



ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ARG72PRO DO GENE TP53 COM O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO EM MULHERES DO SUL DO BRASIL

Jóice T. de Bitencorte¹
Daniel Simon²

Resumo

O câncer cervical (CC) é uma das malignidades ginecológicas mais comuns em mulheres no mundo. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CC. Contudo, a infecção persistente por um tipo de HPV oncológico foi estabelecida como necessária, mas não suficiente para induzir o desenvolvimento do CC, sugerindo que outros fatores de risco incluindo a suscetibilidade genética podem estar associados ao desenvolvimento do CC. Nos últimos anos, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *TP53* têm sido associados à progressão para CC, pois modificam a síntese e conformação da proteína p53 (supressora tumoral), especialmente o polimorfismo Arg72Pro. O estudo de caso-controle foi conduzido com mulheres do sul do Brasil, incluindo 96 casos e 224 controles. As amostras foram coletadas a partir de esfregaço da mucosa bucal ou do colo do útero. O DNA foi extraído e posteriormente amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O polimorfismo foi avaliado por clivagem com enzima de restrição *Bst*UI e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. As frequências alélicas não apresentaram diferença significativa entre casos e controles ($p=0,695$). As frequências genotípicas também não apresentaram diferença significativa entre controles e casos ($p=0,913$). Os resultados do presente estudo não mostraram associação entre o SNP rs1042522 e CC em mulheres do sul do Brasil.

Palavras chave: SNP, HPV, câncer cervical.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) é uma das malignidades ginecológicas mais comuns em mulheres e cerca de 528.000 novos casos surgem anualmente. (IARC, 2012). A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CC (WANG, 2012). Esse tipo de câncer afeta principalmente mulheres socialmente desfavorecidas, 83% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. A prevalência da infecção pelo HPV é alta, mas a maioria das infecções é transitória e o vírus é naturalmente eliminado. Desta forma, apenas uma pequena fração das mulheres infectadas desenvolvem câncer cervical (CHEN, 2015). No entanto, a infecção persistente por um tipo de HPV oncológico, foi estabelecida como uma condição necessária, mas não suficiente para induzir o desenvolvimento do CC, o que sugere que outros fatores, como variações genéticas do hospedeiro, podem estar associados à suscetibilidade de desenvolver o CC.

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do genoma humano têm sido associados ao CC (Wang et al., 2010; Habbous et al., 2014). Nos últimos anos SNPs no gene TP53, um gene supressor tumoral que codifica a proteína p53 e está relacionado com diversas

1 Aluna do curso de Ciências Biológicas, ULBRA- Bolsista de IC PIBIC/CNPq- joice_bitencorte@hotmail.com

2 Professor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA Canoas, RS - daniel.simon@ulbra.com

funções celulares incluindo o controle da proliferação celular, vem sendo muito estudados por estarem associados com inúmeros processos carcinogênicos. Especialmente o SNP Arg72Pro rs1042522 que envolve a troca de uma única base, guanina (G) por citosina (C), na segunda posição do códon 72 no éxon 4. Esta troca resulta na substituição do aminoácido arginina (Arg) por uma prolina (Pro) no gene TP53.

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação do SNP Arg72Pro rs1042522 com o desenvolvimento do câncer cervical em uma população de mulheres no sul do Brasil.

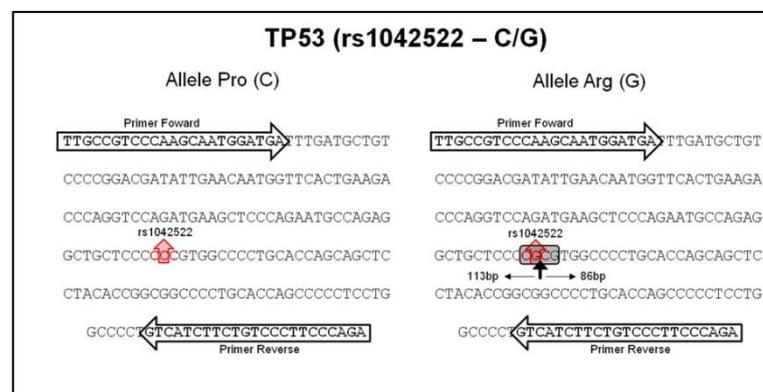
MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido com mulheres do sul do Brasil, sendo incluídos 96 casos de mulheres recrutadas durante o tratamento de CC no Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia entre 2012 e 2014. Este centro de assistência está localizado na cidade de Ijuí e trata mulheres das regiões noroeste e centro do estado do Rio Grande do Sul. O grupo controle foi composto por mulheres de dois estudos transversais anteriores. Destas, 224 mulheres (67 positivas e 157 negativas para a infecção por HPV) com citologia normal foram selecionadas por correspondência da idade com os casos. Pelo menos dois controles para cada caso foram selecionados, com a inclusão de um número significativo de mulheres HPV positivas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Cruz Alta Research (n° 0093.0.417.000-11).

