

FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO CÓDON 72 DO GENE DA p53 EM LESÕES BUCAIS PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS: ESTUDO PILOTO

**NEDEL, Fernanda; THUROW, Helena Strelow; YURGEL, Virgínia;
TARQUINIO, Sandra; COLLARES, Tiago;**

SEIXAS, Fabiana Kömmling

*Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas
fernanda.nedel@gmail.com*

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença genética, embora fatores ambientais e epigenéticos possuam um importante papel em muitos estágios da tumorigênese (Michor et al., 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de câncer, pode aumentar em 50% nos próximos 20 anos, passando de 10 milhões de pessoas acometidas em 2000, para 15 milhões em 2020. Com base no Relatório Mundial sobre o Câncer, recentemente divulgado, a OMS solicitou que governos, autoridades e público em geral empreendam ações urgentes para evitar a ampliação do número de vítimas dessa enfermidade.

Dentre as neoplasias, o câncer oral encontra-se entre os dez mais freqüentes na população mundial, embora essa freqüência varie em diferentes regiões geográficas, o câncer oral representa entre 3 a 5% dos tumores malignos (Acha-Sagredo et al., 2009). De acordo com o INCA – Ministério da Saúde (2008), o câncer de boca figura como a sétima forma de neoplasia mais freqüente no Brasil, sendo que na Região Sul encontra-se entre os nove primeiros cânceres mais freqüentes. As estimativas do INCA (Brasil) para o ano de 2010, na região Sul e no Rio Grande do Sul apontam para aproximadamente 14,2 e 14 novos casos para cada 100.000 homens, respectivamente. Ainda hoje é um problema de saúde pública em muitas partes do mundo, havendo predomínio no sexo masculino na faixa etária de 50 a 70 anos.

Os carcinomas espinocelulares (CECs) são as neoplasias mais freqüentes contribuindo com cerca de 90% dos casos de tumores malignos da cavidade oral (Hamana et al., 2005). Estudos epidemiológicos sugerem que a etiologia do câncer oral é multifatorial (Kuroda et al., 2007), onde múltiplos eventos moleculares se desenvolvem da combinação da predisposição genética individual e a exposição à carcinógenos ambientais (Choi & Myers, 2008). Contudo, apesar da grande quantidade de pesquisas em biologia celular e molecular e os avanços nas áreas de oncologia e cirurgia, o índice de sobrevivência de cinco anos não tem aumentados muito nas últimas décadas permanecendo em torno de 53% (Hamana et al., 2005).

O desenvolvimento do CEC é um processo gradual consistindo de múltiplas etapas, onde ocorre um aumento gradual da instabilidade genética (Khan et al., 2009). Assim, os CECs são em geral precedidos de lesões hiperplásicas, evoluindo para displasias, para carcinomas *in situ* e então chegando ao câncer bucal invasivo. Estas lesões são denominadas de lesões pré-malignas

(Ogmundsdottir et al., 2009), e incluem as leucoplasias, as eritroplasias, líquen plano e úlceras crônicas (Tsantoulis et al., 2007).

O TP53 é um dos genes supressores de tumor mais extensivamente estudado. Localiza-se no cromossomo 17p13.1, possuindo 11 exons e 20kb, e codifica a proteína p53 que possui 53kd e 393 aminoácidos. Este gene possui um importante papel na resposta ao estresse celular, reagindo a uma variedade de insultos incluindo a hipóxia, danos ao DNA, estresse metabólico e atividade de oncogenes (Zhuo et al., 2009). A p53 exerce a sua função protetora atuando como um fator de transcrição. A sua ligação com elementos específicos no DNA permite modular a transcrição de genes que governam as principais defesas contra o crescimento tumoral, que inclui a suspensão do ciclo celular, apoptose, manutenção da integridade genética, inibição da angiogênese e senescência celular. Ainda, a p53 interage com inúmeras proteínas celulares podendo contribuir com o processo inibitório da tumorigênese (Whibley et al., 2009) e por isso tem sido eleita como alvo em estudos de oncologia celular e molecular.

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo piloto para verificar a frequência dos polimorfismos do códon 72 do gene da p53 em pacientes do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) - UFPel, diagnosticados com lesões pré-malignas e malignas.

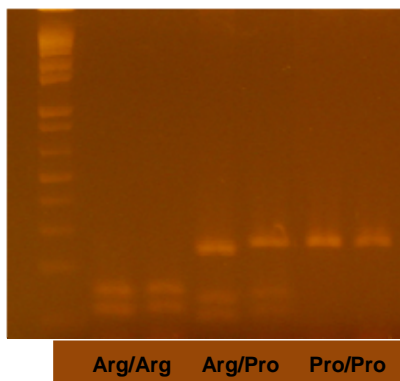
2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

População Alvo: Compreendeu os usuários do Serviço de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, com idade superior ou igual a 45 anos, portadores de lesões de mucosa oral com suspeita de pré-malignidade ou malignidade, a qual foi confirmada por exame histopatológico de rotina. Foram analisados 34 pacientes dentre estes 8 apresentaram o diagnóstico de carcinoma espinocelular, 18 de leucoplasia e 8 de líquen plano.

