiliza a proteína.

Em 2006, o mesmo grupo do Paraná pesquisou a história familiar de 30 famílias de 41 crianças com CAC do Sul do Brasil. A penetrância deste tipo tumoral entre portadores da variante p.R337H em *TP53* foi estimada em 9.9%, mostrando que outros fatores ainda não identificados podem interferir no potencial tumorigênico da alteração genética (Figueiredo e cols., 2006).

Palmero e colaboradores (2008) conduziram um estudo de frequência da mutação em 750 mulheres assintomáticas participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre. A mutação foi encontrada na linhagem germinativa de duas mulheres (frequência de 0.3%) que não apresentavam história pessoal de câncer. No entanto, ao se analisar a história familiar verificou-se que ambas pertenciam à mesma família e que esta apresentava história de câncer gástrico, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de pulmão, tumor de cabeça e pescoço e câncer de endométrio. A família como um todo não preenchia critérios para a LFS e LFL e não havia nenhuma criança afetada por câncer, apesar de irmandades numerosas (Palmero e cols., 2008). Já no trabalho de Achatz e colaboradores (2007), foi descrita pela primeira vez a frequência da mutação p.R337H em famílias que preenchiam definições clínicas da LFS e LFL. Metade das famílias com mutação germinativa identificada em *TP53* apresentavam a mutação pontual p.R337H na linhagem germinativa. Apesar de o espectro tumoral ser bastante similar entre famílias com p.R337H e famílias com outras mutações no domínio de ligação ao DNA, indicando que a mutação estava associada a outros tumores além de CAC, a frequência de CAC foi duas vezes maior em famílias com p.R337H (Achatz e cols., 2007).

No estado do Paraná, o rastreamento da mutação genética é realizado no âmbito da triagem neonatal desde dezembro de 2005. Entre os primeiros 160 mil recém-nascidos

vivos testados, 455 (aproximadamente 0.3%) apresentaram a mutação em heterozigose (Piovezan, 2006).

#### ***1.4. Espécies Reativas***

Radical livre é uma molécula ou átomo que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico mais externo. Esta propriedade torna os radicais livres instáveis e reativos devido à tendência do emparelhamento do orbital, ou seja, da aquisição de um segundo elétron (Halliwell, 2006). Tal característica faz com que estas estruturas químicas reajam e se combinem com biomoléculas, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (Maxwell, 1995).

“Espécies reativas de oxigênio” (ERO) é um termo geral usado para designar não somente os radicais livres como o radical hidroxil ( $\text{OH}^\circ$ ) e o superóxido ( $\text{O}_2^\circ$ ), mas também moléculas não-radicalares derivadas do oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Droge, 2002). Apesar das ERO serem mais comumente consideradas danosas devido à sua alta reatividade e consequente capacidade de danificar estruturas celulares, outras espécies reativas (ER), tais como as de carbono, nitrogênio (ERN) e de enxofre também são produzidas pelos organismos (Halliwell, 2006).

Inúmeras são as fontes geradoras de ER. Estas podem ser endógenas, como as produzidas durante a respiração mitocondrial, ou exógenas devido à exposição a agentes como a radiação ionizante e eletromagnética, solventes orgânicos, alimentação, pesticidas e alguns medicamentos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

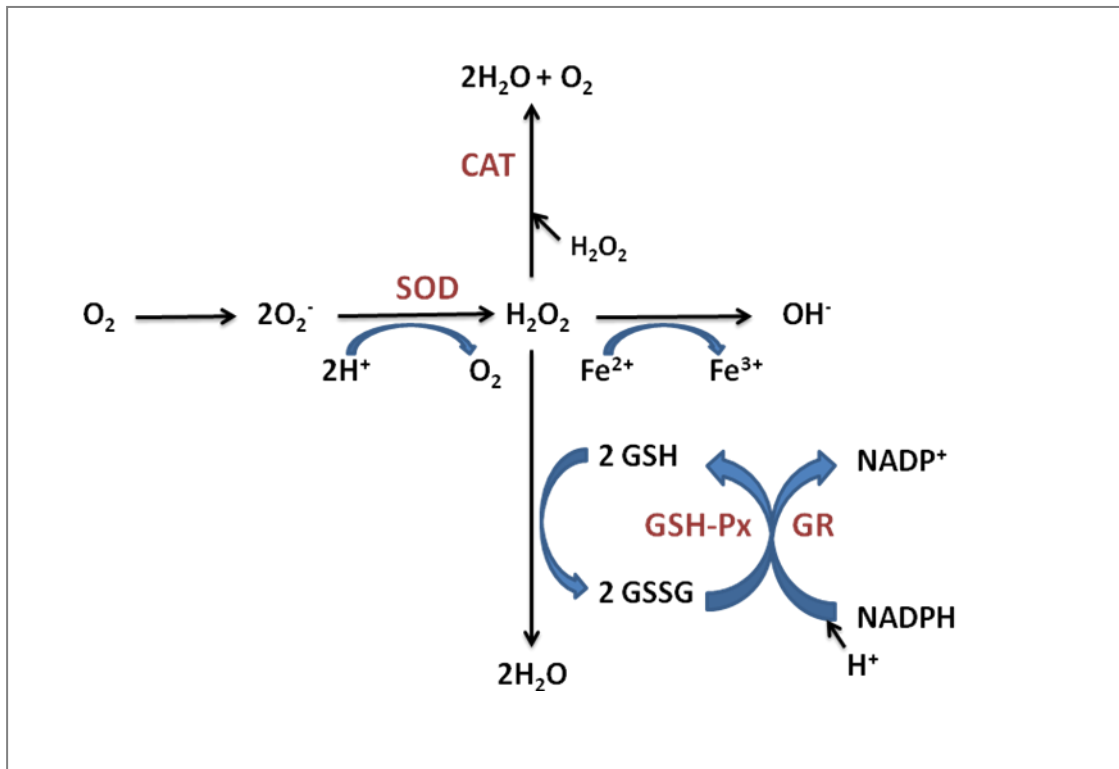
#### ***1.5. Defesas antioxidantes***

A vida aeróbia só foi bem sucedida por que os sistemas biológicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, as chamadas defesas antioxidantes. Estas são definidas como substâncias que, em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação deste (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As defesas antioxidantes classificam-se em enzimáticas e não-enzimáticas, e ambas apresentam a capacidade de converter ER em derivados inativos (Halliwell, 1994). Dentre as principais defesas enzimáticas estão as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase

(SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (Matés e Sánchez-Jiménez, 1999). Já as defesas não-enzimáticas são representadas pelo ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, glutathiona (GSH), carotenóides, flavonóides, entre outras. As defesas antioxidantes enzimáticas agem diretamente na detoxificação dos agentes antes que estes causem algum dano a biomoléculas. Já as não-enzimáticas atuam após o dano ter ocorrido, sendo responsáveis pelo reparo de lesões (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A enzima SOD atua na remoção do ânion superóxido em que um  $O_2^{\circ}$  é reduzido a  $H_2O_2$  e o outro é oxidado a  $O_2$ . Nas células animais são encontrados dois tipos principais da enzima: a CuZn-SOD (contêm cobre e zinco no sítio ativo), encontrada no espaço intermembrana da mitocôndria, no citoplasma e em fluidos celulares; e a Mn-SOD (contêm manganês no sítio ativo) que situa-se predominantemente na matriz mitocondrial. Já a CAT, enzima predominantemente peroxissomal, tem um papel fundamental no controle dos níveis do peróxido de hidrogênio. Através da degradação deste, forma-se água e oxigênio. Por fim, a enzima GPx, que também apresenta como substrato o peróxido de hidrogênio, utiliza GSH para transformar  $H_2O_2$  em  $H_2O$  juntamente com a enzima glutathiona redutase (GR), que utiliza NADPH para reduzir a glutathiona oxidada (GSSG). Ao final deste ciclo redox, ocorre a recuperação de GSH e de  $NADP^+$  (Boveris, 1988). Glutathiona peroxidase 1 (GPx1) é a isozima mais abundante da família das peroxidases e, em humanos, é encontrada no citosol de quase todas as células. Glutathiona peroxidase 2 (GPx2) e glutathiona peroxidase 3 (GPx3) apresentam localizações mais específicas, com GPx2 sendo expressa no trato gastrointestinal e GPx3 predominantemente em plasma. Já a glutathiona peroxidase 4 (GPx4) é expressa em baixos níveis em quase todos os tecidos e atua na proteção de lipídeos de membrana contra peroxidação (Ufer e Wang, 2011). (Figura 4).



**Figura 4. Redução do Oxigênio a água e enzimas antioxidantes** (Adaptado de Marks et al., 1996)

### ***1.6. Estresse Oxidativo***

Estresse oxidativo é uma situação de desequilíbrio entre a produção de ER e as defesas antioxidantes. Em inúmeras condições patológicas esse rompimento do equilíbrio pode ser em decorrência do aumento da produção de ER, diminuição das defesas antioxidantes ou pela combinação de ambas as condições. Em situações de estresse oxidativo brando e passageiro a célula pode adaptar-se aumentando a produção de antioxidantes. Já em situações severas a célula em geral evolui para necrose ou apoptose (Halliell e Gutteridge, 2007).

Estresse oxidativo também é um processo necessário para a manutenção das funções celulares normais. Uma variedade de estímulos, que direta ou indiretamente são regulados por estresse oxidativo, faz com que ERO e ERN atuem como transdutores de sinal em vias de sinalização, levando a fenótipos celulares específicos (D'Autreaux e Toledano, 2007).

**CAPÍTULO II.**  
**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## ***II.1. Justificativa***

Considerando a alta prevalência da mutação *TP53* p.R337H no Sul do Brasil, seu real risco no desenvolvimento de neoplasias associadas à SLF e LFL, e o limitado conhecimento de aspectos funcionais associados a esta mutação, propomos estudar parâmetros de estresse oxidativo e estado antioxidante em amostras biológicas de indivíduos portadores e não portadores desta alteração genética específica. Com isso espera-se agregar informação ao atual conhecimento sobre os aspectos patológicos associados a esta variante alélica. Isso poderá ser importante não só para a elucidação dos mecanismos de carcinogênese associados a esta mutação, mas também para proposição de estratégias futuras de redução do risco de câncer para estes indivíduos. Acreditamos ser este o primeiro estudo realizado em amostras de pacientes portadores da mutação. Além disso, desconhecemos outros estudos que tenham, até o presente momento, avaliado parâmetros relacionados ao metabolismo oxidativo em indivíduos portadores de mutações germinativas de *TP53*.

## ***II.2. Objetivo primário***

O objetivo geral do presente estudo consiste em avaliar parâmetros de estresse oxidativo e as defesas antioxidantes em eritrócitos, leucócitos, plasma e soro de indivíduos portadores da mutação *TP53* p.R337H em comparação com não portadores.

### ***II.2.1. Objetivos secundários***

- Avaliar o estado antioxidante total (TAS) em plasma de indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H e compará-lo ao encontrado em não portadores.
  
- Avaliar atividade de enzimas antioxidantes tais como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos, leucócitos, plasma e soro e compará-las às encontradas em não portadores.
  
- Medir o conteúdo de ácido ascórbico em plasma de indivíduos portadores da mutação p.R337H e compará-lo aos níveis deste antioxidante em não portadores.
  
- Medir os níveis de dano a lipídeos, através da determinação de malondialdeído (MDA) em plasma de portadores e não portadores.
  
- Medir os níveis de dano à proteína, através da medida do conteúdo de grupamentos carbonila e sulfidril em plasma e soro de portadores e não portadores.

