

## ESTUDO ASSOCIATIVO DO SNP Arg72Pro DO GENE p53 E A CARACTERÍSTICA DE COR DA PELE NA COORTE DE 1982

HARTWIG, Fernando Pires<sup>1</sup>; THUROW, Helena Strelow<sup>1</sup>; LEON, Priscila Marques Moura de<sup>1</sup>; HAACK, Ricardo<sup>2</sup>; HORTA Bernardo Lessa<sup>2</sup>; SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>1</sup>

COLLARES, Tiago<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

### 1 INTRODUÇÃO

O TP53 (*Tumor Protein p53*) é um dos genes mais estudados no contexto de oncologia molecular. A proteína codificada por este gene, p53 (assim nomeada por apresentar peso molecular de 53 kDa) é conhecida como “guardiã do genoma” por modular a transcrição de genes que conduzem as defesas contra o crescimento tumoral, o que inclui parada no ciclo celular, apoptose, manutenção da integridade genética, inibição da angiogênese e senescência celular (Whibley et al., 2009). Assim, mutações neste gene vêm sendo estudadas no sentido de encontrar relações destas com doenças como o câncer (Olivier et al., 2009) e, mais recentemente, com parâmetros reprodutivos (Kang et al., 2009).

Estudos recentes vêm apontando uma relação entre a p53 e a pigmentação da pele. Rotas de pigmentação e câncer de pele apresentam-se relacionadas, sendo que genes envolvidos na pigmentação e bronzeado apresentam relação com a resposta a danos no DNA mediada pelo TP53

Uma das mutações mais estudadas no TP53 é o polimorfismo de base única (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) no códon 72. Este SNP (Arg72Pro) é uma variação de guanina para citosina no éxon 4 deste gene, resultando na síntese do aminoácido arginina (Arg) ou prolina (Pro), respectivamente. Apesar disto, pouco se sabe sobre a relação deste SNP com a pigmentação de pele. Assim, este trabalho visou determinar uma relação entre os genótipos decorrentes desta variação genômica com a característica cor da pele.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram analisadas 3816 amostras de DNA de indivíduos pertencentes à Coorte dos nascidos em Pelotas no ano de 1982. Para realizar a genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene TP53 foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Cada amostra foi submetida a uma reação de PCR utilizando-se os *primers Forward* 5' TTGCCGTCCTCAAGCAATGGA-TGA 3' e *Reverse* 5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3'. As condições da PCR: 94°C por 5min, 35 ciclos de 94°C, 57°C e 72°C (1min cada) e 72°C por 5min. O fragmento de 199pb gerado sofreu clivagem enzimática utilizando-se a enzima *BstUI*. O processo de clivagem foi realizado em 60°C durante 3h, podendo gerar três diferentes padrões de bandas eletroforéticas, de acordo com o genótipo: 113 e 81pb relativo ao genótipo Arg/Arg, 199pb (sem clivagem) referente a Pro/Pro e 199, 113 e 81pb

indicando Arg/Pro. Esta metodologia de genotipagem foi previamente padronizada pela técnica de sequenciamento Sanger, utilizando um sequenciador Megabace 1000 (Amershan Biosciences). Os dados genômicos gerados neste estudo foram relacionados com a informação sobre a cor da pele, presente no banco de dados da coorte de 1982. A análise estatística foi realizada com o teste do Qui-quadrado através do programa Stata versão 11.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