As amostras foram coletadas a partir de esfregaço da mucosa bucal (grupo caso) ou do colo do útero (grupo controle) utilizando esfoliação com cytobrush e armazenadas em uma solução tampão (pH 8,0 EDTA 0,01 M, SDS 0,03 M) a -20 °C até a análise. O DNA foi extraído como descrito previamente (Coser et al. 2013).

Um fragmento do gene *TP53* de 199 pares de bases (pb) foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Fan et al., 2000). O SNP rs1042522 foi avaliado por digestão do fragmento amplificado com enzima de restrição *Bst*UI (figura 1) de acordo com as especificações do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemanha) e sua análise foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata. O alelo Pro não é clivado, enquanto que o alelo Arg é cortado gerando dois fragmentos de DNA de 113 pb e 86 pb.

Figura 1: Fragmento amplificado pra análise do SNP rs1042522 do gene *TP53* e os fragmentos gerados após clivagem com enzima de restrição *Bst*UI.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências alélicas de Arg (G) e Pro (C) foram de 69,2% e 30,8% respectivamente (Tabela 1). O alelo Arg (G) foi o mais frequente, tanto no grupo de casos (70,3%) quanto no grupo controle (68,7%), sem apresentar diferença significativa ($p=0,695$). As frequências genotípicas também não mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p=0,913$). As frequências genotípicas observadas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo dos casos, mas não no grupo controle.

A necessidade de uma infecção persistente por HPV para o desenvolvimento de CC está bem estabelecida. No entanto, fatores genéticos, sociodemográficos, comportamentais e clínicos também estão associados a esses resultados (Tommasino, 2014). O gene *TP53* é um gene supressor tumoral que está relacionado a inúmeros processos carcinogênicos no organismo humano, codifica a proteína p53 que desempenha um importante papel na manutenção da estabilidade genômica, participando de diversas funções celulares, como reparo do DNA, controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Mutações e polimorfismos no *TP53* podem ocasionar a inativação de funções normais da proteína p53, levando a alterações no ciclo celular, perda do controle da apoptose e, conseqüentemente, um descontrole da proliferação celular (Ordested et al, 2007).

O SNP rs1042522 no gene *TP53* é amplamente estudado na literatura internacional, contudo, os resultados encontrados são conflitantes. Piña-Sánchez et al. (2011) sugerem que, provavelmente, infecções persistentes com HPV tipo 16 ou 18 podem ser relacionadas com o genótipo Arg/Arg em pacientes com CC. Porém, Koshiol et al. (2009) descreveram que o alelo Pro foi associado com maior risco de lesão cervical e persistência de HPV em mulheres da Costa Rica.

Na verdade, ao longo da última década, vários outros estudos caso-controle, envolvendo diferentes grupos étnicos mostraram associação do alelo Arg com maior risco de infecção pelo HPV e progressão para CC (Hu et al, 2010; Jian et al, 2010; Chansaenroj et al, 2013; Singhal et al, 2013), enquanto outros não mostraram esta associação (Pegoraro et al, 2002; Inserra et al, 2003; Settheetham-Ishida et al, 2005; Min-min et al, 2006; Govan et al, 2007). No Brasil, os poucos estudos também são contraditórios. Ferreira da Silva et al. (2010) demonstraram que o genótipo Arg/Pro apresenta maior risco para o desenvolvimento de lesões escamosas intraepiteliais graves e CC do que mulheres com o genótipo Pro/Pro. No estudo de Fernandes et al. (2008) não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de homozigotos para Arg sobre os outros genótipos entre mulheres com e sem CC. Também Anschau et al. (2005) e mais recentemente Laprano et al. (2014) encontraram frequências semelhantes desse polimorfismo em mulheres saudáveis e pacientes com CC, independentemente da presença de infecção por HPV. Desta forma, os resultados do presente estudo corroboram com a maioria dos resultados anteriores, demonstrando a ausência de uma associação definitiva deste SNP com CC.