### **CAPÍTULO III.**

**Antioxidants and oxidative stress in Li-Fraumeni-like syndrome patients: imbalance in redox metabolism is present in *TP53* p.R337H mutation carriers.**

(Formatado para submissão no periódico *Molecular Genetics and Metabolism*)



**Antioxidants and oxidative stress in Li-Fraumeni-like syndrome: imbalance in redox metabolism is present in *TP53* p.R337H mutation carriers.**

Gabriel de S. Macedo<sup>1,2</sup>, Leonardo Lisbôa da Motta<sup>3</sup>, Juliana Giacomazzi<sup>2</sup>, Cristina B.O. Netto<sup>4</sup>, Vanusa Manfredini, Camila S. Vanzin<sup>3,4</sup>, Carmen R. Vargas<sup>3,4</sup>, Fábio Klamt<sup>3</sup> and Patricia Ashton-Prolla<sup>1,2,4\*</sup>.

**1** Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil,

**2** Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil,

**3** Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

**4** Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brazil.

**\* Corresponding author:**

**Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD**

**Department of Genetics – UFRGS**

**Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**Rua Ramiro Barcelos 2350**

**90035-903 Porto Alegre RS**

**Brazil**

**e-mail: [pprolla@hcpa.ufrgs.br](mailto:pprolla@hcpa.ufrgs.br)**

**Tel.: + 55 51 3359-8011/ Fax: + 55 51 3359-801**

## ABSTRACT

Germline mutations in the *TP53* gene are the underlying genetic defect of Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant, Li-Fraumeni-like (LFL) Syndrome, autosomal dominant disorders characterized by predisposition to multiple early-onset cancers. More recently, p53 is emerging as an important player in redox metabolism and important enzymes involved in defenses against oxidative stress have shown to be regulated by p53, including glutathione peroxidase 1 (GPX1) and mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2). The aim of the present study was to investigate the redox profile parameters in blood of p.R337H mutation carriers and non-carriers individuals. A total of 34 individuals were included in the study and they were divided in two groups: mutation carriers (C) (n=17) and non-carriers (NC) (n=17). Erythrocyte GPx activity, an important enzymatic antioxidant defense, differed significantly between carriers and non carriers, with an increased activity in the latter ( $p = 0.048$ ). Plasma Carbonyl content, an indicative of protein damage related to ROS overgeneration, was also increased in carriers ( $p = 0.04$ ). Furthermore, an association between malondialdehyde (MDA, a lipidic peroxidation product) levels and mutation status was found in plasma. Mutation carriers had a four-fold increase in MDA levels (C=  $40.20 \pm 2.84$ , NC=  $160.5 \pm 3.64$ ,  $p < 0.0001$ ) when compared to non carriers. Finally, mutation carriers showed an increased total antioxidant status (TAS), but a decrease in the Vitamin C content in plasma, when compared to non-carriers. Our findings suggest that *TP53* p.R337H mutation carriers present an imbalance in oxidative metabolism parameters, which could be directly related to the pathophysiological mechanisms of cancer predisposition in these individuals.

**Keywords:** LFL, p53, R337H, oxidative stress, antioxidants.

## 1. Introduction

Germline *TP53* mutations are the underlying genetic defect of Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant, Li-Fraumeni-like Syndrome (LFL), autosomal dominant disorders characterized by predisposition to multiple early-onset cancers (Malkin et al., 1990). The core tumors of the syndrome are soft tissue and bone sarcomas, brain tumors, breast cancer and adrenocortical carcinoma (ACC). Other malignancies such as leukemia, melanoma, lung, gastric, pancreatic, prostate and colorectal cancer were also described in several families (Li et al., 1988; Birch et al., 2001; Wong et al., 2006). The prevalence of germline *TP53* mutations in LFS and LFL families varies according to the clinical criteria used to indicate genetic testing. Thus, about 83% of families fulfilling the more strict “classic” criteria for LFS (Olivier et al., 2003) have germline *TP53* mutations while this frequency has been described at 8 and 22% among families fulfilling the less strict LFL criteria of Eeles and Chompret, respectively (Varley et al., 2003).

The p53 nuclear phosphoprotein acts primarily as a transcription factor and is somatically inactivated in many forms of cancer. Its main role as tumor suppressor is to operate in the cellular responses to a wide range of stress signals, such as oncogenic activation and DNA damage (Vogelstein et al., 2000). Structurally, it consists of a homotetramer, and each of its monomers is composed of 393 amino acids. Well-defined domains can be identified in the protein, including an N-terminal transactivation domain, a proline-rich region, a central and highly conserved DNA-binding domain (DBD), a tetramerization domain and unstructured basic domains at the C-terminus (Laptenko et al., 2006). Activated p53 suppresses cellular transformation by regulating the expression of an array of different genes (encoding both proteins and microRNAs) involved in pathways of growth arrest, DNA repair or apoptosis in damaged cells (Meek, 2009). More recently, p53 is also emerging as an important player in redox metabolism and important enzymes involved in defenses against oxidative stress are regulated by p53 (Vousden et al., 2009). Genes such as mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2) (Hussain et al., 2004), glutathione peroxidase 1 (GPX1) (Tan et al., 1999), aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1 (ALDH4A1) (Yoon et al., 2004), and some of the genes of the sestrin family (HI95 and PA26) (Budanov et al., 2004) encode products that act as antioxidants and are modulated by p53. In 2005, Sablina et al. presented convincing evidence on the antioxidant

functions of low or basal p53 levels in the control of genetic stability and prevention of cancer (Sablina et al., 2005).

The most common *TP53* germline mutations associated with LFS and LFL are missense substitutions that cluster in highly conserved regions of the DBD including several hotspots corresponding also to those found in many forms of sporadic cancers. These mutations usually result from transitions at highly mutable CpG dinucleotides, at codons encoding residues that play essential structural and chemical roles in specific DNA-binding activities of the p53 protein. Some other “hotspot” mutations (codons 152 and 337), which also derive from transitions at CpG sites, are rarely found in sporadic tumors and may have less functional impact, representing lower penetrance mutations with particular phenotypes. Among these is the p.R337H (c.1010 G>A, CGC to CAC at codon 337) mutation in exon 10 which was initially reported in Brazilian children with ACC with no documented familial history of other cancers (Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001). More recently, the *TP53* p.R337H mutation has been associated to a broader cancer spectrum, similar to that of classic LFS, including premenopausal breast cancer and other tumors (Achatz et al., 2007; Assumpção et al., 2008) and found to be present in 0.3% of the general population in Southern Brazil (Piovezan, 2006). Unlike other common LFS mutants, which introduce profound changes in biological properties of the p53 protein, p.R337H apparently retains the ability to stop growth of cancer cells *in vitro* and to regulate specific genes only in certain physiologic conditions. Thus presence of this mutation would result in a more subtle defect in the protein, which becomes functionally deficient only under particular conditions and in specific tissues (Ribeiro et al., 2001; Lomax et al., 1998). This was partially confirmed by DiGiammarino et al., who demonstrated that the mutant becomes significantly less stable as pH increases towards a range between 7 and 8, although it is structurally very similar to the wild-type p53 (wt) protein. This biochemical property defines p.R337H as a dysfunctional pH-sensitive p53 mutant (Hainaut, 2002).

Given the relatively high prevalence of this mutant allele in Southern Brazil, and its association with an increased risk of several cancers, p.R337H may have an important contribution to the cancer burden in the region. Despite considerable knowledge about the molecular epidemiology and phenotypic presentation of the p.R337H mutant, a limited amount of information is available on functional aspects of this variant. Moreover, to our

knowledge no studies have been conducted to assess antioxidant and oxidative stress parameters in carriers of germline *TP53* mutations. Thus, the aim of the present study was to investigate the redox profile in peripheral blood of *TP53* p.R337H mutation carriers and non-carriers.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Patients and Controls**

The study was approved by the Institutional Ethics Committee (HCPA-GPPG) under protocol number 11-0099. All participants and/or their legal representatives signed informed consent. Germline *TP53* mutations testing had been previously done according to standard protocols ([http://www-p53.iarc.fr/Download/TP53\\_DirectSequencing\\_IARC.pdf](http://www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf)). A total of 34 individuals were recruited and, initially, grouped according to mutation status and age as follows: adult and pediatric p.R337H carriers (n = 11 and n = 6, respectively); adult and pediatric non-carriers (n = 10 and n = 7, respectively). One of the patients in the carrier group was a p.R337H homozygous mutant child. Three of the mutation-positive children had been diagnosed with ACC during their 1<sup>st</sup> year of life, one had been diagnosed with a choroid plexus carcinoma at the age of 12 months and two had not been diagnosed with cancer. Among the adults, only one of the mutation carriers had been diagnosed with cancer, a ductal breast carcinoma at age 35 years. The control group was mostly composed by family members of carrier individuals. Four of them were not relatives of carriers and were diagnosed with tumors unrelated to SLF. The mean interval between diagnosis of cancer and inclusion in this study was 78 months, and all cancer-affected patients were in remission and/or asymptomatic for 3 years or more.

### **2.2 Sample preparation**

Peripheral blood samples were obtained from all individuals under sterile conditions (two vials containing EDTA and one vial free of anti-coagulants). The whole blood was centrifuged at 1,000xg for separation of plasma, erythrocytes, leukocytes and serum. For antioxidant enzyme activities, erythrocytes and leukocytes were frozen and thawed three times followed by centrifugation at 1,300xg for 15 min. Samples were kept frozen at -80°C until analysis. Protein concentrations were determined by standard

methods (Lowry et al, 1951). Enzyme activity results were expressed as enzyme units (U)/mg protein. The detailed methodology used to assess each of these parameters is briefly described below.

## **2.3 Antioxidant enzyme assays**

### **2.3.1 Superoxide dismutase (SOD)**

SOD (E.C. 1.15.1.1) activity in erythrocytes, leukocytes, plasma and serum was measured by inhibition of superoxide-dependent epinephrine auto-oxidation at 480 nm (Misra et al., 1972). One SOD unit was defined as the sample amount that inhibits 50% of epinephrine auto-oxidation.

### **2.3.2 Catalase (CAT)**

CAT (E.C. 1.11.1.6) activity in erythrocytes was assayed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption at 240 nm (Aebi, 1984). One unit of the enzyme was defined as 1 μmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min.

### **2.3.3 Glutathione Peroxidase (GPx)**

GPx (E.C. 1.11.1.9) activity in erythrocytes and leukocytes was measured by NADPH oxidation at 340 nm in a system containing glutathione, glutathione reductase and *tert*-butyl hydroperoxide as substrate (Wendel, 1981). One GPx unit was defined as nmol NADPH oxidized/min.

## **2.4 Total antioxidant status (TAS)**

Total antioxidant status (TAS) was determined in plasma using the TAS<sup>®</sup> Kit (Randox, Antrim, United Kingdom). ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) was incubated with a peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce the radical ABTS<sup>®+</sup> resulting in a relatively stable blue-green color, which was measured at 600 nm. Antioxidants cause suppression of this color production to a degree which is proportional to their concentration (Miller et al., 1993). Results were expressed in mmol/L of plasma.

## **2.5 Malondialdehyde (MDA) levels and ascorbic acid content**

MDA was measured simultaneously with ascorbic acid in plasma by HPLC following the method described by Karatepe (2004) with slight modifications. One hundred ml of 0.1 M perchloric acid and 1 mL of distilled water were added to a 100  $\mu$ L aliquot of human plasma. Addition of perchloric acid was necessary to precipitate proteins and release the MDA bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. Samples were then centrifugated at 1500 g for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the column used was Supelcosil C18 (5 mm) 15 cm 4.6 mm, flow rate was 1.2 mL/min and chromatograms were monitored at 250 nm. Results were expressed in mM.

