

## INFLUÊNCIA DE SNPs NOS GENES *TP53* E *MDM2* NA SUSCEPTIBILIDADE AO SARCOMA DE EWING

HARTWIG, Fernando P.<sup>1</sup>; THUROW, Helena S.<sup>1,2</sup>; ALHO, Clarice S.<sup>3</sup>; SEIXAS, Fabiana K.<sup>1,2</sup>; COLLARES, Tiago<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil; <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPEL, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup> Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil. Endereço eletrônico para correspondência: [fernandophartwig@gmail.com](mailto:fernandophartwig@gmail.com).

### 1 INTRODUÇÃO

O Sarcoma de Ewing faz parte da Família de Sarcomas de Ewing. Estes tumores ósseos e de tecidos moles acometem principalmente crianças e adultos jovens, nos quais são o segundo tumor mais comum deste tipo (Balamuth e Womer 2010).

A proteína p53, codificada pela gene *TP53*, atua principalmente como fator de transcrição de diversos genes relevantes em processos que controlam o crescimento tumoral. O gene *TP53* encontra-se frequentemente mutado em tumores (Whibley et al 2009). Uma das variações genéticas mais estudadas do *TP53* é o polimorfismo de base única (SNP) no códon 72, resultando nas variantes Arginina (CGC) e Prolina (CCC) distribuídas na população (R72P). Este SNP vem sendo estudado e associado à suscetibilidade ao câncer (Whibley et al 2009).

Um dos principais reguladores da p53 é a proteína MDM2, cujo principal papel é ligar-se a p53, formando um complexo que leva a degradação da p53 via ubiquitina-proteossoma em contexto celular fisiológico. Em situações de stress, a p53 é fosforilada, impedindo a ligação da proteína MDM2 e a formação do complexo que degrada a p53, a qual é capaz, então, de atuar como fator de transcrição. O gene MDM2 contém duas regiões promotoras: uma regula a transcrição do MDM2, enquanto que a segunda (localizada no primeiro intron deste gene) aumenta a expressão de MDM2 em resposta à p53, de maneira a regular os níveis desta proteína em feedback-negativo (Meek 2009).

Na segunda região promotora há um SNP no nucleotídeo -309, o qual se caracteriza como uma mudança de T para G (Bond et al 2005) (T309G). Este SNP foi recentemente associado com suscetibilidade à osteossarcoma. Além disso, estudos vêm associando este SNP como um importante marcador de risco para câncer sendo também relacionado ao SNP R72P. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância destes SNPs em pacientes com Sarcoma de Ewing.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 24 pacientes com Sarcoma de Ewing do estado do Rio Grande do Sul e seus familiares (n = 57). O grupo controle foi composto de 90 indivíduos saudáveis. Todas as amostras de DNA foram previamente extraídas. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de cada instituição. Os pacientes com Sarcoma de Ewing foram diagnosticados pelo Instituto de Câncer Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os SNPs R72R e T309G foram genotipados pela metodologia de PCR-RFLP utilizando GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega, USA) e primers descritos previamente por Lin et al (2008) e Sotamaa et al (2005) respectivamente, em um volume final de 12  $\mu$ L para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Em relação ao SNP R72R, o produto de 199 pb da reação de PCR foi incubado com a enzima de restrição *Bst*UI (New England Biolabs, MA) por 3h a 60 °C, e a genotipagem foi realizada em gel de agarose 2,0% marcado com GelRed<sup>™</sup> (Biotium Inc., CA). A genotipagem baseou-se nos tamanhos dos fragmentos relativos aos diferentes genótipos: Pro/Pro não sofre clivagem (mantendo-se o fragmento de 199 bp); Arg/Arg sofre clivagem, gerando fragmentos de 113 e 86 bp; Arg/Pro resulta nos três possíveis fragmentos.

Em relação ao SNP T309G, o fragmento de 157 pb gerado por PCR foi incubado com a enzima de restrição *Msp*A1I (New England Biolabs, MA) durante 8 h a 37 °C e analisado por gel de agarose (2,0%) marcado com GelRed<sup>™</sup>. Os padrões de bandas eletroforéticas foram: T/T não sofre clivagem; G/G sofre clivagem, gerando fragmentos de 109 e 48 pb; T/G resulta nos três possíveis genótipos. As metodologias de genotipagem foram confirmadas por sequenciamento (MegaBACE 1000).

O teste de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre os genótipos e alelos entre os casos e controles. O teste do chi-quadrado foi utilizado para determinar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Análises descritivas também foram analisadas entre os familiares dos casos. Regressão logística binária foi utilizada para avaliar o risco relativo (RR) e os intervalos de confiança de 95%, para os quais os genótipos Arg/Arg e T/T foram determinados como referências. As análises foram realizadas utilizando o software SPSS 16.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As distribuições genotípicas entre os casos e controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quanto ao SNP R72P, as frequências genotípicas entre casos e controles foram respectivamente Arg/Arg 27,5% e 72,5%, Arg/Pro 15,1% e 84,9%, Pro/Pro 20,0% e 80,0%. As frequências alélicas foram 0,75 para Arginina e 0,25 para Prolina (nos casos), enquanto que nos controles as frequências foram 0,66 para Arginina e 0,34 para Prolina. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

O risco relativo dos genótipos Arg/Pro e Pro/Pro, comparados ao genótipo Arg/Arg, foram 0,470 (0,178 – 1,241) e 0,661 (0,125 – 3,500), respectivamente. Nos familiares dos pacientes com Sarcoma de Ewing, o genótipo Arg/Arg mostrou a frequência de 66,7% enquanto os genótipos Arg/Pro e Pro/Pro apresentaram 26,3% e 7,0%, respectivamente. Conseqüentemente, o alelo Arginina apresentou uma frequência de 0,80 contra apenas 0,20 do alelo Prolina.

