



POLIMORFISMO NO CÓDON 72 rs1042522 DO GENE TP53 ASSOCIADOS CECP

Mariana Batista Soares, Patrícia Luciana Batista Domingos, Ugo Borges Pinheiro, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Andre Luiz Sena Guimarães, Alfredo Maurício Batista de Paula, Lucyana Conceição Farias

Introdução

O câncer de cabeça e pescoço é a quinta neoplasia mais comum no mundo, com uma incidência global de 780 mil novos casos por ano. Estima-se que 7,6 milhões de pessoas vão morrer como consequência de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP). Predisposições genéticas emergiram como um importante fator de risco no desenvolvimento e prognóstico do desenvolvimento de CECP. Considerando este fato, o objetivo do presente estudo é avaliar se o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no códon 72 do gene TP53 (rs1042522) está associada com o aumento da razão de chances de desenvolver carcinoma epidermóide ou a um pior prognóstico em pacientes com CECP.

Material e Métodos

A. Casuística

O presente trabalho trata-se de um estudo retrospectivo, onde os pacientes foram recrutados a partir de serviços de cirurgia de cabeça e pescoço durante o período de 1997 a 2011. O estudo incluiu 62 indivíduos acometidos com CECP e 60 indivíduos do grupo controle escolhidos aleatoriamente. Considerando o tamanho da população local, foi realizado o cálculo das amostras para o grupo controle para estimar o número de pessoas. Ambos os grupos, caso e controle, vieram da mesma região geográfica, sendo que o grupo controle foi pareado por idade.

B. Gradação morfológica e reações de PCR e imuno-histoquímica

Todos os pacientes acometidos com CECP foram devidamente categorizados pelo sistema de estadiamento clínico TNM (Tamanho do tumor, presença de Nodos metastáticos e presença de Metástases à distância, respectivamente).

A extração do DNA foi realizada através do kit Dneasy TissueKit QIAGEN® de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração, O DNA foi amplificado através da técnica de PCR para o gene TP53. Em seguida, os produtos da PCR foram submetidos a tratamento com enzima de restrição BstUI, a fim de analisar os alelos. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida, foram verificados os produtos da PCR e os fragmentos digeridos pela enzima de restrição.

Para a imuno-histoquímica, foram escolhidos 18 casos que apresentavam quantidade de amostra suficiente. Essa técnica foi realizada em cortes histológicos onde foi utilizado o anticorpo primário contra a proteína p53 (anti-p53 monoclonal, clone DO7, obtido da Novocastra Laboratories in Newcastle, UK). Para a imuno-histoquímica foi utilizado o kit streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB Kit, Dako, Glostrup, Denmark). Apenas células neoplásicas que apresentaram marcação nuclear marrom foram consideradas positivas, independente da intensidade da marcação. A expressão positiva para p53 foi definida quando havia mais de 10% das células marcadas, semelhante a um estudo prévio.

C. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS®, versão 18.0 para Windows®. O teste qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher foram usados para analisar a distribuição dos alelos entre os grupos caso e controle. A análise multivariada com regressão logística binária foi realizada para construir um modelo de variáveis a fim de avaliar a razão de chances de desenvolver CECP. O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para analisar sobrevida. O intervalo de confiança maior que 95% foi considerado significativo ($p < 0,05$).



Resultados

Para determinar se o polimorfismo no códon 72 do gene TP53 pode estar associado com CECP na população em estudo, dados do grupo de indivíduos acometidos com CECP foram comparados com o grupo controle (Tabela 1). No presente estudo, observamos que os indivíduos com o genótipo Arg/Arg e fumam apresentam maior probabilidade de desenvolver CECP (Tabela 2). A distribuição da frequência do SNP no códon 72 do gene TP53 pode ser verificada na tabela 3. Pacientes acometidos com CECP com metástase nos linfonodos ou estadiamento clínico TNM avançado, possuem maior risco de morte (Figura 1). Entretanto, o polimorfismo no códon 72 do gene TP53 não influenciou na sobrevida.

Discussão

A proteína p53 pode ser ativada em resposta a várias formas de estresse celular e exerce funções anti-proliferativas. Conseqüentemente, a alteração da expressão ou função da proteína P53 pode influenciar na carcinogênese. Apesar de vários estudos que investigam o papel do gene TP53, a sua classificação como um gene supressor de tumor permanece em debate. Isso diz respeito às modificações moleculares relacionados à patogênese CECP, destacando o papel do SNP.

Uma variedade de informações podem ser encontradas na literatura a respeito do SNP no códon 72 do gene TP53. No presente trabalho foi observado uma associação do CECP com o alelo arginina, demonstrando, assim, uma maior susceptibilidade desse alelo a mutações que podem inativar a proteína p53 e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento do câncer. Entretanto, alguns estudos observaram associação do alelo prolina com envolvidos com a carcinogênese. Esses resultados contraditórios podem ser explicados pelo fato de que além do SNP, alguns fatores epigenéticos e modificações pós-traducionais podem alterar a função ou expressão da proteína. Quanto à imuno-histoquímica, no presente trabalho, não foi observado uma associação entre os genótipo TP53 e a expressão da proteína p53. Além disso, não observamos associação significativa entre o SNP no códon 72 e prognóstico, bem como, sobrevida. Entretanto, parâmetros clássicos como estágio TNM avançado e presença de metástase foi associado com aumento de risco de morte. Dessa forma, mais estudos são necessários para melhor compreender a função do SNP no códon 72 do gene TP53.

Conclusão

Este estudo identificou que indivíduos que apresentam o alelo arginina no SNP no códon 72 do gene TP53 tem maior probabilidade de desenvolver CECP. Esses achados podem contribuir para uma melhor avaliação de risco para o desenvolvimento de CECP.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado por doações do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães e Dr. de Paula são bolsistas do CNPq de pesquisa.