## **2.6 Protein Carbonyl content**

Plasma carbonyl content was measured according to the method described by Levine et al (Levine et al., 1990). Initially, 500  $\mu$ L of 10 Mm 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 1.0 mL of 2M HCl (blank tube) 50% trichloroacetic acid were added to duplicate aliquots (500  $\mu$ L) of each sample. After 30 min, 250  $\mu$ L of 50% trichloroacetic acid were added. Samples were centrifuged at 8000xg for 30 min to obtain the protein pellet and immediately washed with ethanol - ethyl acetate 1:1 (v/v). The final protein pellet was diluted in 500  $\mu$ L of 8M urea buffer and incubated at 50 °C for 90 min. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. Carbonyl content was calculated using the millimolar absorption coefficient of the hydrazone ( $\epsilon_{370 \text{ nm}} = 21,000,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and the results were expressed in nmol carbonyl/mg protein.

## **2.7 Statistical analyses**

All analyses were done using GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA version 5.0. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of at least 2 independent experiments. Normal distribution was tested by the Shapiro-wilk test. Correlation between ascorbic acid and MDA was performed by Pearsons's correlation test. Student t Test was used for quantitative variables. A p-Value < 0.05 was considered statistically significant.

## **3. Results**

As there were no statistically significant differences between adults and children for the various parameters evaluated (data not shown), we considered only two study groups: mutation carriers (C) (n = 17) and mutation non-carriers (NC) (n = 17) (Table 1).

Erythrocyte GPx activity was significantly higher in mutation carriers (C =  $9.23 \pm 3.34$ , NC =  $6.99 \pm 2.01$ ,  $P = 0.048$ ). All other enzyme activities did not differ between groups (Table 2).

The measure of total antioxidant status (TAS), which represents non-enzymatic antioxidant levels, was significantly higher in carriers when compared to non-carriers (C =  $1.47 \pm 0.15$ , NC =  $1.30 \pm 0.17$ ,  $P = 0.007$ ) (Figure 1). In addition, we observed a striking association between plasma MDA, a lipidic peroxidation product, and mutation status. Carriers had significantly higher MDA levels than non-carriers (C =  $160.5 \pm 3.64$ , NC =  $40.20 \pm 2.84$ ,  $P < 0.0001$ ). In addition, ascorbic acid (Vitamin C) levels were inversely related with the MDA levels (C =  $16.17 \pm 0.92$ , NC =  $33.91 \pm 0.72$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 2: A, B e C). Finally, plasma Carbonyl content was also increased in carriers (C =  $0.46 \pm 0.34$ , NC =  $0.23 \pm 0.19$ ,  $P = 0.040$ ) (Figure 3).

#### 4. Discussion

Oxidative stress refers to a situation of imbalance between pro-oxidant and antioxidant state in tissues. Primarily generated in the mitochondria, reactive oxygen species (ROS) accumulate inside the cell and can attack proteins, lipids and DNA, and such aggression thought to contribute to the pathogenesis of several human diseases including metabolic, cardiovascular, inflammatory, neurodegenerative disorders, as well as cancer (Halliwell 1999; Vurusaner et al., 2012). Recent findings highlight p53 as an important regulator of basal oxidative cell metabolism (Hafsi and Hainaut, 2011).

Sablina et al (2005) showed that in addition to its action as a potent pro-oxidant, p53 has also an important antioxidant function, downregulating intracellular ROS levels. This newly identified property of the protein is mediated through regulation of a set of antioxidant gene products that respond to lower levels of p53 even in the absence of stress. Glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) and mitochondrial superoxide dismutase 2 (*SOD2*) are two examples of genes modulated by p53 (Tan et al., 1999; Hussain et al., 2004).



In the present study, we found an increased carbonyl content and a four-fold increase in plasma MDA levels of *TP53* p.R337H mutation carriers when compared to non-carriers, indicating that protein damage and severe lipid peroxidation occur in these former. This is the first evidence for such damage in carriers of a germline *TP53* mutation. Lipid peroxidation can induce changes of permeability, fluidity, integrity and functional abnormality of biomembranes, releasing potentially toxic cellular products (Halliwell et al., 2007). On the other hand, oxidation of proteins results in the production of carbonyl (CO) groups on proteins side chains (especially of Pro, Arg, Lys and Thr), often leading to loss specific protein function. Since many proteins have exclusive biological function, there are often unique functional consequences resulting from their modification (Dalle-Donne, 2003). Although some studies refer to increased lipid peroxidation and protein oxidation in patients diagnosed with breast and colorectal cancer (Panis et al., 2011; Chang et al., 2008; Punnonen et al., 1994), little has been published on baseline oxidative stress parameters in individuals with cancer predisposing germline mutations in tumor suppressor genes. To our knowledge, only one study assessed oxidative stress parameters in the serum of cancer-unaffected carriers of germline *BRCA1* mutations and their non-carrier relatives, and they showed that mutation status did not influence lipid and protein peroxidation content (Kotsopoulos et al., 2008)

In addition to the evidence for oxidative damage, we also verified a higher activity of erythrocyte glutathione peroxidase in p.R337H carriers. GPX, an oxidative stress inducible enzyme, plays a significant role in the peroxy-scavenging mechanism and in maintaining functional integration of the cell membranes (Chandra et al., 2000). A potential explanation for this observation is that erythrocytes are highly susceptible to oxidative stress because their membranes are rich in polyunsaturated fatty acids and show high oxygen and iron content (Halliwell et al., 2001). Both, oxidative damage observed in plasma and potential increased fragility of erythrocytes could explain the higher GPx activity.

Human plasma is composed of a set of non-enzymatic antioxidant defenses that are either endogenously produced (i.e. uric acid, glutathione, albumin and bilirubin) or of dietary origin (i.e. ascorbic acid, tocopherols and carotenoids) (Nuttall et al., 1999). In this study, we observed an overall increase in total antioxidant status (TAS), while ascorbic acid, the most important antioxidant in extracellular fluids (Stocker et al., 1991), was

significantly reduced in mutation carriers. We cannot at present establish precisely which antioxidants are increased, determining the higher TAS in mutation carriers. However, one hypothesis that arises from our results is that there may be an increase in the production of endogenous antioxidants to counterbalance the increased oxidative damage that is observed, while diet-dependent antioxidants, such as ascorbic acid, are consumed.

A surprising finding of this study is that one of the patients included in the carrier group, a homozygous p.R337H mutant, is biochemically undistinguishable from the heterozygous carriers. This suggests that presence of either one or two mutant alleles, results in similar functional derangement of the protein. In the main study published on the effect of the p.R337H mutant on p53 protein stability, DiGiammarino et al. (2002) showed that, *in vitro*, homozygous mutant p53 proteins are less than 25% unfolded at pH 7. However, at pH 8 and 37°C, approximately 70% is unfolded. If this observation relates to what occurs *in vivo*, we could expect that in physiological conditions, where blood pH is regulated to stay within the narrow range of 7.35 to 7.45. (Waugh and Grant, 2007) and at 37 °C, about 40% of the mutant p.R337H p53 protein would be unfolded in a homozygote. There is convincing evidence in the literature that *TP53* mutations may confer to the mutant protein a dominant-negative activity over the wild-type allele, and this could partially explain a similar functional behavior between heterozygous and mutant homozygotes proteins (Milner et al., 1991; Milner et al., 1991; Sigal et al., 2000).

In summary, we report for the first time that oxidative damage to lipids and proteins, and increased total antioxidant levels as well as GPx activity occur in carriers of a germline *TP53* mutation. Low levels of ascorbic acid were also found in plasma of these individuals. If this is specific to the mutation studied here, p.R337H, or a feature of other deleterious *TP53* mutations, remains to be determined. The abnormal oxidative profile was observed regardless of age of the carriers and cancer diagnosis. These findings may have important implications for the diagnosis of cancer predisposition as well as for the delineation of specific therapeutic interventions in these individuals.

**Acknowledgements:**

We are grateful to Bárbara Alemar, Patrícia Koehler dos Santos, Nayê Balzan Schneider, Filippo Vairo, Liliana Cossio and Ana Luiza Maia for their valuable contributions and support. This work was supported by Brazilian grants from CNPq (133439/2010-0), FAPERGS-PRONEX (10/0051-9), FIPE/HCPA and by a grant from GlaxoSmithKline (2009 Ethnic Research Initiative Award to PA-P).

## References

- D. Malkin, F.P. Li, L.C. Strong, J.F. Jr. Fraumeni, C.E. Nelson, D.H. Kim, J. Kassel, M.A. Gryka, F.Z. Bischoff, M.A. Tainsky, S.H. Friend, Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science* 250 (1990) 1233-38.
- F.P. Li, J.F. Jr. Fraumeni, J.J. Mulvihill, W.A. Blattner, M.G. Dreyfus, M.A. Tucker, R.W. Miller, A cancer family syndrome in twenty-four kindreds, *Cancer Res.* 48 (1988) 5358-62.
- J.M. Birch, R.D. Alston, R.J. McNally, D.G. Evans, A.M. Kelsey, M. Harris, O.B. Eden, J.M. Varley, Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations, *Oncogene* 20 (2001) 4621-8.
- P. Wong, S.J. Verselis, J.E. Garber, K. Schneider, L. DiGianni, D.H. Stockwell, F.P. Li, S. Syngal, Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome, *Gastroenterology* 130 (2006) 73-9.
- M. Olivier, D.E. Goldgar, N. Sodha, H. Ohgaki, P. Kleihues, P. Hainaut, R.A. Eeles, Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype, *Cancer Res.* 63 (2003) 6643-6650.
- J.M. Varley, Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni Syndrome, *Hum. Mut.* 21 (2003) 313-20.
- B. Vogelstein, D. Lane, A.J. Levine, Surfing the p53 network, *Nature* 408 (2000) 307-10.
- O. Laptenko, C. Prives, Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 951-61.
- D.W. Meek, Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature* 9 (2009) 714-723.
- K.H. Vousden, K.M. Ryan, p53 and metabolism, *Nature* 9 (2009) 691-700.
- S.P. Hussain, P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kaneko, M. Ichimiya, S. Sengupta, L. Mechanic, S. Okamura, L.J. Hofseth, M. Moake, M. Nagashima, K.S. Forrester, C.C. Harris, p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis, *64* (2004) 2350-2356.
- M. Tan, S. Li, M. Swaroop, K. Guan, L.W. Oberley, Y. Sun, Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12061-12066.
- K.A. Yoon, Y. Nakamura, H. Arakawa, Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses, *J. Hum. Genet.* 49 (2004) 134-140.

- A.V. Budanov, A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin, P.M. Chumakov, Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD, *Science* 304 (2004) 596-600.
- A.A. Sablina, A.V. Budanov, G.V. Llyinkaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, P.M. Chumakov, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nat Med.* 11 (2005) 1306-1313.
- A.C. Latronico, E.M. Pinto, S. Domenice, M.C. Fragoso, R.M. Martin, M.C. Zerbini, A.M. Lucon, B.B. Mendonca, An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001) 4970-3.
- R.C. Ribeiro, F. Sandrini, B. Figueiredo, G.P. Zambetti, E. Michalkiewicz, A.R. Lafferty, L. DeLacerda, M. Rabin, C. Cadwell, G. Sampaio, I. Cat, C.A. Stratakis, R. Sandrini, An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 98 (2001) 9330-9335.
- M.I.W. Achatz, M. Olivier, F.L. Calvez, G. Martel-Planche, A. Lopes, B.M. Rossi, P. Asthon-Prolla, R. Giugliani, E.I. Palmero, F.R. Vargas, J.C.C. Da Rocha, A.L. Vetorre, P. Hainaut, The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families, *Cancer Letters* 245 (2007) 96-102.
- J.G. Assumpção, A.L. Seidinger, M.J. Mastellaro, R.C. Ribeiro, G.P. Zambetti, R. Ganti, K. Srivastava, S. Shurtleff, D. Pei, L.C. Zeferino, R.M. Dufloth, S.R. Brandalise, J.A. Yunes, Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil, *BMC Cancer.* 1 (2008) 8-357.
- G.C. Piovezan, Prevalence of the R337H TP53 allele in the state of Paraná, Thesis, Federal University of Paraná, Brazil (2006) (In Portuguese).
- M.E. Lomax, D.M. Barnes, T.R. Hupp, S.M. Picksley, R.S. Camplejohn, Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members, *Oncogene* 17 (1998) 643-9.
- P. Hainaut, Tumor-specific mutations in p53: the acid test, *Nat Med.* 8 (2002) 21-3.
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170-75.
- H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods enzymol*, 105 (1984) 121-126.
- A. Wendel, Glutathione peroxidase, *Methods enzymol*, 77 (1981) 325-333.

