

---

# **POLIMORFISMO DE TP53**

---

## **NOS CARCINOMAS**

---

### **TIROIDEANOS: ESTUDO**

---

#### **MOLECULAR**

---

#### **E META-ANÁLISE\***

---

**ANGELA ADAMSKI DA SILVA REIS, DANIELA DE MELO E SILVA, MARIA PAULA CURADO, APARECIDO DIVINO DA CRUZ**

*Resumo: nossa proposta foi avaliar o polimorfismo do gene TP5372 e a associação deste com o risco de desenvolvimento do câncer da tireóide. Para avaliar o papel de tal polimorfismo, 35 casos de câncer de tireóide foram comparados ao grupo controle de 134 indivíduos saudáveis. A determinação do polimorfismo do gene TP5372 foi feita por PCR e incluído na meta-análise de estudos caso-controle com pacientes com carcinomas tiroideanos utilizando o método de DerSimonian-Laird. A frequência do alelo p53Arg foi significativamente maior em ambos os grupos analisados. A comparação da frequência genotípica dos pacientes com o grupo controle demonstrou que genótipo p53Arg Arg apresenta menor risco para desenvolvimento de câncer, sugerindo que a presença do alelo arginina em homozigose possua um efeito protetor contra a carcinogênese tiroideana (OR:0,15;  $p < 0,0001$ ). Os dados gerados pela meta-análise demonstraram que a relação entre o genótipo e o fenótipo originado do polimorfismo de TP5372 não está associada à suscetibilidade genética ao câncer de tireóide.*

*Palavras-chave: Polimorfismo. Gene TP5372. Câncer de tireóide. Suscetibilidade genética. Meta-análise.*

**U**ma tendência no aumento da incidência do câncer de tireóide tem sido reconhecida em várias partes do mundo (REIS, 2010). Certamente, um importante fator para o aumento é a melhoria na capacidade de identificar malignidade em nódulos tiroideanos, proporcionada principalmente

pela ampla disponibilidade de exames ultra-sonográficos e pela citologia de material obtido por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) (REIS, 2010; DEAN, GHARIB, 2008; WARD, 2005; MATSUO *et al.*, 2004).

O câncer da tireóide é responsável por 1% de todos os tumores malignos, sendo três vezes mais frequente em mulheres (REIS, 2010; FAGIN, MITSIADES, 2008; KENT *et al.*, 2007; SYWAK *et al.*, 2004). Observa-se que o número de casos de câncer da tireóide na população brasileira tem aumentado nos últimos anos. No período de 1988 a 2003, o Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) de Goiânia-GO notificou 613 casos, sendo 83% para o sexo feminino e 17% para o sexo masculino. Os coeficientes de incidência padronizados para o gênero feminino foram 4,89/100.000 no primeiro quinquênio, 4,72/100.000 no segundo e 11,67/100.000 no último quinquênio (REIS *et al.*, 2008). O aumento da incidência dos tumores tiroideanos na região metropolitana de Goiânia - GO pode está relacionado provavelmente com a melhora no diagnóstico.

As recentes descrições das alterações genéticas relacionadas aos carcinomas de tireóide iniciaram a caracterização da patogênese molecular dos carcinomas e seus subtipos. As desordens genéticas desses tumores envolvem vias heterogêneas de patogênese, tais como: mutações que ativam a sinalização celular, anormalidades dos genes supressores de tumores e das proteínas reguladoras do ciclo celular (FERREIRA; ROCHA, 2004). A alteração mais frequente descrita em câncer de tireóide é o ganho de função em oncogenes, incluindo a ativação aberrante das vias de RAS/BRAF/MEK/ERK (REIS, 2010). A perda de função das proteínas supressoras de tumor inclui: o rearranjo PAX-8/PPAR $\gamma$ , baixa regulação de PTEN,  $\beta$ -caderina e mutação em p53 (MALAGUARNERA *et al.*, 2007).

As mutações envolvendo o gene supressor de tumor TP53 são eventos genéticos frequentemente observados em vários tipos de cânceres. Os clones mutados em TP53 permitem o aumento de uma população celular com maior instabilidade genética (REIS, 2010). Além das mutações no gene TP53, o polimorfismo da proteína codificada por este gene também é relatado como evento genético associado ao desenvolvimento do câncer (BOND *et al.*, 2007).

O polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 de TP53 (TP5372) é identificado como um SNP (do inglês, Single Nucleotide Polymorphisms), ou seja, as variações na sequência de DNA estão associadas com alterações de apenas uma base nitrogenada, levando as alterações estruturais da proteína p53. O SNP acarreta mudança na sequência de aminoácidos da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 na população. O códon 72 do éxon 4 pode codificar um aminoácido arginina (Arg) ou uma prolina (Pro) (REIS, 2010; RIBEIRO JR, SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

Entretanto, o papel deste polimorfismo ainda é controverso em vários tumores, sendo que muitos estudos apontam ora a presença de prolina, ora da arginina como um fator de risco significativo (BERGAMASCHI *et al.*, 2003). Adicionalmente, este polimorfismo tem sido relatado como potencial fator de risco para cânceres como: cérvix uterina, mama, pulmão e cabeça e pescoço, inclusive os tumores tiroideanos (ARAL *et al.*, 2007; ROGOUNOVITCH *et al.*, 2006; GRANJA *et al.*, 2004).

O papel do polimorfismo do gene TP53 no prognóstico dos carcinomas tiroideanos ainda é conflitante. Rogounovitch *et al.* (2006) sugerem que a combinação diferente do alelo p53 Arg/Arg pode contribuir para o risco de desenvolvimento de carcinoma

papilífero da tireóide (CPT) em indivíduos expostos a radiação durante a infância e adolescência. Enquanto, Granja *et al.* (2004) e Boltze *et al.* (2002) demonstraram que indivíduos com genótipo p53 Pro Pro têm uma maior chance de desenvolverem câncer de tireóide.

Os polimorfismos genéticos podem influenciar no risco para o desenvolvimento de nódulos tiroideanos malignos, sugerindo que a patogênese de tumores tiroideanos pode ser devida à exposição contínua aos fatores ambientais vinculadas a susceptibilidade genética. O objetivo do presente estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo do gene TP5372 (Arginina/Prolina), em pacientes diagnosticados com o câncer de tireóide e grupo controles, bem como realizar uma meta-análise com dados de artigos publicados entre 2008 e 2009 e os dados do presente estudo sobre o polimorfismo de TP537em câncer de tireóide.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Análise Molecular do Polimorfismo de TP5372

O presente estudo foi caracterizado como um estudo caso-controle para estabelecer os perfis alélicos de TP5372, o grupo amostral foi constituído por 169 indivíduos no total, sendo os grupos classificados em caso e controle. O grupo caso foi constituído de 35 pacientes atendidos no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge / Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) diagnosticados com câncer de tireóide. O grupo controle foi constituído de 134 indivíduos que não possuíam nenhuma suspeita de câncer nas vias aerodigestivas superiores ou patologias de ordem endócrina associadas a glândula tireóide. Estes foram selecionados aleatoriamente no banco de amostras do Núcleo de Pesquisas Replicon.

A participação individual no presente estudo teve caráter voluntário para ambos, casos e controles, na qual a participação foi voluntária, tendo como critério de inclusão a idade mínima de 15 anos. Para a realização do presente estudo obteve-se o parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa/ACCG.

Foram coletados 10mL de sangue periférico com anticoagulante, colhidos em tubos cônicos graduados de 12mL, sendo posteriormente processados a 5.000 x g durante 30 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em criotubos, preservados a -20°C, para posterior análise. No grupo caso, as amostras de sangue periférico foram coletadas anteriormente ao tratamento.

A extração e purificação de DNA das amostras obtidas foram executadas com uso do kit de extração Wizard® Genomic DNA Purifications Kit (Promega Corporation, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Posteriormente a purificação do material genômico, as amostras foram previamente quantificadas por espectrofotometria GeneQuant®(GE Healthcare, EUA) em diluição 1/10 (1uL amostra/10 uL Água Milli-Q Estéril) e em seguida as mesmas foram utilizadas nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction).

Para a determinação do polimorfismo do gene TP5372, todas as amostras foram submetidas à reação de PCR, para a obtenção dos amplicons esperados, para tal pro-

cedimento foram utilizados dois conjuntos de primers (Tabela 1): um para Arginina (p53Arg) e outro para Prolina (p53Pro), ambos presentes no gene TP5372.