Referências

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. PubMed PMID: 21296855. Epub 2011/02/08. eng.
- [2] Estimate 2013: Brazilian cancer incidence. [Internet]. 2013. Available from: <http://www.inca.gov.br/regpop>.
- [3] De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Correa GT, Fraga CA, Eleuterio NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol.* 2009;45(9):777-82.
- [4] Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):9-17.
- [5] Gritz ER, Carr CR, Rapkin DA, Chang C, Beumer J, Ward PH. A smoking cessation intervention for head and neck cancer patients: trial design, patient accrual, and characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1991;1(1):67-73.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



Unimontes
Universidade Estadual de Marília

APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

- [6]Wang JR, Gramling SJ, Goldstein DP, Cheng D, Chen D, Azad AK, et al. Association of Two BRM Promoter Polymorphisms with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Risk. *Carcinogenesis*. 2013 Jan 15. PubMed PMID: 23322154. Epub 2013/01/17. Eng.
- [7]Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Shete S, Spitz MR, et al. Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jul;11(7):640-5. PubMed PMID: 12101111. Epub 2002/07/09. eng.
- [8]Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JA, Gomez RS, da Costa JE, et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology*. 2012 Dec 13. PubMed PMID: 23332218. Epub 2013/01/22. Eng.
- [9]Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Jun;20(3):223-32. PubMed PMID: 19502097. Epub 2009/06/09. eng.
- [10]Correa GT, Bandeira GA, Cavalcanti BG, de Carvalho Fraga CA, Dos Santos EP, Silva TF, et al. Association of -308 TNF-alpha promoter polymorphism with clinical aggressiveness in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(9):888-94.

Tabela 1 - Frequências genotípicas dos P53 72 Arg / Pro polimorfismos em pacientes com CECP e o grupo controle.

| Gene variant/genotype | Controls n(%) | HNSCC n(%) | p value |
|-----------------------|---------------|------------|---------|
| P53 72 Genotype | | | |
| Arg/Arg | 21 (29.6) | 50 (71.4) | |
| Arg/Pro + Pro/Pro | 39 (76.5) | 12 (23.1) | <0.001 |

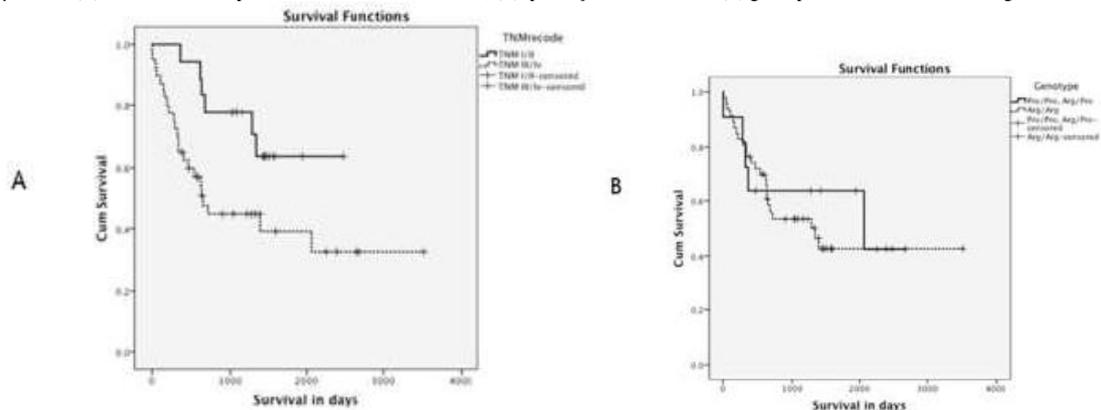
Tabela 2 - Análises multivariadas da odds ratio para CECP avaliadas por regressão logística binária.

| Genotype | p value | OR | 95% C.I. for OR | |
|-----------------|---------|----------|-----------------|--------|
| | | | Lower | Upper |
| Pro/Pro+Arg/Pro | | Referent | | |
| Arg/Arg | < 0.00 | 12.17 | 3.15 | 47.09 |
| Ethylism | | Referent | | |
| Absent | | | | |
| Present | 0.31 | 1.84 | 0.56 | 5.99 |
| Tabagism | | Referent | | |
| Absent | | | | |
| Present | < 0.00 | 3.81 | 58.52 | 127.52 |

Tabela 3 – SNP no códon 72 e sua associação com características clínico-patológicas.

| Variables | Arg/Pro + Pro/Pro N (%) | Arg/Arg N (%) | p value |
|------------------------------|-------------------------|---------------|---------|
| Etilism | | | |
| Never | 6 (50.0) | 19 (38.0) | 0.329 |
| Ever | 6 (50.0) | 31 (62.0) | |
| Family history of any cancer | | | |
| Absent | 8 (66.7) | 28 (56.0) | 0.369 |
| Present | 4 (33.3) | 22 (44.0) | |
| Smoking status | | | |
| Never | 2 (16.7) | 13 (26.0) | 0.397 |
| Ever | 10 (83.3) | 37 (64.0) | |
| TNM Clinical Staging | | | |
| I/II | 3 (25.0) | 16 (32.0) | 0.462 |
| III/IV | 9 (75.0) | 34 (68.0) | |
| Locoregional Metastais | | | |
| Ausent | 6 (50.0) | 29 (58.0) | 0.426 |
| Present | 6 (50.0) | 21 (42.0) | |

Figura 1- (A) sobrevivência de pacientes acometidos com CECP; (B) presença de metástases e (C) genótipo do SNP do códon 72 do gene TP53.





FÓRUM FEPEG

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



Unimontes
Universidade Estadual de Maracá

24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

www.fepeg.unimontes.br