N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407-412

G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys.* 82 (1959) 70-77.

M. Karatepe, Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV, *LCGC North America*, 22 (2004) 362-65.

R.L. Levine, D. Garland, C.N. Olivier, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464-478.

B. Halliwell, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 344 (1994) 721-724.

B.Vurusaner, P. Giuseppe, H. Basaga, Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions, 52 (2012) 7-18.

H. Hafsi, P. Hainaut, Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence, *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 1655-67.

B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>a</sup> edição. New York: Oxford University Press.

I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clin Chim Acta* 329 (2003) 23-38.

D. Chang, F. Wang, Y.S. Zhao, H.Z. Pan, Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients, *Biomed Environ Sci* 21 (2008) 286-9.

C. Panis, V.J. Victorino, A.C. Herrera, L.F. Freitas, T. De Rossi, F.C. Campos, A.N. Simão, D.S. Barbosa, P. Pinge-Filho, R. Cecchini, A.L. Cecchini, Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* (2011)1851-1.

K. Punnonen, M. Ahotupa, K. Asaishi, M. Hyöty, R. Kudo, R. Punnonem, Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer, *J Cancer Res Clin Oncol* 120 (1994) 374-7.

J. Kotsopoulos, H. Shen, A.V. Rao, A. Poll, P. Ainsworth, N. Fleshner, S.A. Narod, A BRCA1 mutation is not associated with increased indicators of oxidative stress, *Clin Breast Cancer* 8 (2008) 506-10.

B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> Edition, Oxford University Press, Oxford, 2001.

R. Chandra, R. Aneja, C. Rewal, R. Konduri, K. Dass, S. Agarwal, An opium alkaloid-papaverine ameliorates ethanol induced hepatotoxicity: diminution of oxidative stress. *Ind. J. Clin. Biochem.* 15 (2000) 155-60.

R. Stocker, B. Frei, Endogenous antioxidant defense in human blood plasma: In: Sies H, ed. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. London: Academic Press (1991) 194S-200S.

E.L. DiGiammarino , A.S. Lee, C. Cadwell, W. Zhang, B. Bothner, R.C. Ribeiro, G. Zambetti, R.W. Kriwacki, A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer, *Nat Struct Biol.* 9 (2002) 12-6.

A. Waugh, A. Grant, *Anatomy and Physiology in Health and Illness* (Tenth ed.). Churchill Livingstone Elsevier. (2007) pp. 22.

## Figure legends

Figure 1. Total antioxidant status (TAS) in plasma of p.R337H carriers (n=16) and non-carriers (n=16). Data represent mean  $\pm$  SD. (\*\*)  $p < 0.01$  (Student *t* Test for unpaired samples).

Figure 2. Malondialdehyde (MDA) levels and Ascorbic acid (vitamin C) content in plasma from p.R337H mutation carriers (n=16) and non-carriers (n=16). (A) MDA levels (B) Ascorbic acid content (C) Correlation data. In (A) and (B) data represent the mean  $\pm$  S.D, (\*\*\*)  $p < 0.0001$  (Student *t* Test for unpaired samples). In (C), Pearson correlation between MDA levels and ascorbic acid content.

Figure 3. Carbonyl content (mean  $\pm$  SD) in plasma from p.R337H mutation carriers (n=11) and non-carriers (n=14). (\*)  $p < 0.05$  (Student *t* Test for unpaired samples).

Figure 1.

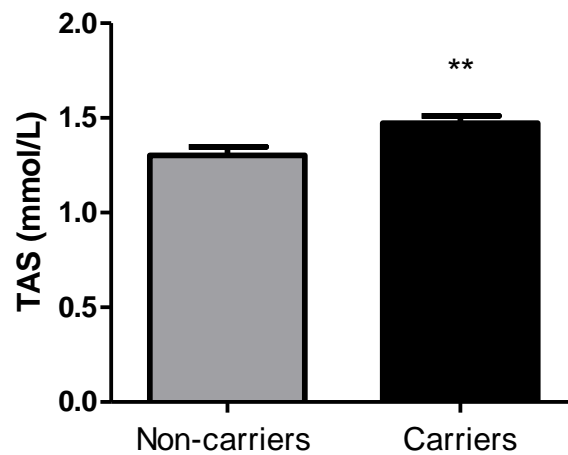
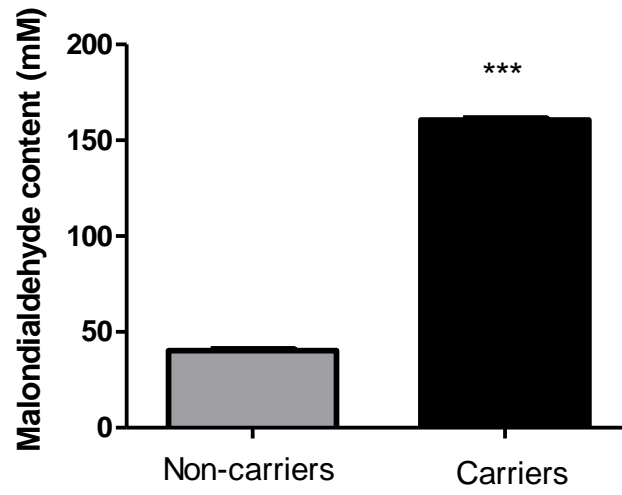


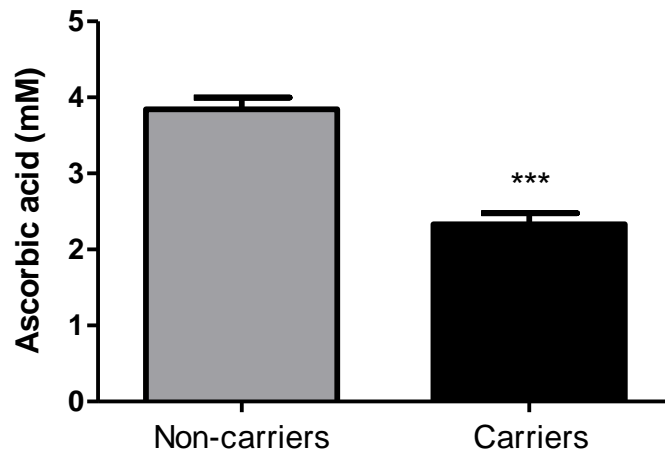


Figure 2

(A)



(B)



(C)

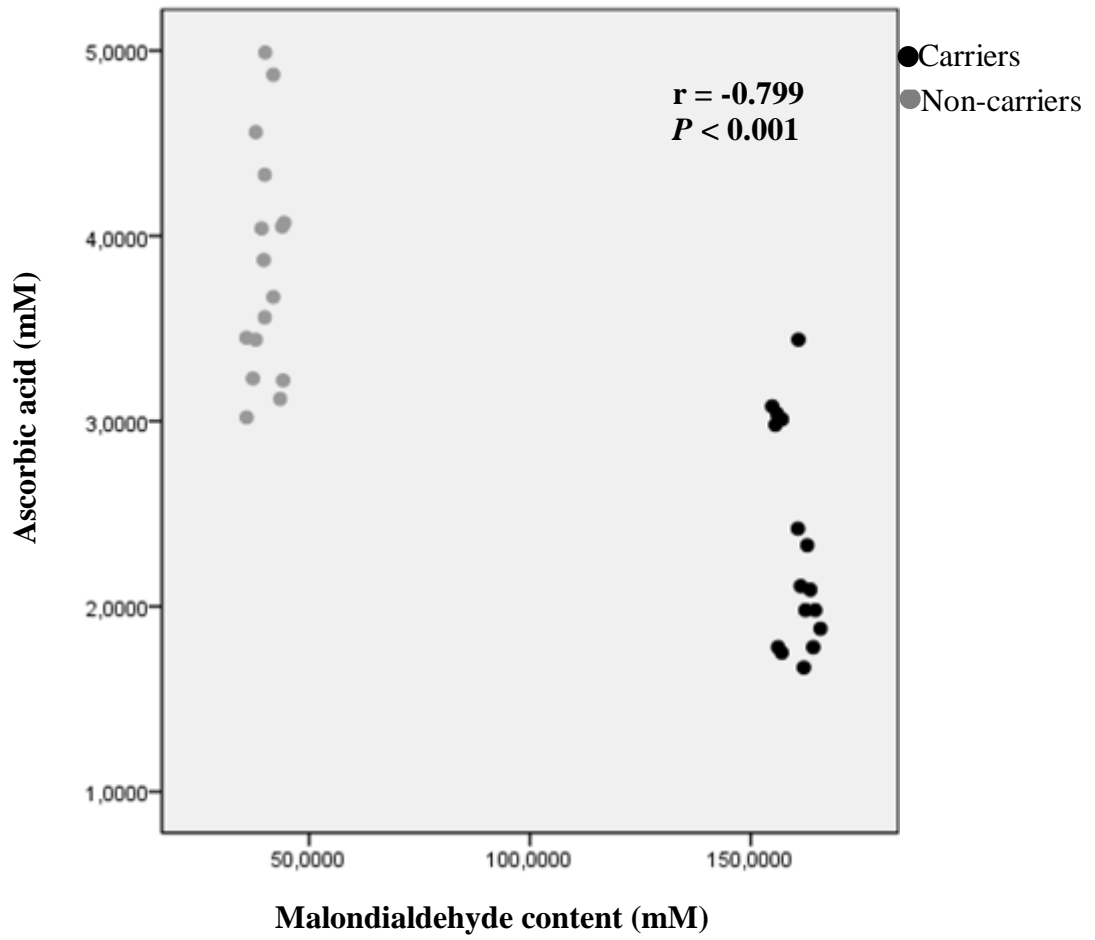


Figure 3.

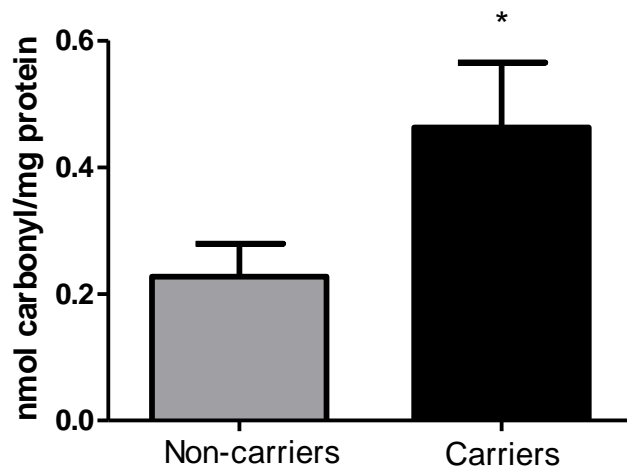


Table 1. Gender, mean age and number of individuals with cancer diagnosis in *TP53* p.R337H mutation carriers and non-carriers.