Tabela 1: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Arg72Pro (rs1042522) do gene *TP53* nos grupos caso e controle

	Casos (n= 96)	Controles (n=224)	Amostra Total (n= 320)	P
Alelo				0,695
Arg	135 (70,3)	308 (68,7)	443 (69,2)	
Pro	57 (29,7)	140(31,3)	197 (30,8)	
Genótipo				0,913
Arg/Arg	51 (53,1)	116 (51,8)	167 (52,1)	
Arg/Pro	33 (34,4)	76 (33,9)	109 (34,1)	
Pro/Pro	12 (12,5)	32 (14,3)	44 (13,8)	

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo não mostraram associação entre o SNP rs1042522 e câncer cervical em mulheres do sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ANSCHAU, F. et al. Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais. *Rev Bras Ginecol Obste.*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 607–612, Oct. 2005.
- CHANSAENROJ, J. et al. Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16 (rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) Genes in Thai Cervical Cancer Patients with HPV 16 Infection. *Asian Pac J Cancer Prev.*, Bangkok, v. 14, n.1, p. 341-346, 2013.
- CHEN, D.; GYLLENSTEN, U. Lessons and implications from association studies and post-GWAS analyses of cervical cancer. *Trends in Genet.*, Amsterdam, v. 31, n. 1, p 41-54, Jan. 2015.
- COSER, J. et al. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among. *Genet Mol Res.*, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 4276-4285, Feb. 2013.
- FAN, R. et al. The p53 Codon 72 Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, United States, v. 9, n. 10, p. 1037-1042, Oct. 2000.
- FERREIRA, S. I; TP53 genetic polymorphisms and environmental risk factors associated with cervical carcinogenesis in a cohort of Brazilian women with cervical lesions. *J Toxicol Environ Health A.*; London, v. 73 n. 13-14, p. 888-900, Jun. 2010.
- FERNANDES, T.A. et al. Evaluation of the polymorphisms in the exons 2 to 4 of the TP53 in cervical carcinoma patients from a Brazilian population. *Cell Mol Biol.*, Noisy-le-Grand, v. 54, Suppl:OL1025-31, Jun. 2008.
- GOVAN, V. A. et al. No relationship observed between human p53 codon-72 genotype and HPV-associated cervical cancer in a population group with a low arginine-72 allele frequency. *Int J Immunogenet.*, Oxford, v. 34, n. 3, p. 213-21, Jun. 2007.
- HABBOUS, S. et al. Papillomavirus and host genetic polymorphisms in carcinogenesis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.*, Amsterdam, v.61 n. 2, p. 220-229, Oct. 2014.
- HU, X. et al. TP53, MDM2, NQO1 and susceptibility to Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 755-761, Mar. 2010.
- INSERRA, P. et al. Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS*, London, v. 14, n. 12, p. 800-804, Dec. 2003.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <globocan.iarc.fr>. Acesso em: 09 may 2015.
- JIANG, P. et al. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. *Acta Biochim Biophys Sin.*, Shanghai, v. 42, n. 9, p. 671-676, Sep. 2010.
- LAPRANO, T. D. Association of TP53 codon 72 and intron 316-bp Ins/Del polymorphisms with cervical cancer risk. *Tumour Biol.*, Tokyo, v. 35, n. 8, p. 7435-7440, Aug. 2014.

- MIN-MIN, H. et al. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*, Cambridge, v. 16, n. 6, p. 2004-2008, Nov-Dec. 2006.
- ØRSTED, D. D. et al. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J Exp Med.*, New York, v. 204, n. 6, p. 1295-1301, Jun. 2007.
- PEGORARO, R. J. et al. P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women. *Int J Gynecol Cancer*, Cambridge, v. 12, n. 4, p. 383-388, Jul-Aug. 2002.
- PIÑA-SÁNCHEZ, P. et al. Polymorphism in exon 4 of TP53 gene associated to HPV 16 and 18 in Mexican women with cervical cancer. *Med Oncol.*, Northwood, v. 28, n. 4, p. 1507-1513, Dec. 2011.
- SETTHEETHAM-ISHIDA, W. et al. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand. *Microbiol Immunol.*, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 417-421, May. 2005.
- SINGHAL, P. et al. Association of MDM2 and p53 Polymorphisms with the Advancement of cervical Carcinoma. *DNA Cell Biol.*, New York, v. 32, n. 1, p. 19-27, Jan. 2013.
- WANG, N. et al. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC Cancer*, London, v. 12, p. 589- 595, Dec. 2012.
- WANG, S. S. et al. Common Genetic Variants and Risk for HPV Persistence and Progression to Cervical Cancer. *PLoS One*, San Francisco, v. 5, p. 1-7, Jan. 2010.