

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): SABRINA FERREIRA DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, CARLOS ÍCARO DE JESUS SILVA, PABLO VINICYUS FERREIRA CHAGAS

Associação entre Alterações no códon 72 SNP rs 1042522 do gene TP53 com o Carcinoma De Células Escamosas de Cabeça e Pesçoço

Introdução

No mundo, há cerca de 12,7 milhões de casos de câncer e estimasse que em 2008 ocorreram 7,6 milhões de mortes relacionadas ao câncer, sendo que 56% dos casos e 64% das mortes ocorreram em países em desenvolvimento econômico (JEMAL *et al.*, 2014). O carcinoma de células escamosas de cabeça e pesçoço (em inglês HNSCC) no Brasil é o sexto mais prevalente tipo de câncer, e os pacientes apresentam um prognostico muitas vezes ruim (FACINA, 2014). Estimasse que em 2014 ocorreram 15290 novas casos de HNSCC em cavidade oral no país, com aproximadamente 10% desses casos ocorrendo no estado de Minas Gerais (FACINA, 2014).

A etiologia do HNSCC está associada a agentes físicos e químicos, geralmente a exposição aos agentes carcinogênicos ocorre devido ao tabagismo e etilismo (DOBROSSY, 2005). Entretanto fatores intrínsecos ao indivíduo também devem ser considerados como importantes fatores de regulação no desenvolvimento e prognostico do HNSCC (WANG *et al.*, 2013). O gene TP 53 está envolvido no controle do ciclo celular e consequentemente está associado a alguns tipos de tumores (SOUSSI, 2010). Estudos tem demonstrado a importância reguladora do códon 72 SNP, localizada no éxon do gene da TP53 (XU *et al.*, 2012) e que alterações em sua função são contraditórias.

Baseado nesses dados, o presente estudo teve como objetivo analisar se o códon 72 SNP do gene TP53 está associado com o aumento das taxas de incidência do HNSCC e seu prognostico.

Material e métodos

A análise do presente estudo foi baseada em um estudo retrospectivo, onde os pacientes que procuraram o serviço de cirurgia de cabeça e pesçoço nas bases de dados entre 1997 e 2011 foram chamados a participarem. O grupo de estudo incluiu 62 pacientes com HNSCC, os critérios de inclusão foram simplesmente material suficiente para extração de DNA. Casos em que foram realizadas a cirurgia ressectiva da lesão e radioterapia pós-operatória. O tratamento radioterápico dos pacientes consistiu na técnica padrão de duas dimensões. Foram excluídos pacientes submetidos a tratamento pré-operatório ou com diagnóstico de carcinoma in situ ou de múltiplos carcinomas de cabeça e pesçoço, bem como aqueles com outros tipos histológicos de câncer. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o parecer CAAE 04337412.8.0000.5146.

Foi realizado a análise dos dados clínicos dos pacientes obtidos a partir dos prontuários médicos. Foram também realizadas a genotipagem e isolamento do DNA para realização do PCR (*Reação em Cadeia Polimerase*) e imunohistoquímica dos tecidos para o gene TP53. As diferenças entre os grupos caso e controle foram determinadas por meio de testes de qui-quadrado. A análise multivariada foi realizada para avaliar a taxa de incidência de HNSCC. O método *Fussy C Means Clustering* (FCM) foi agrupar pacientes de HNSCC para análise de sobrevida. O tempo de sobrevivência foi calculado utilizando o estimador de Kaplan-Meier e comparando-o com o teste log rank. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

Resultados e discussão

A frequência genotípica da P53 para os alelos da arginina (*Arg*) e prolina (*Pro*) do grupo caso HNSCC e controle estão demonstrados na Tabela 1. A relação entre o rs1042522 e a associação com os achados clínico patológicos nos pacientes com HNSCC estão dispostos na Tabela 2. Não foram observadas associações entre o códon do gene TP53 e os dados dos achados clinicopatológicos. Associações para o genótipo *Arg/Arg* com etilismo, histórico familiar de câncer, tabagismos e estadiamento clínico pelo TNM e metástases loco regionais não foram observadas. A não associação também foi observada entre a imunohistoquímica da P53 e as variações do códon da TP53, sendo 50% para os genótipos *Arg/Pro* ou *Pro/Pro* e 75% para *Arg/Arg* foram positivos para a coloração para P53 ($p=0,049$, dados não mostrados).