Mutation status	Gender <sup>a</sup> (n)	Mean age (range) <sup>b</sup>	Cancer diagnoses (n) and tumor type <sup>c</sup>
Mutation carriers (n=17)	M (7), F (10)	25 (3-52)	ACC (n=3), CPC (n=1), DBC (n=1)
Mutation non-carriers (n=17)	M (9), F (8)	27 (2-50)	ACC (n=1), ALL (n=1), AML (n=1), GCT (n=1) and MT (n=1)

<sup>a</sup> M=male and F=female

<sup>b</sup> in years

<sup>c</sup> ACC (adrenocortical carcinoma), CPC (choroid plexus carcinoma), DBC (ductal breast carcinoma), ALL (acute lymphocytic leukemia), AML (acute myeloid leukemia), GCT (germ cell tumor) and MT (mature teratoma)

Table 2. Antioxidant enzyme activities in blood from *TP53* p.R337H mutation carriers (C) and non-carriers (NC).

	Non-carriers	Carriers	<i>P</i> value
<b>Erythrocytes</b>			
SOD	7.15 ± 1.86 (13)	8.16 ± 3.07 (13)	0.323
CAT	24.70 ± 5.14 (13)	24.14 ± 3.33 (16)	0.728
GPx	6.99 ± 2.01 (12)	9.23 ± 3.34 (17)	0.048
<b>Leukocytes</b>			
SOD	40.49 ± 1.63 (11)	40.02 ± 2.50 (16)	0.593
GPx	6.29 ± 2.33 (13)	8.12 ± 3.17 (16)	0.093
<b>Plasma</b>			
SOD	32.09 ± 2.47 (13)	31.67 ± 2.05 (17)	0.616
<b>Serum</b>			
SOD	8.35 ± 1.28 (9)	7.35 ± 1.66 (11)	0.156

Data are presented as mean ± S.D. All results are expressed as enzyme units (U)/mg protein. Number of individuals considered after exclusion of measurements ± 2SD from the mean are given in parenthesis.

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSSÃO**

A discussão específica e completa referente aos resultados obtidos no presente trabalho encontra-se no manuscrito (Capítulo III). Neste capítulo serão mencionados aspectos mais gerais referentes ao tema e novas hipóteses e perguntas de pesquisa que são suscitadas pelos resultados encontrados. Assim, pretende-se tornar o texto não repetitivo com aquele já apresentado no capítulo III. No entanto, alguma sobreposição de tópicos é inevitável, visto a escassez de dados prévios sobre o tema na literatura.

Baseado em uma das funções de p53 mais recentemente identificadas, a função antioxidante (Sablina e cols., 2005), nossa hipótese inicial para este estudo era de que os indivíduos portadores de uma alteração germinativa específica em *TP53*, encontrada em aproximadamente 0.3% dos recém-nascidos vivos da região Sul do Brasil (Palmero e cols., 2008; Piovezan, 2006), poderiam apresentar alterações em parâmetros de metabolismo oxidativo mesmo em tecidos normais.

Tradicionalmente, mutações em genes supressores de tumor são recessivas e de perda de função. A presença de um único alelo alterado torna os indivíduos predispostos ao câncer. No entanto, para a manifestação mais bem descrita da doença, a ocorrência de câncer em idade precoce, um segundo evento (mutação ou deleção do gene) deve, necessariamente, ocorrer (Hanahan e Weinberg, 2000). Mais recentemente, tem se descoberto outros efeitos funcionais de mutações nesta classe de genes, que sugerem não ser absolutamente necessária a ocorrência do segundo evento para desencadear a carcinogênese. Estudos com o gene supressor de tumor *PTEN* exemplificam essa nova noção de patogênese associada aos genes supressores de tumor. *PTEN* codifica uma proteína com atividade de fosfatase envolvida em vias de proliferação celular, apoptose e angiogênese. A inativação do gene ocorre em inúmeras neoplasias malignas, incluindo gliomas, melanomas, carcinomas de endométrio, tumores renais, câncer de pulmão e próstata, sendo, portanto considerado um importante supressor tumoral. Assim como mutações somáticas de *TP53* ocorrem em tumores esporádicos e mutações germinativas estão associadas a uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer (SLF), mutações germinativas de *PTEN* estão associadas à síndrome de Cowden, em que uma mutação germinativa em um dos alelos do gene predispõe a câncer de mama, endométrio, tireóide, entre outros tumores. Nessa situação, entretanto, foi documentado que a inativação bi-alelica de *PTEN* ocorre em uma porcentagem pequena das neoplasias em pacientes com a

síndrome de Cowden, sugerindo que a perda de um único alelo (haploinsuficiência) já seria suficiente para promover a progressão tumoral (Kwabi-Addo e cols., 2001).

Alguns estudos demonstram que além da perda das funções supressoras de tumor de p53, mutações no gene associadas a câncer conferem à proteína novas atividades (mutações de ganho de função). Estas são selecionadas positivamente e contribuem para os vários estágios da carcinogênese, incluindo resistência a certas estratégias terapêuticas (Oren e Rotter, 2010). Além disso, mutações em *TP53* podem apresentar um efeito negativo dominante sobre o alelo selvagem. Alguns trabalhos concluíram que mesmo em células que expressam um único alelo mutante, a habilidade de transativação de genes endógenos regulados pela proteína já podem ser prejudicadas. (Willis e cols., 2003).

Apesar do efeito da mutação *TP53* p. R337H (haploinsuficiência, ganho de função ou negativo dominante) não ser conhecido e não ter sido o alvo deste estudo, algumas hipóteses podem ser levantadas a partir dos resultados encontrados. Em nossa série de casos, foi incluída uma paciente que herdou ambos os alelos com a mutação p.R337H, um evento raramente descrito em mutações germinativas de genes supressores de tumor e que na maioria das vezes acredita-se ser incompatível com a vida. Essa paciente foi diagnosticada com CAC no primeiro ano de vida, como comumente ocorre em heterozigotos, e encontra-se assintomática há nove anos. Dentre os três outros casos pediátricos com história pessoal de câncer e heterozigotos para a mutação, dois deles tiveram diagnósticos em idades muito semelhantes (um com CAC e outro com carcinoma de plexo coróide). Já o terceiro caso, desenvolveu um CAC ainda mais precocemente, aos cinco meses de vida. Apesar de ser apenas um único indivíduo portador da mutação em homozigose, ao levarmos em consideração a história clínica e os valores de todos os parâmetros avaliados neste trabalho, não houve diferenças fenotípicas significativas (tanto considerando fenótipo tumoral quanto fenótipo bioquímico) entre os indivíduos heterozigotos e a paciente homozigota para a mutação (exemplificado pela Tabela 1 dos anexos). Assim, poderíamos inferir, indiretamente, que o efeito de um ou ambos os alelos mutados parece ser o mesmo. Essas observações seriam compatíveis com o de mutações de efeito negativo dominante, frequentemente encontradas em p53, ou até mesmo com o modelo de haploinsuficiência, mas devem ser melhor investigadas através de estudos de expressão gênica (mRNA) e proteica.

Apesar do estudo de DiGiammarino e colaboradores (2005) ter mostrado que o efeito da mutação p.R337H é condicional, com uma estabilidade da proteína mutada dependente do pH, o trabalho deixa em aberto algumas questões. Primeiro este modelo de mutação parece explicar apenas a tumorigênese adrenocortical. Com argumento para esta associação específica, corroborada pelas séries iniciais de casos estudados (mas refutada pela ocorrência de vários outros tumores em famílias com a mutação), os autores relacionam a estabilidade da proteína com o remodelamento que o tecido da adrenal sofre no período pré e pós-natal. Durante esta fase de desenvolvimento da glândula a via apoptótica precisa estar íntegra. Com o aparente aumento de pH que células em apoptose sofrem durante o processo (pH intracelular pode alcançar 7.9) o domínio de oligomerização de p53 poderia estar desestabilizado, levando à perda das atividades supressoras de tumor neste tecido específico. No entanto, indivíduos portadores da mutação p.R337H apresentam risco aumentado não somente para CAC, mas também para outras neoplasias, como câncer de mama, osteosarcomas e carcinoma de plexo coróide (Custódio e cols., 2011; Assumpção e cols., 2008; Achatz e cols., 2007). Além disso, algumas outras questões não foram explicadas pelo estudo. O remodelamento perinatal da glândula, citado anteriormente, também ocorre no timo. Porém, indivíduos portadores da mutação não são propensos a tumores tímicos. Segundo, camundongos nulos para *TP53* não apresentam alterações no desenvolvimento da glândula adrenal, indicando que p53 não atua na morfogênese do órgão nestes animais. Por último, pelo forte envolvimento da proteína no mecanismo apoptótico, esperar-se-ia que a glândula adrenal fosse de maior tamanho em casos de deficiência de p53, no entanto isso nunca foi demonstrado em humanos ou em modelos animais (Achatz, 2008).

Os resultados obtidos nesta dissertação mostram uma associação do estresse oxidativo com a mutação germinativa *TP53* p.R337H. O achado mais surpreendente encontrado foi em relação à medida de malondialdeído (MDA), um indicador de dano oxidativo a lipídeos. Indivíduos portadores da mutação p.R337H apresentaram medidas de MDA quatro vezes maiores do que a dos indivíduos sem a mutação. Todos os 16 portadores apresentaram medidas entre 154.85 - 165.77 mM de MDA, enquanto que o grupo controle (n=16) apresentou valores entre 35.80 - 44.36 mM de MDA. Curiosamente, no grupo dos portadores os valores foram muito semelhantes entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, o que nos indica que a mutação por si só é suficiente para o desbalanço



nas dosagens de MDA e de todos os outros parâmetros. Dentre os indivíduos controle recrutados para o estudo, cinco deles também haviam apresentado diagnóstico prévio de câncer. Quatro deles desenvolveram tumores que não estão associados à SLF ou LFL, e uma criança apresentou um adenocarcinoma na glândula adrenal, mas teve resultado negativo para qualquer mutação de sequência codificadora em *TP53*. Esse resultado reforça a ideia de que as alterações em parâmetros antioxidantes (GPx, estado antioxidante total e ácido ascórbico) e o significativo dano oxidativo (à lipídeos e proteínas) em portadores do alelo R337H estão associadas à mutação e não ao diagnóstico de câncer.

Outro achado de relevância encontrado neste estudo foram os baixos níveis de ácido ascórbico (Vitamina C) observados em indivíduos portadores da mutação p.R337H. A vitamina C atua em diversas vias metabólicas, dentre estas na síntese de epinefrina e corticosteróides, no aumento da absorção de ferro e na inativação de radicais livres (Padh, 1991). Além disso, já foi experimentalmente provado que a Vitamina C tem um importante papel inibitório da síntese protéica, do DNA e RNA. (Lupulescu, 1991). Patak e colaboradores (2004) demonstraram que a glândula adrenal, juntamente com a hipófise e retina, é um dos órgãos do corpo humano que mais acumula vitamina C. A deficiência desta traz diversas consequências aos processos fisiológicos normais da glândula. Apesar de não ter sido o objetivo deste estudo mostrar as consequências dos baixos níveis de Vitamina C, pode-se acreditar que se esta deficiência está presente ainda na embriogênese, ou até mesmo durante a gestação de mães portadoras da mutação, uma série de alterações bioquímicas durante o desenvolvimento glândula podem estar relacionados a transformação maligna.

