

## ANÁLISE DO SNP Arg72Pro DO GENE DA p53 E A HERANÇA FAMILIAR DE CÂNCER NA COORTE DE 1982 DE PELOTAS

THUROW, Helena Strelow<sup>1</sup>; HARTWIG, Fernando<sup>1</sup>; LEON, Priscila Marques Moura de<sup>1</sup>; HAACK, Ricardo<sup>2</sup>; HORTA Bernardo Lessa<sup>2</sup>; COLLARES, T<sup>1</sup>

SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

<sup>2</sup>Centro de Pesquisas Epidemiológicas, UFPel  
thurow.hs@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

Descoberta há mais de 30 anos, a proteína p53 continua a fascinar pesquisadores em razão de suas inúmeras funções, sendo chamada de Guardiã do Genoma. Esta proteína, que contém 393 aminoácidos e 53kd é codificada pelo gene supressor de tumor TP53 localizado no cromossomo 17p13.1. A função mais importante da p53 é o seu papel protetor como fator de transcrição. Através da ligação com elementos de resposta específicos no DNA, modula a transcrição de genes que determinam as principais defesas contra o crescimento tumoral, o que inclui controle do ciclo celular, apoptose, manutenção da integridade genética, inibição da angiogênese e senescência celular (Whibley et al. 2009). Recentemente foram descobertas outras funções da p53 na supressão tumoral que são independentes da sua habilidade em transativar a expressão de genes. Estas funções incluem efeitos diretos na sobrevivência de proteínas na mitocôndria, regulação do processamento de microRNAs e o envolvimento direto da p53 nas vias de reparo do DNA (Brown et al. 2009). Uma sinalização oncogênica, sinais de estresse ou dano marcam um aumento na atividade da p53 (De Moura Gallo et al. 2005). Em tumores humanos, a p53 é frequentemente alterada por mutações do gene, o que resulta na expressão de uma proteína mutada que difere do tipo selvagem por uma única mudança de aminoácidos. As mutações no gene TP53 têm sido encontradas em quase todos os tipos de câncer em várias freqüências e diferentes em sua natureza. Aproximadamente 50% de todos os cânceres apresentam mutações na p53 que modificam sua atividade transcricional (Menendez et al. 2009).

Uma das principais mutações estudadas no gene TP53 inclui o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) do códon 72, localizado no exon 4 deste gene. O SNP Arg72Pro resulta na substituição não conservativa de um único nucleotídeo, onde o códon CCC codifica a Prolina (Pro) ou o códon CGC codifica a Arginina (Arg). Tanto o aminoácido Prolina como o Arginina já foram associados com diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão, cervical, mama, gástrico, bexiga, colorretal, entre outros (Li et al. 2009).

Neste estudo, objetivamos avaliar a prevalência do SNP do códon 72 da p53 na coorte de nascidos no ano de 1982 em Pelotas e sua associação com o histórico familiar de câncer. A coorte de 1982 de Pelotas é considerada um dos maiores e mais longos estudos de coorte de nascimentos em países em desenvolvimento. Os indivíduos pertencentes a esta coorte tem sido

acompanhados por inúmeras vezes desde o nascimento, e inúmeras informações sobre o seu desenvolvimento tem sido coletadas (Barros et al. 2008; Victora e Barros 2006).

Uma melhor análise da prevalência das mutações da p53 em estudos epidemiológicos pode auxiliar no monitoramento destas mutações em diferentes populações e na contribuir na prevenção do risco em programas de saúde baseados em estudos genéticos.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

**Origem dos indivíduos:** Indivíduos nascidos em 1982 nas maternidades da cidade de Pelotas, cuja família residia na área urbana da cidade tem sido acompanhados por inúmeras oportunidades ao longo dos anos.

**Obtenção do DNA Genômico:** O DNA foi extraído previamente com a técnica de Miller e colaboradores (Miller et al. 1988) a partir da obtenção de sangue coletado por punção venosa periférica do braço de cada indivíduo.

**Genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53:** A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR-RFLP. O fragmento contendo o polimorfismo do códon 72 foi amplificado utilizando *primers* do exon 4 publicados anteriormente no estudo de Damini e colaboradores (Damini et al. 2006). Esta porção genômica amplificada (199pb) foi clivada com a enzima *Bst*UI, a qual gerou fragmentos para a determinação dos genótipos. Esta metodologia de genotipagem foi previamente padronizada pela técnica de seqüenciamento Sanger, utilizando um sequenciador Megabace 1000 (Amersham Biosciences).

