



ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ARG72PRO DO GENE TP53 COM O DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA

Jóice T. de Bitencorte¹
Daniel Simon²

Resumo

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV) e constitui um grave problema de saúde pública. O HCV é altamente hepatotrópico, podendo causar infecções agudas ou crônicas. As infecções crônicas podem evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC). O HCC é o câncer primário de fígado mais frequente e um dos cânceres fatais mais prevalentes atualmente. A cirrose hepática juntamente com infecções crônicas pelos vírus das hepatites B e C constituem o principal fator de risco no desenvolvimento de HCC. Outros fatores de risco estão associados ao HCC, incluindo a suscetibilidade genética. Nos últimos anos, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *TP53* têm sido associados à progressão para HCC, pois modificam a síntese e conformação da proteína p53 (supressora tumoral), especialmente o polimorfismo Arg72Pro. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo investigar a associação do polimorfismo Arg72Pro com o desenvolvimento de HCC em pacientes infectados cronicamente com o HCV. O estudo foi conduzido com 78 pacientes com HCC (casos) e 69 indivíduos saudáveis (controles). O DNA foi extraído a partir de sangue e posteriormente amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo foi avaliado por clivagem com enzima de restrição *Bst*UI e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida. As frequências alélicas e genotípicas não apresentaram diferença significativa entre casos e controles. Em conclusão, os resultados do presente estudo não mostraram associação entre o polimorfismo Arg72Pro e HCC.

Palavras-chave: Hepatite C, carcinoma hepatocelular, polimorfismo genético, p53.

INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV) e constitui um grave problema de saúde pública. Afeta aproximadamente 185 milhões de pessoas em todo mundo, ocasionando de 350 mil a 500 mil mortes relacionadas com doenças hepáticas por ano. Além disso, três milhões de novos casos são diagnosticados anualmente (WHO, 2015). No Brasil, de 1999 a 2011, aproximadamente 82 mil casos foram notificados o Sistema de Investigação de Agravos (Sinan), sendo que a maioria dos casos ocorreu nas regiões Sudeste (67%) e Sul (22%) (Ministério da Saúde, 2016).

O HCV é altamente hepatotrópico e pode levar ao desenvolvimento de infecções agudas e crônicas. A hepatite C crônica vem sendo associada ao carcinoma hepatocelular (HCC) em diferentes partes do mundo e é considerada uma das suas principais causas, contudo, essa relação também é bastante variável geograficamente entre os pacientes que desenvolvem o HCC (El-SERAG et al., 2007).

1 Aluna do curso de graduação de Ciências Biológicas, ULBRA , Canoas, RS - Bolsista de IC PROBITI/FAPERGS - 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

O carcinoma hepatocelular é o câncer primário do fígado mais frequente e um dos cânceres fatais mais prevalentes atualmente. Além de estar aumentando em incidência mundial, também é a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo, sendo responsável por 746 mil ou 9% de todas as mortes por câncer (El-Serag et al., 2007; Pogribny et al., 2014). O HCC apresenta maior incidência em homens do que em mulheres. É o quinto tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em homens, sendo que nas mulheres aparece como o nono câncer mais comumente diagnosticado (Bosch et al., 2004; IARC, 2012).

O HCC é uma doença agressiva e complexa e pode estar associada a diversos fatores de risco. A cirrose hepática juntamente com infecções crônicas pelos vírus das hepatites B e C constituem os principais fatores de risco (VENOOK et al., 2010; YANG et al., 2010). Outros fatores de risco envolvem o hábito de fumar, o consumo de álcool, bem como a exposição à aflatoxina B1 (NAUGLER et al., 2008; POGRIBNY et al., 2014). Entretanto, nem todos os pacientes que desenvolvem HCC foram expostos aos fatores mencionados acima, assim como, pacientes que se expõem a algumas destas condições jamais desenvolvem a doença, sugerindo que outros fatores, incluindo suscetibilidade genética, podem estar envolvidos neste processo.

O gene TP53 é um gene supressor tumoral que está relacionado a inúmeros processos carcinogênicos no organismo humano. Localizado no cromossomo 17p13, 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 (HARRIS, 1996).