Por fim, nossos dados fornecem evidências da ocorrência de alterações em defesas antioxidantes e parâmetros de dano oxidativo em portadores da mutação p.R337H. Apesar da grande heterogeneidade de funções da proteína p53, nosso estudo mostrou que a atividade antioxidante de p53 mutada está prejudicada neste grupo de indivíduos, o que poderia estar associado à susceptibilidade a tumores. A confirmação deste achado em uma série maior de casos e a investigação da resposta a agentes antioxidantes poderá ter importantes implicações terapêuticas para os indivíduos portadores desta alteração genética

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSÃO**

Considerando os resultados encontrados no presente estudo, podemos concluir que:

a) Indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* apresentam alterações em parâmetros do metabolismo oxidativo, possivelmente devido a prejuízo na função antioxidante da proteína p53 mutada.

b) A atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase (GPx) em eritrócitos está aumentada em indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*.

c) As atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos, leucócitos, plasma e soro e de catalase (CAT) em eritrócitos em portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* não diferem daquelas encontradas em não portadores.

d) O conteúdo de ácido ascórbico (Vitamina C) é significativamente menor em indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* quando comparado a indivíduos não portadores.

e) O estado antioxidante total (TAS) está aumento em portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*, quando comparado a não portadores..

d) Os níveis de malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, são significativamente maiores em plasma de indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*, quando comparado a não portadores, sugerindo dano oxidativo a lipídios neste grupo de indivíduos.

e) O nível de grupamentos carbonila, um indicador de dano a proteínas, está significativamente aumentado em plasma de indivíduos portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53*.

f) O diagnóstico de câncer e o tipo de tumor não parecem influenciar as medidas de ácido ascórbico (Vitamina C) e malondialdeído (MDA) em portadores e não portadores da mutação germinativa p.R337H em *TP53* (Anexo – Figura 1).

g) Os resultados dos parâmetros avaliados em heterozigotos foram comparáveis aos observados para o único indivíduo homozigoto para a mutação germinativa p.R337H em *TP53* (Anexo – Tabela 1).

**CAPÍTULO VI**  
**PERSPECTIVAS**

- Estudar a expressão de proteínas reguladas por p53 em fibroblastos de indivíduos heterozigotos e homozigoto para a mutação p.R337H em *TP53*, bem como de portadores de uma mutação clássica (G245S) e compará-las àquelas encontrada em não portadores;
- Estudar o mecanismo de senescência mediante indução de dano ao DNA em fibroblastos de indivíduos heterozigotos e homozigoto para a mutação p.R337H em *TP53*, bem como de portadores da uma mutação clássica (G245S) e compará-lo ao encontrado em não portadores;
- Estudar parâmetros mitocondriais tais como atividade e produção de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos de indivíduos heterozigotos e homozigoto para mutação p.R337H em *TP53*, bem como em fibroblastos de portadores de uma mutação clássica (G245S) e compará-los aos encontradas em não-portadores;
- Estudar a variabilidade genética e evolução molecular de fragmentos específicos do mtDNA e correlacioná-la com os níveis de espécies reativas produzidas pela mitocôndria em indivíduos heterozigotos e homozigoto para mutação p.R337H em *TP53*, bem como de portadores de uma mutação clássica (G245S) e compará-la a encontrada em não portadores;
- Estudar parâmetros de metabolismo oxidativo tais como antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, e medidas de dano oxidativo em amostras de plasma de indivíduos com alguma mutação germinativa em *TP53* antes e após a suplementação com antioxidantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, *et al.* (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96-102.
- Birch JK (1994) Li-Fraumeni Syndrome. *Eur J Cancer* 30:1935-41.
- Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 46:148-154.
- Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ, Varley JM (1998) Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 17:1061-8.
- Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, Brugières L, Chompret A, de Paillerets BB, Stoppa-Lyonnet D, Bonaïti-Pellié C, *et al.* (2008) Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet* 45:535-8.
- Boveris A (1988). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)* 58:350-356.
- Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM (2004) Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304: 596-600.
- Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJ, Pathak S, Lozano G, Multani AS, Chang S. (2007) Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep* 8:497-503.
- Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F (2008) Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* 29:8-32.
- D'Autréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813-24.
- Deng Y, Chan SS, Chang S (2008) Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8:450-458
- DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW (2020) A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 9:12-6.

- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-65.
- Eeles RA (1995) Germline mutations in TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-24.
- Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, *et al.* (2006) Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 43:91-96.
- Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, Brugières L, Berthet P, Bressac-de Paillerets B, Chevrier A, Chompret A, Cohen-Haguénauer O, Delattre O, *et al.* (2001) *Bull Cancer* 88:581-7.
- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F (2004) A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 23:1954-1956.
- Hafsi H, Hainaut P (2011) Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. *Antioxid Redox Signal* 15:1655-67.
- Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress 10:5-12
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-22.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>a</sup> edição. New York: Oxford University Press.
- Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77:81-137.
- Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M, Teare MD (1989) Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? *Cancer Genet Cytogenet* 42:221-6.
- Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, *et al.* (2004) p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis, 64:2350-2356.



- Laptenko O, Prives C (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities *Cell Death Differentiation* 13: 951-961.
- Lavigne A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9:3982-91.
- Leal JF, Fominaya J, Cascón A, Guijarro MV, Blanco-Aparicio C, Leonart M, Castro ME, Ramon Y Cajal S, Robledo M, Beach DH, Carnero A. Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes (2008) *Oncogene* 27:1961-70.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division (1997) *Cell* 88:323-31.
- Li FP, Fraumeni JF (1969) Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 43:1365-73.
- Li FP, Fraumeni JF (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71:747-52.
- Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-62.
- Lupulescu A (1991) Vitamin C inhibits DNA, RNA and protein synthesis in epithelial neoplastic cells. *Int J Vitam Nutr Res* 61:125-9.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, *et al.* (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 50:1233-8.
- Marks DB, Marks AD, Smith CM (1996) Oxygen metabolism and oxygen toxicity. In: Velker, J. (Ed.) *Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. Baltimore: Williams & Wilkins. 327-340.
- Masciari S, Dewanwala A, Stoffel EM, Lauwers GY, Zheng H, Achatz MI, Riegert-Johnson D, Foretova L, Silva EM, Digianni L, *et al.* (2011) Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet Med* 13:651-7.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 4:D339-45.
- Maxwell SR (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-61.
- Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:702-12

- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, *et al.* (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705-8.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19:607–614.
- 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.
- Oren M (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* 10:431-442.
- Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, *et al.* (2008) 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* 261:21-5.
- Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR (2004) Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocr Res* 30:871-5.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (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: 622–629.
- Piovezan GC, Prevalence of the R337H TP53 allele in the state of Paraná, Thesis, Federal University of Paraná , Brazil (2006) (In Portuguese).
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9330-5.
- Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *TRENDS in Mol. Med* 12:440-450.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 11:1306-13.
- Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y (1999) Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem* 274:12061-6
- Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM (2006) A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell* 9:273-285.

- Ufer C, Wang CC (2011) The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Molec. Neurosc* 4:1-14.
- Williams WR, Strong LC (1987) Familial Cancer, 1st International Research Conference (Karger, Basel, 1985). *J. Natl. Cancer Inst* 79:1213.
- Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications (2009) *Nat Rev Cancer* 9:95-107.
- Varley JM Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni Syndrome (2003) *Human Mut* 21: 313-320.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 8:661-5.
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137:413-31.
- Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H (2004) Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J. Hum. Genet* 49:134-140.

**ANEXOS**

Tabela 1. Valores de Malondialdeído (MDA) e ácido ascórbico em indivíduos com diferentes genótipos.

Indivíduo/ Genótipo	Adulto (A) ou Pediátrico (P)	Diagnóstico de Câncer	Níveis de MDA (mM)	Conteúdo de ácido ascórbico (mM)
1 – R337H/R337H	P	CAC	161.29	2.11
2 – R337H/WT	P	CAC	164.15	1.78
3 – R337H/WT	P		162.77	2.33
4 – R337H/WT	P	CAC	164.61	1.98
5 – R337H/WT	P		155.94	3.04
6 – R337H/WT	P	CPC	154.85	3.08
7 – R337H/WT	A		157.02	1.75
8 – R337H/WT	A		162.00	1.67
9 – R337H/WT	A	CDIM	163.49	2.09
10 – R337H/WT	A		165.77	1.88
11 – R337H/WT	A		157.04	3.01
12 – R337H/WT	A		160.67	2.42
13 – R337H/WT	A		155.55	2.98
14 – R337H/WT	A		160.78	3.44
15 – R337H/WT	A		162.38	1.98
16 – R337H/WT	A		156.17	1.78
18 – WT/WT	P		43.44	3.12
19 – WT/WT	P	CAC	39.94	4.33
20 – WT/WT	P	LMA	43.88	4.05
21 – WT/WT	P	LLA	41.89	3.67
22 – WT/WT	P	TCG	39.24	4.04
23 – WT/WT	P	TM	37.25	3.23
24 – WT/WT	A		37.92	3.44

25 – WT/WT	A	44.10	3.22
26 – WT/WT	A	44.36	4.07
27 – WT/WT	A	35.81	3.45
28 – WT/WT	A	40.06	4.99
29 – WT/WT	A	41.88	4.87
30 – WT/WT	A	39.71	3.87
31 – WT/WT	A	37.92	4.56
32 – WT/WT	A	35.83	3.02
33 – WT/WT	A	39.94	3.56

---

WT – Wildtype (genótipo selvagem); CAC (Carcinoma adrenocortical), CPC (Carcinoma de pléxo coróide), CDIM (Carcinoma ductal invasivo da mama), TCG (Tumor de células germinativas), LMA (Leucemia mielóide aguda), LLA (Leucemia linfocítica aguda), TM (Teratoma maduro).

Figura 1. Atividade em eritrócitos de SOD em indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $7.15 \pm 1.86$ , n = 13; P =  $8.16 \pm 3.07$ , n = 13; p = 0.323).

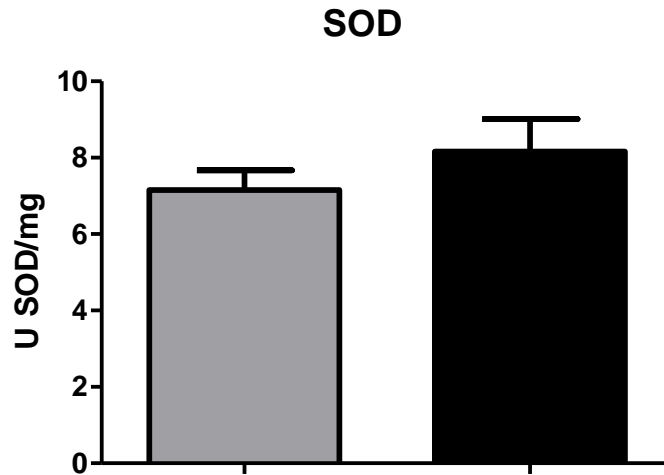


Figura 2. Atividade em eritrócitos de CAT em indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $24.70 \pm 5.14$ , n=13; P =  $24.14 \pm 3.33$ , n = 16; p = 0.728).

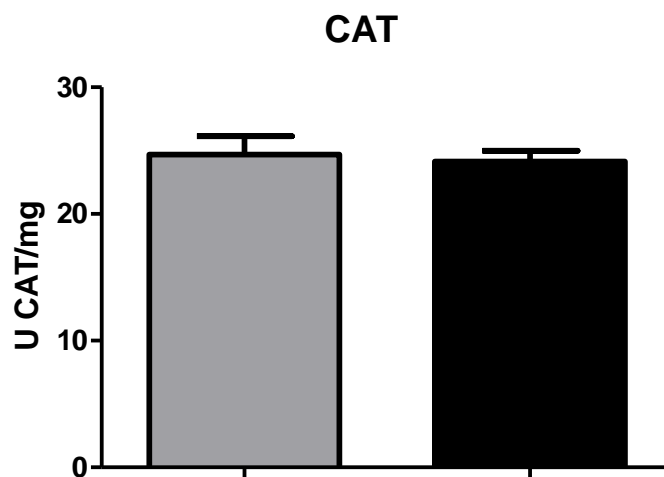


Figura 3. Atividade em eritrócitos de GPx em indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $6.99 \pm 2.01$ , n = 12; P =  $9.23 \pm 3.34$ , n = 17; p = 0.048).