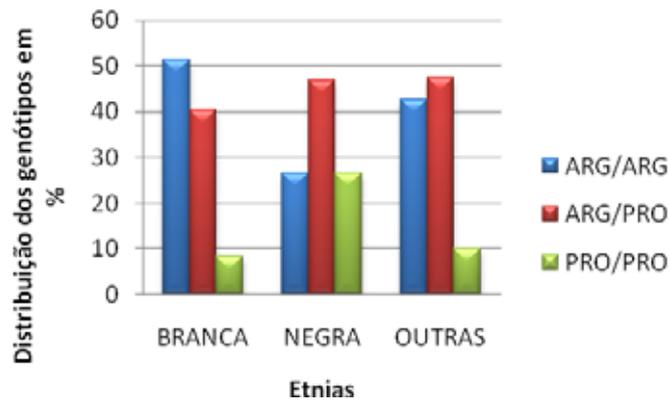
A distribuição dos genótipos e alelos de acordo com a cor da pele estão apresentados na Tabela 1. Das 3816 amostras analisadas, 1,774 apresentaram o genótipo Arg/Arg, 1,604 o genótipo Arg/Pro e 438 o genótipo Pro/Pro. Dentre os indivíduos com cor da pele branca, 51,2% apresentaram o genótipo Arg/Arg, enquanto que apenas 26,6% dos indivíduos com cor da pele preta apresentaram este genótipo. Por outro lado, o genótipo Pro/Pro foi mais comum entre os pretos do que entre os brancos. A distribuição dos genótipos entre os 3 grupos étnicos estão demonstradas na figura 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos genótipos e alelos do SNP Arg72 Pro na Coorte de 1982 em relação à cor da pele.

Cor da Pele	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	Total	*G	*C
<b>Branca</b>	1,462 (51,24)	1,152 (40,38)	239 (8,38)	2,853 (100,00)	2,614 (77,38)	1,391 (68,12)
<b>Preta</b>	164 (26,62)	288 (46,75)	164 (26,62)	616 (100,00)	452 (13,38)	452 (22,14)
<b>**Outras</b>	148 (42,65)	164 (47,26)	35 (10,09)	347 (100,00)	312 (9,24)	199 (9,75)
<b>Total</b>	1,774	1,604	438	3,816	3,378 (100,00)	2,042 (100,00)
<b>P</b>		p=0.000			p=0.000	p=0.000

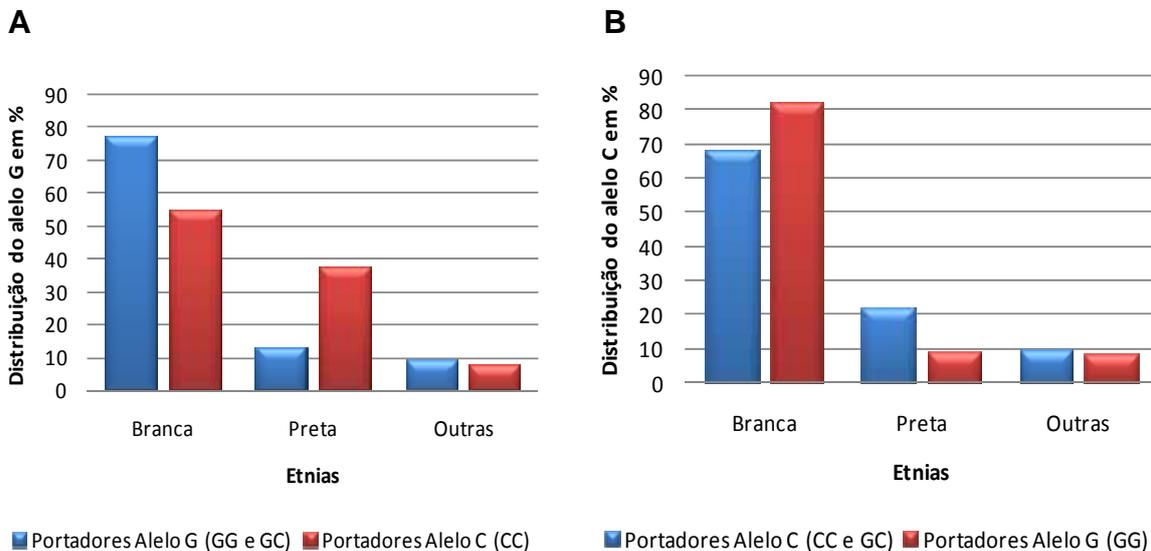
\*Distribuição dos diferentes alelos decorrentes do SNP: G que codifica Arginina refere-se aos genótipos GG e GC; C que codifica para Prolina refere-se aos genótipos GC e CC.

\*\*Outras etnias: mulata, amarela, indígena e moreno.