**Análises Estatísticas:** As análises estatísticas foram realizadas com o teste Qui-quadrado, através do programa Stata versão 11.0, considerando as variáveis “Histórico familiar de câncer” (pai ou mãe que tem ou tiveram câncer) e o “Tipo ou local de câncer do pai ou mãe” presentes no banco de dados da coorte de 1982.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

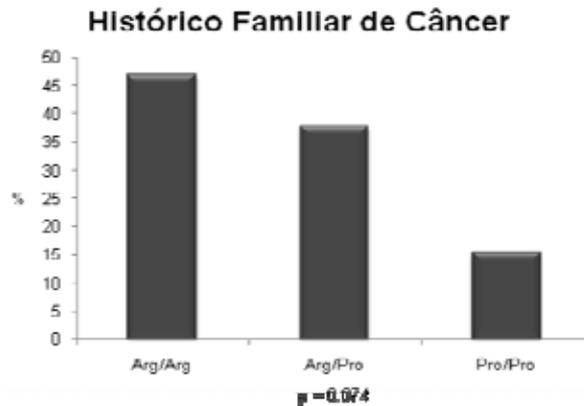
Foram genotipadas para o SNP Arg72Pro um total de 3816 amostras dos indivíduos da coorte de 1982. As freqüências dos genótipos são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Freqüência dos genótipos do SNP Arg72Pro da p53 na coorte de 1982

Arg72Pro	Freqüência	Porcentagem
Arg/Arg (GG)	1.774	46.49
Arg/Pro (GC)	1.604	42.03
Pro/Pro (CC)	438	11.48
Total	3.816	100.00

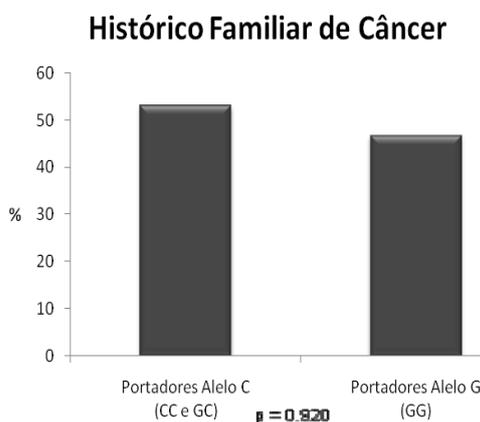
Verificou-se que a freqüência de indivíduos portadores do alelo G que codifica para Arginina foi de 3.378 enquanto que do alelo C que codifica para Prolina foi de 2.042. Tanto na análise dos genótipos quanto dos alelos foi possível constatar uma prevalência do aminoácido Arginina na população da coorte de 1982.

A população em estudo mostrou uma frequência de 7.14% de indivíduos com histórico familiar de câncer. Dentre estes indivíduos, os tipos de câncer mais frequentes foram: câncer de mama, pulmão, estômago, útero, colo de útero, próstata, cérebro, faringe e leucemia. Na análise do histórico familiar de câncer com os genótipos do SNP Arg72Pro não foi possível encontrar associação significativa ( $p = 0.074$ ). Ainda assim, como pode ser observada na Figura 1, também houve predominância dos genótipos Arg/Arg e Arg/Pro (46.80% e 37.75%, respectivamente) com somente 15.45% dos indivíduos com genótipo Pro/Pro.

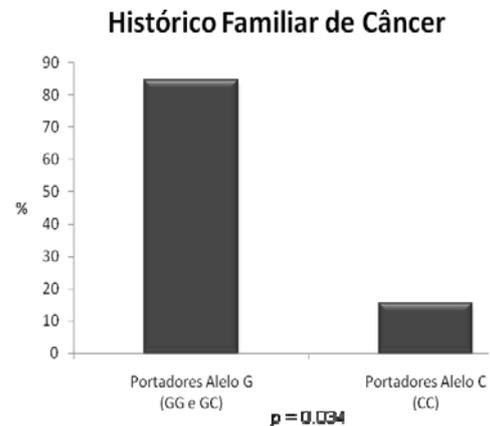


**Figura 1** – Distribuição dos genótipos dos SNP Arg72Pro nos indivíduos da coorte de 1982 com histórico de câncer

Na análise destas variáveis por alelos, não foram encontradas associações significativas entre os indivíduos com o alelo C e o histórico familiar de câncer ( $p = 0.920$ ), como mostra a figura 2. No entanto, a figura 3 apresenta uma associação significativa entre a presença do alelo G e o histórico de câncer na família ( $p = 0.034$ ) com uma nítida prevalência deste alelo.