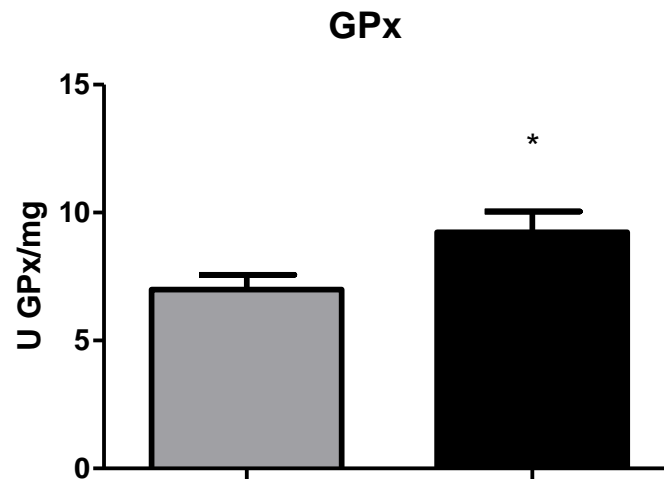


Figura 4. Nível de grupamento tióis reduzidos (SH) em eritrócitos de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $102.7 \pm 8.14$ , n=13; P =  $99.50 \pm 13.40$ , n = 16; p = 0.4612).

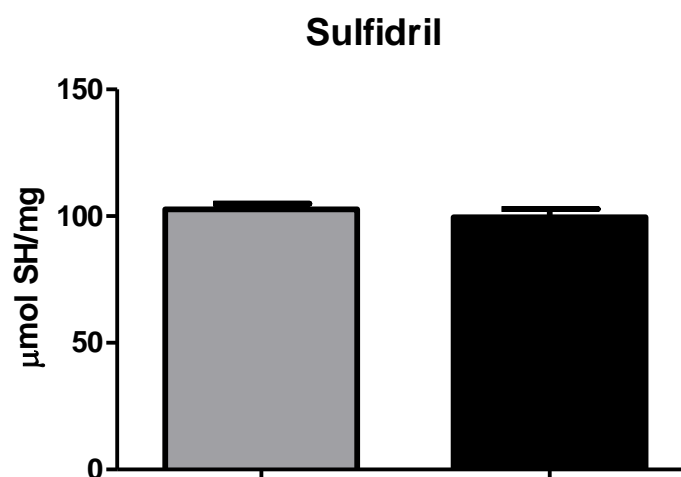




Figura 5. Atividade de SOD em leucócitos de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $40.49 \pm 1.63$ , n = 11; P =  $40.02 \pm 2.50$ , n = 16; p = 0.593).

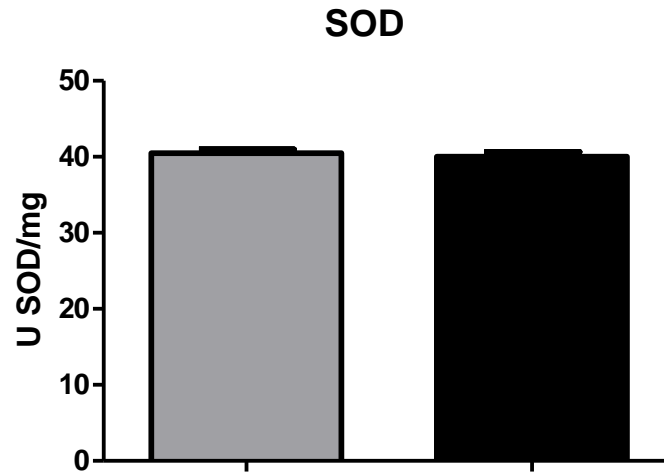


Figura 6. Atividade de GPx em leucócitos de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $6.29 \pm 2.33$ , n = 13; P =  $8.12 \pm 3.17$ , n = 16; p = 0.093).

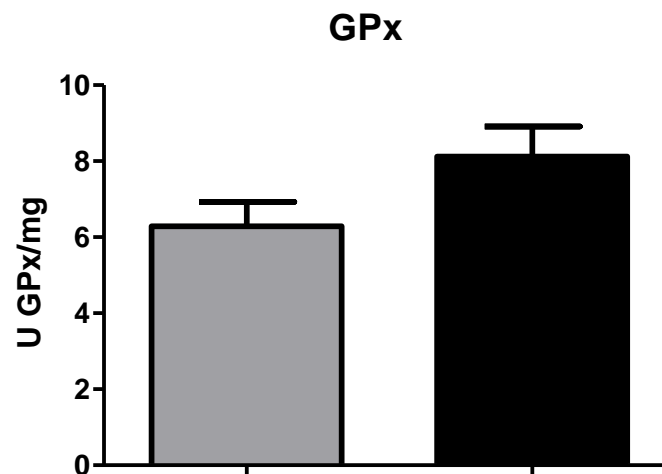


Figura 7. Atividade de SOD em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $32.09 \pm 2.47$ , n = 13; P =  $31.67 \pm 2.05$ , n = 17; p = 0.616).

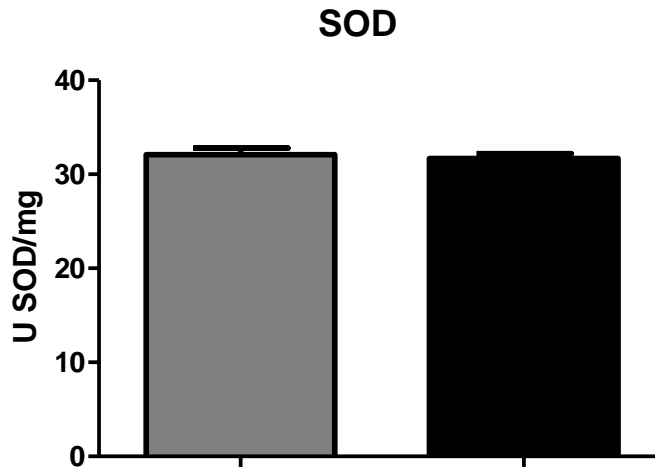


Figura 8. Níveis de Malondialdeído (MDA) em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $40.20 \pm 2.84$ , n = 16; P =  $160.5 \pm 3.64$ , n = 16; p < 0.0001).

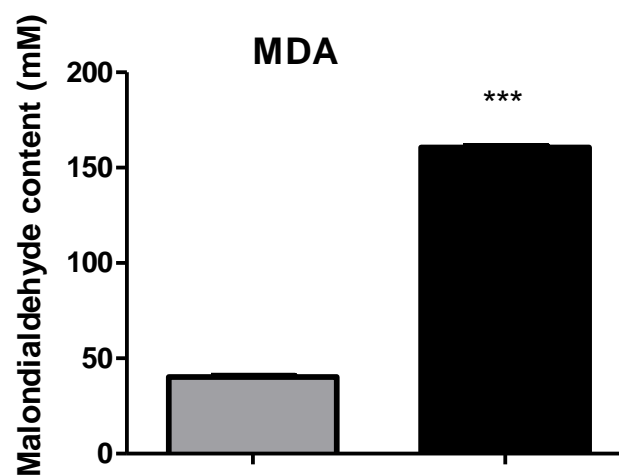


Figura 9. Nível de grupamentos carbonila em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NC =  $0.23 \pm 0.19$ , n = 14; C =  $0.46 \pm 0.34$ , n = 11; p = 0.040).

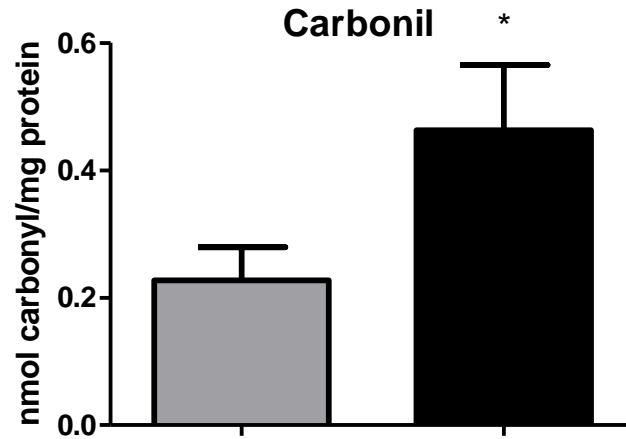


Figura 10. Nível de grupamento tióis reduzidos (SH) em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $7.53 \pm 3.98$ , n = 12; P =  $5.80 \pm 2.90$ , n = 15; p = 0.202)

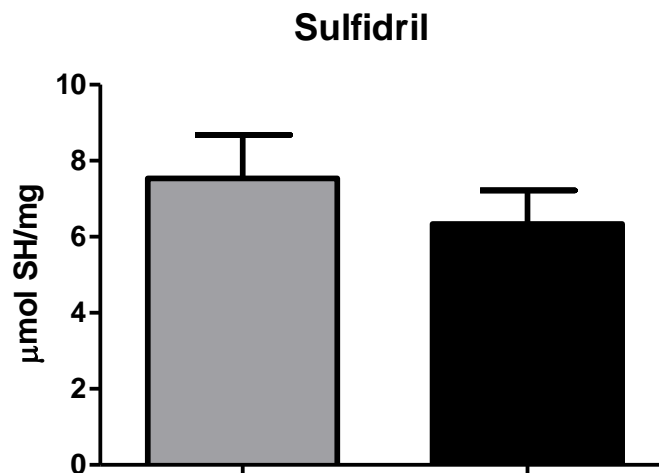


Figura 10. Conteúdo de Ácido ascórbico em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $3.84 \pm 0.61$ , n = 16; P =  $2.33 \pm 0.58$ , n = 16; p < 0.0001)

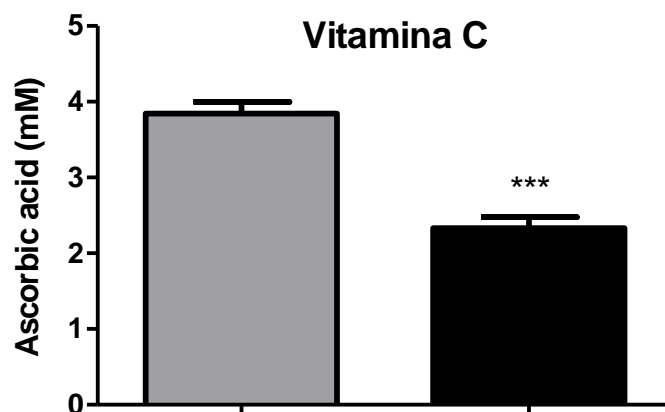


Figura 10. Estado antioxidante total em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $1.30 \pm 0.17$ , n = 16; P =  $1.47 \pm 0.15$ , n = 16; p < 0.007)

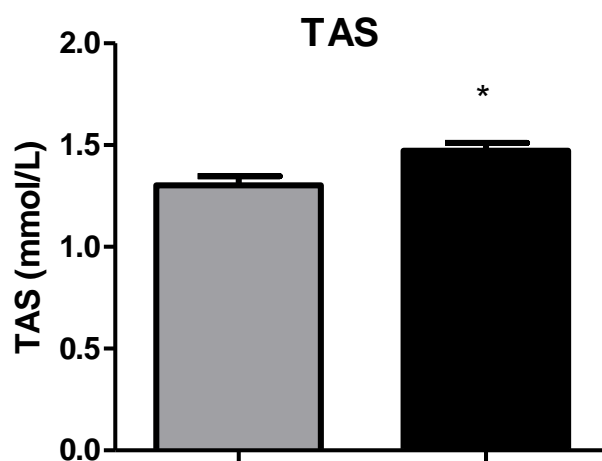


Figura 11. Atividade de SOD em soro de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP=  $8.35 \pm 1.28$ , n = 9; P =  $7.35 \pm 1.66$  n = 11; p = 0.156).