**Figura 1.** Representação gráfica das frequências dos genótipos em relação às etnias.

A distribuição alélica foi realizada, totalizando 3,378 portadores com o alelo G, e 2,042 portadores com o alelo C. A figura 2 mostra a distribuição do alelo G na população, onde observa-se 77,38% (2,614) dos indivíduos de etnia branca, 13,38% (452) de etnia preta e 9,24% (312) pertencentes a outras. Quanto ao alelo C, mostrado na figura 3, a distribuição foi 68,12% (1,391), 22,14% (452) e 9,75% (199) nas etnias branca, preta e outras respectivamente. Assim, fica demonstrada uma relação entre o alelo C (tanto em nível genotípico quanto em nível alélico) e a etnia preta.



**Figura 2.** Representação gráfica da distribuição das etnias em relação aos alelos G (A) e C (B).

Nossos resultados suportam resultados prévios. Apesar de não haver nenhum estudo relacionando diretamente o SNP Arg72Pro, estudos mostram que a p53 inicia a melanogênese via ativação o gene POMC (*Pro-opiomelanocortin*) nos queratinócitos em resposta a estímulos como radiação UV. O produto do gene POMC é clivado gerando  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone), que ativa o receptor MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) nos melanócitos (Cui et al., 2007; Brenner e Berking, 2010). Assim, é possível inferir que a p53 pode participar da determinação da etnia. Trabalhos prévios encontraram uma relação de proteção do alelo Pro72, com este conferindo um maior aumento da

melanogênese em resposta à UV (Oren e Bartek, 2007; Miller e Tsao, 2010). Mesmo conferindo esta proteção a queimaduras, o alelo Pro72 também é apontando como indicador de risco a câncer de pele (Han et al., 2006). Visto que ambos os estudos consideraram a relação entre o SNP Arg72Pro do TP53 e diferentes alelos do gene MC1R, estes genes aparentemente possuem uma relação de epistasia (Miller e Tsao, 2010).

#### 4 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou uma relação entre o alelo Pro72 e a característica cor da pele na Coorte de 1982 de Pelotas. Considerando-se que estudos mostraram uma relação epistática entre o TP53 e o MC1R, uma correlação biológica entre o SNP Arg72Pro e a cor da pele ainda necessita de mais estudos específicos.

#### 5 REFERÊNCIAS

BRENNER, M., BERKING, C. Principles of skin pigmentation. *Biochemistry and regulation of melanogenesis*. **Hautarzt**, v. 61, n. 7, p. 554-60, 2010.

Cui, R., Widlund, H.R, FEIGE, E., LIN, J.Y., WILENSKY, D.L., IGRAS, V. E., D'ORAZIO, J., FUNG, C. Y., SCHANBACHER, C.F., GRANTER, S.R., FISHER, D.E. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell**, v. 128, p. 853-864, 2007.

HAN, J., COX, D.G., COLDITZ, G.A. et al. The p53 codon 72 polymorphism, sunburns, and risk of skin cancer in US Caucasian women. **Mol Carcinog**, v. 45, p. 694–700, 2006.

KANG, H.J., FENG, Z., SUN, Y., ATWAL, G., MURPHY, M.E., REBBECK, T.R., ROSENWAKS, Z., LEVINE, A.J., HU, W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. **PNAS**, v. 106, p. 9761–9766, 2009.

MILLER, A.J., TSAO, H. New insights into pigmentary pathways and skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 22–28, 2009.

NAN, H., QURESHI, A.A., HUNTER, D.J., HAN, J. Interaction between p53 codon 72 polymorphism and melanocortin 1 receptor variants on suntan response and cutaneous melanoma risk. **Br J Dermatology**, v. 159, p. 314-321, 2009.

OLIVIER, M., PETITJEAN, A., MARCEL, V., PETRE, A., MOUNAWAR, M., PLYMOTH, A., de FROMENTEL, C. C., & HAINAUT, P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. **Cancer Gene Ther**, v. 16, p. 1-12, 2009.

OREN, M., BARTEK, J. The sunny side of TP53. **Cell**, v. 128, p. 826-828, 2007.

WHIBLEY, C., PHAROAH, P. D., & HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 95-107, 2009.