Obtenção do DNA Genômico: As amostras foram coletadas utilizando escovas citológicas descartáveis, com os pacientes previamente anestesiados, sendo friccionadas as lesões por aproximadamente 30 segundos. Foram coletadas duas amostras para a análise do DNA da lesão. Após a coleta, as escovas citológicas foram imediatamente introduzidas em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise celular e processadas segundo instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits - Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota).

Genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53 através de PCR-RFLP: A genotipagem do polimorfismo do códon 72 localizado no exon 4 do gene da p53 foi realizada através da técnica de PCR. O fragmento contendo o polimorfismo do códon 72 foi amplificado utilizando *primers* do exon 4 e clivado com a enzima *Bst*UI, a qual gerou fragmentos para a determinação dos genótipos (Figura 1).

Figura 1: Fragmentos do polimorfismo do códon 72 obtidos com a RFLP e seus respectivos genótipos



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Alguns estudos têm avaliado a relação entre o polimorfismo da p53 e o câncer oral, e os resultados tem se mostrado bastante controversos. Isso ocorre em parte devido à possibilidade de alguns polimorfismos desempenharem diferentes papéis na suscetibilidade ao câncer em diferentes populações étnicas. Grande parte dos estudos tem sido realizada com populações asiáticas e caucasianas, onde não tem sido encontrado uma correlação positiva entre o polimorfismo do codon 72 e o risco de câncer oral. Porém, tem sido demonstrado que pacientes com o genótipo Pro/Pro tendem a ter um pior prognóstico, em pacientes não fumantes este genótipo pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer oral e pode ser relacionado com o aparecimento em idade precoce de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SCCHN) (Kuroda et al., 2007). Tem sido sugerido que o alelo Arg72 induz apoptose mais rapidamente e suprime o crescimento tumoral mais eficientemente do que o alelo Pro72 (Kuroda et al., 2007). Contudo, no presente estudo foi encontrada uma maior frequência do genótipo Arg/Pro (11,8%) no CEC, dado observado na tabela 1, o que pode ser justificado pelo baixo número amostral.

O polimorfismo no códon 72 também tem sido relacionado com lesões pré-malignas, onde o genótipo Arg/Arg pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de leucoplasias orais (Misra et al., 2009). No presente estudo o genótipo Arg/Arg foi observado em 41% dos casos de leucoplasias, e 11,8% dos casos de líquen plano (tabela 2). Em um estudo recente foi verificado a ausência de associação entre o polimorfismo do códon 72 e o líquen plano em pacientes iranianos (Ghabanchi et al., 2009). No entanto, existe uma carência de informações a respeito da distribuição deste polimorfismo e sua correlação com lesões pré-malignas (Tabela 2).

Tabela 1: Porcentagem dos genótipos em lesões pré-malignas e malignas

Genótipo	Leucoplasia	Carcinoma Espinocelular	Liquen Plano
Arg/Arg	41%	8,8%	11,8%
Arg/Pro	11,8%	11,8%	8,8%
Pro/Pro	0%	3,0%	3,0%

Ainda, é possível observar na tabela 3 que as frequências dos genótipos observados são similares aos esperados e que os mesmos se enquadraram no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,27$).

Tabela 2: Frequência dos genótipos em lesões pré-malignas e malignas

Genótipo	Frequência Esperada	Frequência Observada
Arg/Arg	42,2	43
Arg/Pro	23,4	22
Pro/Pro	3.2	4

4 CONCLUSÕES

Assim, observa-se uma maior frequência do genótipo Arg/Arg nas leucoplasias, Arg/Pro em carcinoma espinocelular e Arg/Arg em líquen plano. O que pode demonstrar uma possível associação entre lesões pré-malignas e malignas e o polimorfismo do códon 72 da p53, devendo ser aprofundados os estudos com este alvo em amostras de CEC.

5 REFERÊNCIAS

- MICHOR, F. Dynamics of cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.4, p.197-205, (2004).
- ACHA-SAGREDO, A. p53 mutation is rare in oral mucosa brushings from patients previously treated for a head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.45, p.661-4, 2009.
- HAMANA, K. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v.92, p.2181-4, 2005.
- KURODA, Y. Association between the TP53 codon72 polymorphism and oral cancer risk and prognosis. **Oral Oncol**, v.43, p.1043-8, 2007.
- CHOI, S. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **J Dent Res**, v.87, p.14-32, 2008.
- TSANTOULIS, P.K. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncol**, v.43, p.523-34, 2007.
- GHABANCHI, J. Polymorphism of tumor protein p53 codon 72 showed no association with oral lichen planus in Shiraz, Iran. **J Craniofac Surg**, v.20, p.2168-70, 2009.
- MISRA, C. Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 loci modulate the risk of tobacco associated leukoplakia and oral cancer. **Mol Carcinog**, v.48, p.790-800, 2009.
- ZHUO, X.L. Study on TP53 codon 72 polymorphisms with oral carcinoma susceptibility. **Arch Med Res**, v.40, p.625-34, 2009.
- WHIBLEY, C. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev Cancer**, v.9, p.95-107, 2009.