**Figura 2** – Frequência do alelo C do SNP Arg72Pro nos indivíduos da coorte de 1982 com histórico de câncer.



**Figura 3** – Frequência do alelo G do SNP Arg72Pro nos indivíduos da coorte de 1982 com histórico de câncer.

Na literatura científica observam-se associações entre as frequências do alelo G e o genótipo Arg/Arg com vários tipos de câncer. Nadji e colaboradores (Nadji et al. 2007) afirmam a associação do alelo G com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Outro estudo (Damin et al. 2006) indicou associação significativa do genótipo homocigoto para o aminoácido Arginina e a susceptibilidade ao câncer de mama. O alelo G também foi encontrado em altas

freqüências no estudo de Perez et al com o genótipo Arg/Arg sendo associado como fator de predisposição genética para o câncer colorretal (Perez et al. 2006). Mais recentemente também foi demonstrada a associação entre este mesmo genótipo e o aumento na susceptibilidade a carcinogênese cervical (Jiang et al. 2010). Assim, este estudo ratifica a prevalência do aminoácido Arginina e corrobora com os estudos já citados na associação deste ao câncer.

#### 4 CONCLUSÕES

O presente estudo revelou a prevalência dos genótipos Arg/Arg e Arg/Pro e do alelo G do SNP Arg72Pro do gene da p53 na população da coorte de nascidos em Pelotas no ano de 1982. Dentre os indivíduos com histórico de câncer familiar, também houve predominância dos genótipos Arg/Arg e Arg/Pro com uma associação significativa entre o alelo G que codifica para a Arginina e o histórico de câncer familiar. Estes dados reafirmam estudos científicos que mostram a forte prevalência do aminoácido Arginina associado a diferentes tipos de câncer.

#### 5 REFERÊNCIAS

- BARROS, F.C., VICTORA, C.G., HORTA, B.L., GIGANTE, D.P. [Methodology of the Pelotas birth cohort study from 1982 to 2004-5, Southern Brazil]. **Rev. Saude Publica**, 42 Suppl 2: 7-15, 2008.
- BROWN, C.J., LAIN, S., VERMA, C.S., FERSHT, A.R., LANE, D.P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. **Nat. Rev. Cancer**, 9: 862-873, 2009.
- DAMIN, A.P., FRAZZON, A.P., DAMIN, D.C., ROEHE, A., HERMES, V., ZETTLER, C., ALEXANDRE, C.O. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. **Cancer Detect. Prev.**, 30: 523-529, 2006.
- DE MOURA GALLO, C.V., AZEVEDO E SILVA MENDONCA, DE, M.E., OLIVIER, M., HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. **Mutat. Res.**, 589: 192-207, 2005.
- JIANG, P., LIU, J., ZENG, X., LI, W., TANG, J. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 197: 174-178, 2010.
- LI, Y., QIU, L.X., SHEN, X.K., LV, X.J., QIAN, X.P., SONG, Y. A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. **Lung Cancer**, 66: 15-21, 2009.
- MENENDEZ, D., INGA, A., RESNICK, M.A.: The expanding universe of p53 targets. **Nat. Rev. Cancer**, 9: 724-737, 2009.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, 16: 1215, 1988.
- NADJI, S.A., MAHMOODI, M., ZIAEE, A.A., NAGHSHVAR, F., TORABIZADEH, J., YAHYAPOUR, Y., NATEGH, R., MOKHTARI-AZAD, T. An increased lung cancer risk associated with codon 72 polymorphism in the TP53 gene and human papillomavirus infection in Mazandaran province, Iran. **Lung Cancer**, 56: 145-151, 2007.
- Perez, L.O., Abba, M.C., Dulout, F.N., Golijow, C.D.: Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. **World J. Gastroenterol.**, 12: 1426-1429, 2006.
- VICTORA, C.G., BARROS, F.C. Cohort profile: the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. **Int. J. Epidemiol.**, 35: 237-242, 2006.
- WHIBLEY, C., PHAROAH, P.D., HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat. Rev. Cancer**, 9: 95-107, 2009.