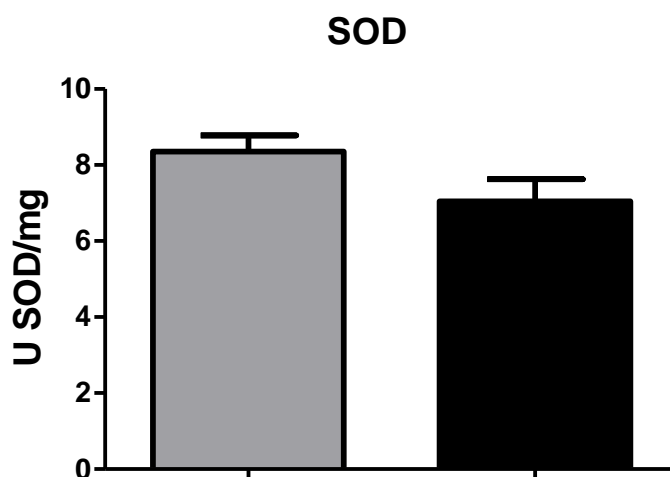
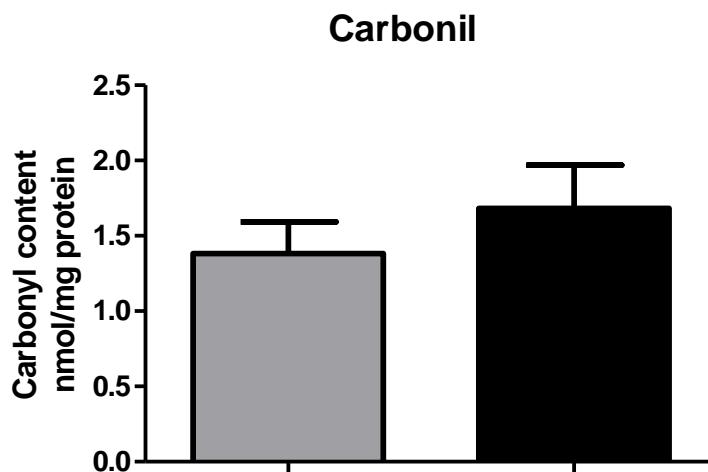


Figura 12. Nível de grupamentos carbonila em plasma de indivíduos não portadores (NP) e portadores (P) da mutação. (NP =  $1.38 \pm 0.70$ , n = 11; P =  $1.51 \pm 0.85$ , n = 12; p = 0.705).



## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Casos Adultos

Projeto de Pesquisa: Estudo do Estresse Oxidativo e apoptose em amostras de sangue de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Investigadores Responsáveis: Gabriel de Souza Macedo, Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Lisboa Izetti Ribeiro, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Guido Lenz, Fábio Klamt e Patricia Ashton-Prolla.

Serviço de Genética Médica (Ambulatório de Oncogenética) e Laboratório de Medicina Genômica; Centro de Pesquisas; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre –RS Telefone: (51) 3359-7661

Comitê de ética em pesquisa – Telefone:33598304

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Ambulatório de Oncogenética e pelo Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em colaboração com a UFRGS. Sua participação neste projeto deve-se ao fato de você ser portador de uma mutação genética em *TP53* (p.R337H ou qualquer outra no mesmo gene). Estas mutações estão associadas a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni. Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente desenvolvem câncer. Existe, porém, a possibilidade de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação R337H, pode ser mais frequente em nosso meio.

A pesquisa tem por objetivo comparar características metabólicas, tais como a capacidade de eliminação de células com algum defeito (mecanismo de apoptose) e os níveis de estresse oxidativo (condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de moléculas danosas para o organismo e sua desintoxicação) de pessoas com e sem uma alteração em uma parte do material genético (gene *TP53*) que causa maior risco de câncer. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você decidir participar, a pesquisa vai envolver a coleta de sangue para que as células sejam mantidas e estudadas no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa relacionada ao gene *TP53*. Será coletada uma pequena amostra de sangue (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode concordar ou não com a realização deste exame e sua decisão, seja qual for, não afetará o seu atendimento na Instituição. Após o término do estudo o material biológico (células em cultura) que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras

pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque com um X):

( ) autoriza o armazenamento.

( ) não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Pode, entretanto, contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido dos pacientes portadores desta alteração genética, melhor entendimento das conseqüências da presença da mutação e desenvolvimento de terapias anticâncer para essa situação específica.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis, no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital.** A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Paciente:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_



## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Controles Adultos

Projeto de Pesquisa: Estudo do Estresse Oxidativo e apoptose em amostras de sangue de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Investigadores Responsáveis: Gabriel de Souza Macedo, Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Lisboa Izetti Ribeiro, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Guido Lenz, Fábio Klamt e Patricia Ashton-Prolla.

Serviço de Genética Médica (Ambulatório de Oncogenética) e Laboratório de Medicina Genômica; Centro de Pesquisas; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre –RS Telefone: (51) 3359-7661

Comitê de ética em pesquisa – Telefone:33598304

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Ambulatório de Oncogenética e pelo Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Sua participação neste projeto deve-se ao fato de você não apresentar história pessoal de câncer e não ser portador de uma mutação genética em *TP53*. Estas mutações estão associadas a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni. Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente desenvolvem câncer. Existe, porém, a possibilidade de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma única alteração em *TP53*, a mutação R337H, pode ser mais freqüente em nosso meio.

A pesquisa tem por objetivo comparar características metabólicas, tais como a capacidade de eliminação de células com algum defeito (mecanismo de apoptose) e os níveis de estresse oxidativo (condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de moléculas danosas para o organismo e sua desintoxicação) de pessoas com e sem uma alteração em uma parte do material genético (gene *TP53*) que causa maior risco de câncer. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você decidir participar, a pesquisa vai envolver a coleta de sangue para que as células sejam mantidas e estudadas no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa relacionada ao gene *TP53*. Será coletada uma pequena amostra de sangue (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode concordar ou não com a realização deste exame e sua decisão, seja qual for, não afetará o seu atendimento na Instituição. Após o término do estudo o material biológico (células em cultura) que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras

pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque com um X):

( ) autoriza o armazenamento.

( ) não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Pode, entretanto, contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido dos pacientes portadores desta alteração genética, melhor entendimento das conseqüências da presença da mutação e desenvolvimento de terapias anticâncer para essa situação específica.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis, no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital.** A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a) sem qualquer conseqüência para o seu atendimento no HCPA.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

**Participante (controle):** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Casos Pediátricos

### Autorização por representação de paciente

Projeto de Pesquisa: Estudo do Estresse Oxidativo e apoptose em amostras de sangue de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Investigadores Responsáveis: Gabriel de Souza Macedo, Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Lisboa Izetti Ribeiro, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Guido Lenz, Fábio Klamt e Patricia Ashton-Prolla.

Serviço de Genética Médica, Laboratório de Medicina Genômica; Centro de Pesquisas; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre –RS Telefone:3359-7661

Comitê de ética em pesquisa – Telefone:33598304

Paciente: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a permitir a participação do paciente menor de idade, pelo qual você é responsável legal, em um estudo, realizado pela equipe do ambulatório de Oncogenética e Laboratório de Medicina Genômica do HCPA e colaboradores. A participação de seu filho (a) neste projeto deve-se ao fato dele(a) ser portador(a) de uma mutação genética em *TP53* (p.R337H ou qualquer outra no mesmo gene). Estas mutações estão associadas a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni. Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente desenvolvem câncer. Existe, porém, a possibilidade de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação R337H, pode ser mais frequente em nosso meio.

A pesquisa tem por objetivo comparar características metabólicas, tais como a capacidade de eliminação de células com algum defeito (mecanismo de apoptose) e os níveis de estresse oxidativo (condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de moléculas danosas para o organismo e sua desintoxicação) de pessoas com e sem uma alteração em uma parte do material genético (gene *TP53*) que causa maior risco de câncer. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você decidir participar, a pesquisa vai envolver a coleta de sangue para que as células sejam mantidas e estudadas no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa relacionada ao gene *TP53*. Será coletada uma pequena amostra de sangue (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode concordar ou não com a realização deste exame e sua decisão, seja qual for, não afetará o seu atendimento na Instituição. Após o término do estudo o material biológico (células em cultura) que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Pode, entretanto, contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido dos pacientes portadores desta alteração genética, melhor entendimento das conseqüências da presença da mutação e desenvolvimento de terapias anticâncer para essa situação específica.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis, no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital.** A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da

liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Responsável legal:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Controles Pediátricos

### Autorização por representação de paciente

Projeto de Pesquisa: Estudo do Estresse Oxidativo e apoptose em amostras de sangue de pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Investigadores Responsáveis: Gabriel de Souza Macedo, Patrícia Koehler-Santos, Patrícia Lisboa Izetti Ribeiro, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Guido Lenz, Fábio Klamt e Patricia Ashton-Prolla.

Serviço de Genética Médica, Laboratório de Medicina Genômica; Centro de Pesquisas; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre –RS Telefone:3359-7661

Paciente: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a permitir a participação do paciente menor de idade, pelo qual você é responsável legal, em um estudo, realizado pela equipe do ambulatório de Oncogenética e Laboratório de Medicina Genômica do HCPA e colaboradores. O convite à participação de seu filho (a) neste projeto deve-se ao fato dele(a) não apresentar história pessoal de câncer e não ser portador de uma mutação genética chamada *TP53-R337H*. Estas mutações estão associadas a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni. Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente desenvolvem câncer. Existe, porém, a possibilidade de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação *R337H*, pode ser mais freqüente em nosso meio.

A pesquisa tem por objetivo comparar características metabólicas, tais como a capacidade de eliminação de células com algum defeito (mecanismo de apoptose) e os níveis de estresse oxidativo (condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de moléculas danosas para o organismo e sua desintoxicação) de pessoas com e sem uma alteração em uma parte do material genético (gene *TP53*) que causa maior risco de câncer. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você decidir participar, a pesquisa vai envolver a coleta de sangue para que as células sejam mantidas e estudadas no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa relacionada ao gene *TP53*. Será coletada uma pequena amostra de sangue (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode concordar ou não com a realização deste exame e sua decisão, seja qual for, não afetará o seu atendimento na Instituição. Após o término do estudo o material biológico (células em cultura) que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico. Pode, entretanto, contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido dos pacientes portadores desta alteração genética, melhor entendimento das conseqüências da presença da mutação e desenvolvimento de terapias anticâncer para essa situação específica.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar os pesquisadores responsáveis, no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital.** A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da



liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Responsável legal:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110099      **Versão do Projeto:** 21/02/2011      **Versão do TCLE:** 08/04/2011

**Pesquisadores:**

CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO  
PATRICIA KOEHLER DOS SANTOS  
PATRICIA LISBOA IZETTI RIBEIRO  
PATRICIA ASHTON PROLLA

**Título:** Estudo do Estresse Oxidativo e apoptose em amostras de sangue de pacientes portadores de mutação germinativa em TP53.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 19 de abril de 2011.

  
Prof.<sup>a</sup> Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