Tabela 1: Características gerais dos primers utilizados para a avaliação do polimorfismo de TP5372 nos grupos caso e controle

| Primers | Sequencia                        | T.M. <sup>1</sup> |
|---------|----------------------------------|-------------------|
| p53Arg  | F:5' TCC CCC TTC CCG TCC CAA 3'  | 141               |
| p53Pro  | R:5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC 3'  |                   |
|         | F: 5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC 3' |                   |

T.Legenda: 1 T.M. = Tamanho Molecular.

O volume final utilizado na PCR foi de 25µl, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0.15 nmoles de cada primer, 1X PCR Buffer (5 mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.10mM de cada dNTP e *IU Taq DNA* polimerase Invitrogen®. Para a amplificação dos fragmentos de p53Arg 141 pb e p53Pro 177 pb de TP5372 foi utilizado o protocolo sugerido de Sourvinos et al. (2001), com adaptações (Tabela 2).

Tabela 2: Protocolo de termociclagem para análise do polimorfismo de TP5372 arginina e prolina

| Etapas               | Temperatura (°C)                         | Tempo (min.) | Ciclos    |
|----------------------|--|--------------|-----------|
| Desnaturação inicial | 94                                       | 5            | 1         |
| Desnaturação cíclica | 94                                       | 1            |           |
| Anelamento           | 59 <sup>(Arg)</sup> /54 <sup>(Pro)</sup> | 1            | 35        |
| Extensão cíclica     | 72                                       | 1            | -         |
| Extensão final       | 72                                       | 5            | 1         |
| Armazenamento        | 4  | <b>18</b>    | <b>18</b> |

Para a análise dos amplicons, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado pela técnica de Nitrato de Prata (AgNO<sub>3</sub>).

Na análise estatística foi usado o teste exato de qui-quadrado (χ<sup>2</sup>) para examinar a homogeneidade entre os casos e os controles com relação aos alelos. O teste de Kruskal-Wallis (H) foi usado para comparar os genótipos entre os grupos. Para avaliar o risco relativo entre polimorfismo de TP5372 e o câncer de tireóide foi realizado o teste de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% entre as frequências genóticas das populações caso e controle para indicar o risco que um determinado genótipo possui em relação ao grupo controle.

## Polimorfismo de *TP53 72* e Associação por Meta-análise

A seleção dos artigos seguiu os seguintes critérios de inclusão e exclusão: (1) foram publicados no período de 2000 a 2009, (2) eram estudos do tipo caso-controle e os casos genotipados apresentavam confirmação histológica para carcinoma tiroideano e, finalmente, (3) utilizavam a PCR para a determinação do polimorfismo de *TP5372*.

Desta forma, os seguintes dados foram coletados: local onde o estudo foi realizado, ano da publicação, o tipo de carcinoma, número totais e discriminados por sexo para os pacientes e os controles, médias das idades de cada grupo e, finalmente, o tipo de metodologia utilizada para a determinação do polimorfismo de *TP5372*.

Aplicou-se o teste de efeito randômico de DerSimonian-Laird para todas as possibilidades genóticas: (1) RR x RP, (2) RR x PP e (3) RP x PP. Em seguida, comparou-se, utilizando o mesmo teste, o genótipo tipo-selvagem *p53 Arg/Arg* com a junção dos genótipos variantes *p53Arg/Pro* e *p53 Pro/Pro*, para todos os estudos.

## RESULTADOS

### Análise Molecular do Polimorfismo de *TP5372*

As frequências alélicas de *p53Arg* foram de 45,7% e 71,6% para o grupo caso e grupo controle, respectivamente. Para o alelo *p53Pro* verificou-se as frequências de 54,3%, e 28,4%, para os casos e grupo controle, respectivamente. A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição das frequências alélicas entre as populações de pacientes e controle

| Alelo                        | Casos<br>n (%)         | Controle<br>N (%)                 | X <sup>2</sup> | GL | p    |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------|----|------|
| <i>p53 Arg</i><br><i>pro</i> | 16 (45,7)<br>19 (54,3) | 96 (71,6) <i>p53</i><br>38 (28,4) | 9,61           | 3  | 0,02 |
| Total                        | 35 (100)               | 134(100)                          |                |    |      |