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 (ORSTED et al., 2007). Estudos sugerem uma associação de polimorfismos deste gene com uma possível suscetibilidade ao câncer (RILEY et al., 2008). Desta forma, frequentemente, mutações no gene TP53 têm sido observadas em pacientes HBV ou HCV positivos que desenvolvem HCC (CHEN et al., 2003; HUSSAI et al., 2007). Um polimorfismo nomeado Arg72Pro (rs1042522) vem sendo intensamente estudado por afetar a função da p53. Arg72Pro é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no TP53 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 de uma arginina (Arg) por uma prolina (Pro), podendo assim, apresentar genótipo heterozigoto (Arg/Pro) ou genótipos homozigotos Arg/Arg e Pro/Pro (DUMONT et al. 2003).

Este estudo tem por objetivo investigar se existe associação dos genótipos do polimorfismo genético Arg72Pro do gene TP53 com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes infectados cronicamente com o HCV.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido com pacientes HCV positivos atendidos no Serviço de Gastroenterologia-Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e indivíduos saudáveis do banco de sangue do HCPA. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando sua participação na pesquisa. Amostra de casos foi composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, tendo como critérios de exclusão a co-infecção HCV-HIV e a co-infecção HCV-HBV. Fatores sócio-demográficos e potenciais fatores de risco para a infecção pelo HCV foram obtidos a partir de entrevistas realizadas com os pacientes. Dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos foram obtidos por revisão dos prontuários médicos.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas por punção venosa em tubos de 4 mL utilizando-se ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico como anticoagulante.

As amostras foram centrifugadas para a separação do plasma e da papa leucocitária em tubos específicos e armazenadas e estocadas a -80°C . O DNA foi extraído pelo método de *salting-out* descrito por Lahiri e Nurnberger. O material genético foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes *primers* descritos por Fan et al., 2000. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 1 U Taq DNA polimerase (Cenbiot Enzimas, Brasil), 1 μL do DNA extraído e 0,5 μM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial à 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 3 minutos. O polimorfismo Arg72Pro do gene TP53 foi determinado através da clivagem do fragmento amplificado com a enzima de restrição *Bst*UI, e os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% apresentando 113 pb e 86 pb para o alelo Arg e 199 pb para o alelo Pro. As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos. As associações entre genótipos do polimorfismo, características clínicas e o desenvolvimento de câncer hepatocelular, assim como os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg serão avaliados pelo teste de qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi conduzido com 78 pacientes HCV positivos com HCC (casos) e 69 indivíduos saudáveis (controles). Dados sociodemográficos dos casos estudados encontram-se na Tabela 1. As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Arg72Pro de *TP53* estão representadas na Tabela 2. O alelo Arg (G) foi o mais frequente tanto no grupo de casos (68,1%) quanto no grupo controle (72,5%), sem apresentar diferença significativa ($p=0,234$). As frequências genotípicas também não mostraram diferenças significativas entre casos e controles ($p=0,502$), e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

O HCC é uma doença complexa e multifatorial, tendo como principais fatores de risco a cirrose hepática particularmente em pacientes infectados cronicamente com HBV e HCV, porém fatores como a suscetibilidade genética também desempenham importante papel em seu desenvolvimento (VENNOK et al., 2012; POGRIBNY et al., 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. Sendo assim, ao longo da última década, vários outros estudos caso-controle, envolvendo diferentes grupos étnicos estão sendo realizados.

Nossos resultados estão de acordo com os achados por Leveri et al., 2004 que não encontraram associação entre o polimorfismo do códon 72 de *TP53* com o desenvolvimento de HCC na população caucasiana estudada. Da mesma forma, o estudo de Xu et al., 2011 de uma maneira global não encontrou associação deste polimorfismo com o risco de HCC em uma população chinesa. Em contrapartida, Sumbul et al., 2012 mostraram que existe uma associação do genótipo homozigoto Pro de *TP53* com aumento significativo do risco de desenvolver HCC em uma população da Turquia. Estas discrepâncias podem estar associadas às diferenças de tamanho amostral, características sociodemográficas e a variação étnica dos estudos realizados.

No Brasil, vários estudos epidemiológicos têm avaliado a possível associação do polimorfismo Arg72Pro de TP53 com diversos tipos de câncer, porém não encontramos na literatura estudos deste polimorfismo em relação ao HCC em populações brasileiras. Contudo, as frequências genóticas encontradas em nosso grupo controle estão em concordância com as observadas em estudos com populações brasileiras previamente publicados (Almeida et al, 2009; Carvalho, 2011).

Tabela 1. Características sociodemográficas e comportamentais da população estudada.