Em associação simples entre os genótipos, etilismo e tabagismos, observou-se que 50% dos pacientes com HNSCC não puderam ser agrupados como grupo caso, no grupo controle somente 33,3% puderam ser agrupados no grupo controle, como demonstrado na distribuição gráfica de acordo com o agrupamento FCM (Figura 1). A sobrevida inicial dos pacientes com HNSCC foi de 1827,70 dias após o diagnóstico inicial, os pacientes com HNSCC que apresentaram

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

pertinência para o grupo de casos apresentaram uma média de sobrevida de 1226,18 dias. Assim independente do agrupamento pelo FCM, o *códon 72 SNP* do gene *TP53* não apresentou impacto sobre a taxa de sobrevida dos pacientes (Figura 2).

A proteína P53 está relacionado com o ciclo celular, assim quando a uma desregulação da expressão desta proteína ou do seu funcionamento isso implica em inúmeros processos neoplásicos, como o HNSCC. Alguns estudos vêm investigando a regulação do gene *TP53* (SOUSSEI, 2010).

Observou-se que o alelo de arginina estava associado ao HNSCC, tais achados vão de encontro com a literatura, que demonstraram maior susceptibilidade do alelo arginina a sofre mutações que poderiam vir a inativar a proteína P53 e, consequentemente, levar ao desenvolvimento do câncer. Este estudo foi o primeiro a agrupar os pacientes com HNSCC utilizando o agrupamento *Fussy C Means* para confirmação da ausência de associação entre *rs1042522* e a sobrevida. Essas contradições nos resultados podem ser atribuídas ao fato de que não só o *SNP*, mas também a epigenética (FARIAS *et al.*, 2010) ou a modificação pós-tradução (JIANG, CHIU & HSU, 2011) podem alterar a função ou expressão da proteína.

O efeito de *rs1042522* na expressão da proteína P53 parece ser complexo (WANG *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012) e pode vir a explicar a ausência de uma associação entre o *rs1042522* e a sobrevida dos pacientes com HNSCC como observado no presente estudo. Não foi observada associação de *rs1042522* e prognóstico. Entretanto, os achados deste estudo são semelhantes aos encontrados por Brant *et al.*, (2007), no qual não se observou associação entre o *rs1042522* e sobrevida (BRANT *et al.*, 2007).

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Solucionar o quebra-cabeças que envolve o gene TP 53 é um desafio e o presente estudo pode contribuir para isso, pois o presente estudo demonstrou que indivíduos portadores do alelo de arginina no *rs1042522* apresentam uma elevação na taxa de incidência do HNSCC. Assim, compreender os fatores que cercam as alterações no gene TP 53 e o *rs1042522* podem contribuir como mecanismos de avaliação do risco para o desenvolvimento do HNSCC.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por bolsas 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, Dr. Colleta, Dr. Santos e Dr. de Paula são bolsistas do CNPq de pesquisa. Agradecemos também ao programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica da Fapemig que fomentou os trabalhos do acadêmico neste projeto e em outras linhas de pesquisa.

Referências bibliográficas

- BRANT, O.; HOFFMANN, M.; KANAPPILLY, A.; GOROGH, T.; GOTTSCHLICH, S. P53 codon 72 polymorphism in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Anticancer. Res.* v.27, n.5^a, p.3301-3305, 2007.
- DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 24:9–17, 2005.
- FACINA, T. Estimativa 2014–Incidência de Câncer no Brasil. *Rev. Bras. Cancerol.* v. 60, p. 63, 2014.
- FARIAS, L.C.; FRAGA, C.A.; DE OLIVEIRA, M.V.; SILVA, T.F.; MARQUES-SILVA, L.; MOREIRA, P.R. *et al.* Effect of age on the association between p16cdkn2a methylation and dnm3b polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol.* 2010.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLA, Y.J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61:69–90, 2011.
- JIANG, M.; CHIU, S.Y.; HSU, W. Sumo-specific protease 2 in mdm2- mediated regulation of p53. *Cell Death Differ.* v.18, n.6, p.1005-1015, 2011.
- SOUSSEI, T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. *EMBO Rep.* 2010.
- WANG, J.R.; GRAMLING, S.J.; GOLDSTEIN, D.P.; CHENG, D.; CHEN, D.; AZAD, A.K. *et al.* Association of two brm promoter polymorphisms with head and neck squamous cell carcinoma risk. *Carcinogenesis.* 34, p. 1012–7, 2013.
- WANG, Z.; STURGIS, E.M.; GUO, W.; SONG, X.; ZHANG, F.; XU, L. *et al.* Association of combined p73 and p53 genetic variants with tumor hpv16-positive oropharyngeal cancer. *PLoS One.* v. 7, n. 4, 2012.
- XU, T.; XU, Z.C.; ZOU, Q.; YU, B.; HUANG, X.E. P53 arg72pro polymorphism and bladder cancer risk— meta-analysis evidence for a link in asians but not caucasians. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012.