Nas análises do SNP T309G, as frequências dos genótipos entre os pacientes com Sarcoma de Ewing e o grupo controle foram, respectivamente: TT 13,3% e 86,7%, TG 28,2% e 71,8%, GG 33,3% e 66,7%. O valor de *p* para esta análise não foi significativo (*p* = 0.085). As frequências alélicas nos casos foram de 0,56 para o alelo T e 0,44 para G, enquanto que nos controles, as frequências foram 0,73 para T e 0,27 para G. Uma diferença significativa foi observada para o alelo G entre os grupos onde os casos apresentaram uma maior frequência deste alelo do que os controles (*p* = 0.040). O risco relativo dos genótipos TG e GG em comparação com TT foram 2,554 (0,921 - 7.082) e 3,250 (0,880 - 12,001),

respectivamente. Ao considerar este SNP nos familiares dos pacientes com Sarcoma de Ewing, as frequências dos genótipos TT, TG e GG foram 28,1, 61,4 e 10,5, respectivamente. A frequência do alelo T foi 0,59 enquanto que a do alelo G foi 0,41.

Nossos resultados sugerem que o alelo G do SNP T309G apresenta relevância no Sarcoma de Ewing. Este SNP foi previamente relacionado à osteossarcoma (tumor ósseo mais comum em crianças), onde a frequência do genótipo GG foi maior nos casos em comparação aos controles e o genótipo Pro/Pro do SNP R72P foi relacionado a aumento do risco de morte (Toffoli et al 2009).

O SNP T309G foi associado a vários tumores. Diversos estudos e metanálises indicam associação do genótipo GG a câncer endometrial, leucemia mielóide aguda e hepatocarcinoma (Li et al 2011, Phillips et al 2010, Liu et al 2011). Uma recente metanálise corrobora com a importância deste SNP na suscetibilidade ao câncer, sendo os genótipos GG e TG associados a aumento do risco de câncer. Os autores ainda sugerem uma relação entre os genótipos GG do SNP T309G e Pro/Pro do SNP R72P como fatores de risco para câncer. Além disso, foi indicada uma variação nas frequências dos genótipos do SNP T309G entre diferentes populações (Wan et al 2011), a qual vem sendo discutida por outros autores (Sucheston et al 2011). Considerando-se a importância deste SNP em diversos tipos de câncer e as variações na distribuição de suas frequências em diferentes populações, a ampliação dos estudos deste SNP em diferentes tipos de câncer populações se mostra importante a fim de auxiliar no esclarecimento do papel deste SNP.

## 6 REFERÊNCIAS

- BALAMUTH, N.J., WOMER, R.B., 2010. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* 11, 184-192.
- BOND, G.L., HU, W., LEVINE, A., 2005. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res.* 65, 5481-5484.
- LI, Y., ZHAO, H., SUN, L., HUANG, L., YANG, Q., KONG, B., 2011. MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer susceptibility: a meta-analysis. *Hum. Cell* 24, 57-64.
- LIN, Y.C., HUANG, H.I., WANG, L.H., TSAI, C.C., LUNG, O., DAI, C.Y., YU, M.L., HO, C.K., CHEN, C.H., 2008. Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol.* 44, 798-804.
- LIU, G.Y., JIANG, D.K., SHEN, S.Q., YU, L., 2011. MDM2 SNP309T>G polymorphism with hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Arch. Med. Res.* 42, 149-155.
- MEEK, D.W., 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* 9, 714-723.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- PHILLIPS, C.L., GERBING, R., ALONZO, T., PERENTESIS, J.P., HARLEY, I.T., MESHINCHI, S., BHATLA, D., RADLOFF, G., DAVIES, S.M., 2010. MDM2 polymorphism increases susceptibility to childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* 55, 248-253.
- SOTAMAA, K., LIYANARACHCHI, S., MECKLIN, J.P., JARVINEN, H., AALTONEN, L.A., PELTOMAKI, P., DE LA CHAPELLE, A., 2005. p53 codon 72 and

MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome. *Clin. Cancer Res.* 11, 6840-6844.

SUCHESTON,L., WITONSKY,D.B., HASTINGS,D., YILDIZ,O., CLARK,V.J., DI,R.A., ONEL,K., 2011. Natural Selection and Functional Genetic Variation in the p53 Pathway. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1502-1508.

TOFFOLI,G., BIASON,P., RUSSO,A., DE,M.E., CECCHIN,E., HATTINGER,C.M., PASELLO,M., ALBERGHINI,M., FERRARI,C., SCOTLANDI,K., PICCI,P., SERRA,M., 2009. Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival. *Clin. Cancer Res.* 15, 3550-3556.

WAN,Y., WU,W., YIN,Z., GUAN,P., ZHOU,B., 2011. MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis. *BMC. Cancer* 11, 208.

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