Variáveis	Valor (n=78)
Sexo masculino	44 (56,4)
Idade (anos)	61,9 ± 8,0
Branco (cor de pele)	59 (75,6)
Anos de escolaridade	
0 – 9	47 (60,3)
10 – 12	16 (20,5)
≥ 13	11 (14,1)
Sem informação	4 (5,1)
Consumo de café	
Não	29 (37,2)
Sim	49 (62,8)
Quantidade diária (xícaras)	0,9 ± 1,0
Consumo de álcool	
Não	62 (79,5)
Ex-etilista	16 (20,5)
Consumo de tabaco	
Não	25 (32,1)
Sim	11 (14,1)
Ex-fumante	42 (53,8)
Consumo de drogas ilícitas	
Não	63 (80,8)
Sim	1 (1,3)
Ex-usuário	14 (17,9)

Variáveis expressas como número (porcentagem) ou média ± desvio padrão.

Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas da população estudada.

<i>TP53</i> Codon 72	Total (n=147)	Casos HCC (n=78)	Controles (n=69)	p
<i>Alelo</i>				
Alelo Arg	203 (69,0)	103 (66,0)	100 (72,5)	0,234
Alelo Pro	91 (31,0)	53 (34,0)	38 (27,5)	
<i>Genótipo</i>				
ArgArg	73 (49,6)	36 (46,2)	37 (53,6)	0,502
ArgPro	57 (38,8)	31 (39,7)	26 (37,7)	
ProPro	17 (11,6)	11 (14,1)	6 (8,7)	

Variáveis expressas em números (porcentagem). Teste de qui-quadrado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA LO, et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors, **Genet Mol Res.**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 8-18, Jan. 2009.

BOSCH FX. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends, **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 127, n. 5 (Suppl 1), p. S5-S16, Nov. 2004.

CARVALHO R.M. **Valor Prognóstico do SNP TP53 na Suscetibilidade ao Desenvolvimento e na Sobrevida de pacientes Brasileiros com Meduloblastoma**. 2011. 46 f. Dissertação de Mestrado em Neurociência e Biologia Celular, Universidade federal do Pará, Belém. 2011.

CHEN GG, et al. Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89, **Am J Pathol.**, New York, v. 162, n. 6, p. 1823-1829, Jun. 2003.

DUMONT P, et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet.**, New York, v. 33, n. 3, p. 357-365. Mar. 2003.

EL-SERAG, HB. et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Hispanics in the United States. **Arch Intern Med.**, Chicago v. 167, n. 18, p. 1983-1989, Oct. 2007.

FAN R, et al. The p53 Codon 72 Polymorphism and Lung Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.9, p.1037- 1042, 2000.

HARRIS CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. **Environ Health Perspect.**, United States, v. 104 (Suppl 3), p. 435- 439, May 1996.

HUSSAIN SP. et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 15, p. 2166-2176, Apr. 2007.

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 09/05/2015].

LEVERI M. et al., Codon 72 Polymorphism Of P53 Gene Does Not Affect The Risk Of Cirrhosis And Hepatocarcinoma In Hcv-Infected Patients. **Cancer Lett.**, Limerick, v. 208, n. 1, p. 75-9, May 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE.BRASIL. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais [homepage na internet]. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim_epidemiologico_de_hepatites_virais_201> Acesso em: 9. Mai. 2015/2015.

NAUGLER WE, SCHWARTZ JM. Hepatocellular carcinoma. **Dis Mon.**, Chicago, v. 54, n. 7, p. 432-444, Jul. 2008.

ØRSTED DD, 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, May 2007.

POGRIBNY IP, RUSYN I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma., **Cancer Lett.**, Limerick, v. 342, n. 2, p. 223-230, Jan. 2014.

RILEY T. et al., Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 9, n. 5, p. 402-412, May 2008.

VENOOK AP. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. **Oncologist.**, Dayton, v. 15 (Suppl 4), p. 5-13, September 2010.

SUMBUL A.T. et al., P53 Codon 72 Polymorphism Is associated With Susceptibility To Hepatocellular Carcinoma In The Turkish population: A Case-Control Study. *Mol. Biol. Rep.*, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 1639-47, Feb 2012.

XU Y. et al., A Potentially Functional Polymorphism In The Promoter Region Of Mir-34b/C Is Associated With An Increased Risk for Primary Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Cancer*, New York, v. 128, n. 2, p. 412-7, Jan 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection – 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/>> Acesso em: 09. Mai.2015.

YANG JD, ROBERTS LR. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Infect Dis Clin North Am.*, Philadelphia, v. 24, n. 4, p. 899-919, Dec 2010.