Tabela 1. Frequências genótípicas dos polimorfismos *P53* 72 *Arg/Pro* em HNSCC e do grupo controle.

Gene Variant/genotype	Controls n (%)	HNSCC n (%)	<i>p</i> value
Without Fuzzy C-Means Clustering			
<i>TP53</i> 72 Genotype			
<i>Arg/Arg</i>	21 (29,6)	50 (71,4)	
<i>Arg/Pro</i> + <i>Pro/Pro</i>	39 (76,5)	12 (23,1)	<0,001
Without Fuzzy C-Means Clustering			
<i>TP53</i> 72 Genotype			
<i>Arg/Arg</i>	7 (21,2)	26 (78,8)	
<i>Arg/Pro</i> + <i>Pro/Pro</i>	13 (72,2)	5 (27,8)	<0,001

All values were calculated using χ^2 test. In bold significant differences

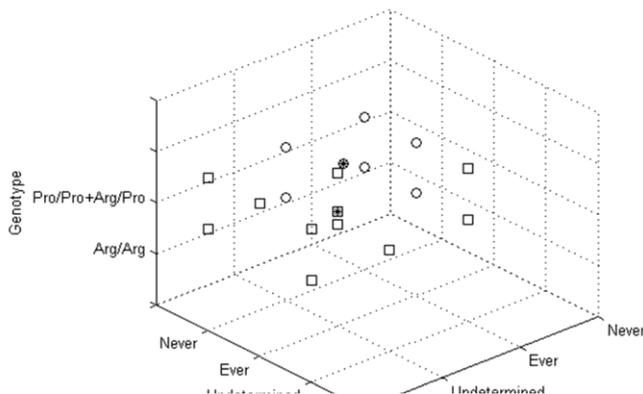


Figura 1. Distribuições gráficas de casos e grupos de controle de acordo com o *Fuzzy C Means Clustering*. Distribuição das amostras de acordo com o genótipo, tabagismo e etilismo. Círculos e quadrados não preenchidos indicam indivíduos dos grupos controle e HNSCC, onde \circ indicam indivíduos controle e \square indicam indivíduos com HNSCC. Os círculos e quadrados

Tabela 2. Genótipo *TP53* códon 72 e associações com suas características clinicopatológicas em pacientes com HNSCC.

Variables value	<i>Arg/Pro</i> + <i>Pro/Pro</i> n(%)	<i>Arg/Arg</i> n (%)	<i>p</i>
Etilism			
<i>Never</i>	6 (50,0)	19 (38,0)	0,329
<i>Ever</i>	6 (50,0)	31 (62,0)	
Family history of any cancer			
<i>Absent</i>	8 (66,7)	28 (56,0)	0,369
<i>Present</i>	4 (33,3)	22 (44,0)	
Smoking status			
<i>Never</i>	2 (16,7)	13 (26,0)	0,397
<i>Ever</i>	10 (83,3)	37 (64,0)	
TNM clinical staging			
<i>I/II</i>	3 (25,0)	16 (32,0)	0,462
<i>III/IV</i>	9 (75,0)	34 (68,0)	
Locoregional metastasi			
<i>Absent</i>	6 (50,0)	29 (58,0)	0,426
<i>Present</i>	6 (50,0)	21 (42,0)	

In bold, significant *p* value <0,05

*Only samples with suficiente tissue were included. Analyzed by χ^2 test

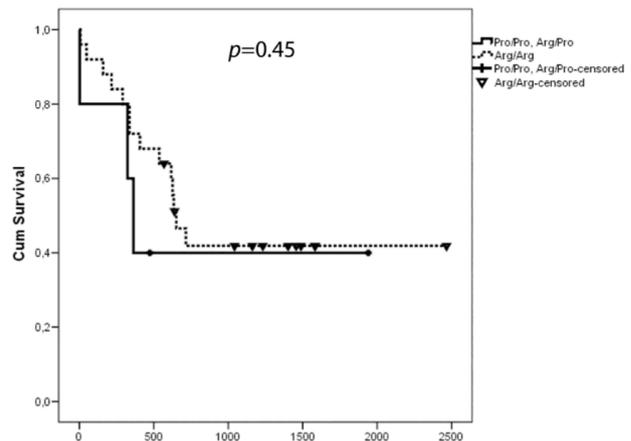


Figura 2. Sobrevida dos pacientes com HNSCC de acordo com genótipos. Os resultados do estimador de Kaplan-Meier foram comparados com o teste *log rank*. A. sem *Fuzzy C Means Clustering* (*p* = 0,07) e B. com *Fuzzy C Means Clustering* (*p* = 0,49).