As frequências genóticas encontradas pela análise dos dados em *TP5372* foram: 17,14% (6/35) nos casos e 57,5% (77/134) no grupo controle para homozigotos *Arg/Arg*, 60% (21/35) e 29,1% (39/134) para eterozigotos *Arg/Pro* e 22,86% (8/35) e 13,4% (18/134) para homozigotos *Pro/Pro*, para os casos e o controle, respectivamente. De acordo com Teste de Kruskal Wallis (H), não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos das populações caso e controle, tendo  $p=0,15$ . A distribuição das frequências genóticas encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4: Distribuição das frequências genótípicas entre as populações de pacientes e controle

| Genótipo                             | Casos<br>n (%)         | Controle<br>N (%)                                | H    | GL | p    |
|--------------------------------------|------------------------|--|------|----|------|
| <i>p53 Arg Arg</i><br><i>Arg pro</i> | 6 (17,14)<br>21 (60,0) | 77 (57,5) <i>p53</i><br>39 (29,1) <i>p53 pro</i> | 5,31 | 3  | 0,15 |
| Total                                | 35 (100%)              | 134 (100%)                                       |      |    |      |

A frequência do alelo *p53Arg* foi significativamente maior em ambos os grupos de pacientes NNB e NNN e grupo controle. De acordo com o Teste de *Odds Ratio* (Tabela 5), a comparação das frequências genótípicas dos pacientes com o grupo controle demonstra que genótipo *p53ArgArg* apresenta menor risco para os pacientes, sugerindo que a presença da variante arginina em homozigose possui um efeito protetor contra a carcinogênese (OR:0,15, IC 95%: 0,06-0,39,  $p < 0,0001$ ).

Tabela 5: Análise polimórfica de TP5372 e respectivas taxas de Odds Ratio (OR), Intevalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de p nos grupos caso e controle

| Genótipos      | Controle    |            | Casos              | P        |
|----------------|-------------|------------|--------------------|----------|
|                | n (%)       | N (%)      | OR (95% IC)        |          |
| <i>Arg/Arg</i> | 77 (57)     | 6 (17,14)  | 0,15 (0,06 – 0,39) | < 0,0001 |
| <i>Arg/Pro</i> | 39 (30)     | 21 (60,0)  | 1,21 (0,45 – 3,25) | 0,89     |
| <i>Pro/Pro</i> | 18 (13)     | 8 (22,86)  | 0,17 (0,05 – 0,56) | 0,005    |
| Total          | 134 (100,0) | 35 (100,0) |                    |          |

#### Polimorfismo de TP53 72 e Associação por Meta-Análise

Os artigos utilizados nesta meta-análise, publicados entre os anos de 2000 e 2009 e os dados do presente estudo, avaliaram o polimorfismo do gene TP5372 em grupos de pacientes com câncer de tiróide (3 artigos) e em controles saudáveis. O quarto estudo (BOLTZE et al., 2002) foi excluído, devido o grupo controle ser amostras de DNA de tecido normal da tiróide e não de sangue periférico, como nos demais estudos, inclusive na proposta da presente análise. Os métodos de avaliação do polimorfismo gênico foram por PCR (2 artigos) e PCR em tempo real (1 artigo).

Ao avaliar as frequências genótípicas, para os 360 pacientes do grupo caso, encontrou-se: 137 (37,9%) apresentaram o genótipo *p53Arg/Arg* (RR), 173 (80,3%) o genótipo *p53Arg/Pro* (RP) e apenas 50 (19,5%) o genótipo *p53Pro/Pro* (PP). No grupo controle, para os 715 participantes: 340 (50,3%) apresentaram o genótipo RR, 320 (41,6%) o genótipo RP e 55 (10,0%) o genótipo PP.

Todos os dados sobre o número de indivíduos por polimorfismo de TP5372 (RR, RP e PP) e suas respectivas frequências relativas, para os grupos caso e controle, dos 3 estudos considerados podem ser vistos na Tabela 6.

Para cada agrupamento, foi aplicado o teste de DerSimonian-Laird (AYRES et al., 2007). As Odds Ratios foram calculadas com o agrupamento de todos os estudos para: RR x RP (OR = 0,63; IC95% = 0,31-1,30; p=0,22; Figura 1), RR x PP (OR = 0,31; IC95% = 0,15-0,63; p=0,0013; Figura 2) e RP x PP (OR = 0,53; IC95% = 0,24-1,16; p=0,11; Figura 3). As análises indicaram diferenças estatísticas entre os grupos caso e controle RR X PP.

Tabela 6: Distribuição do polimorfismo do gene TP5372 em pacientes com carcinomas tiroideanos para os genótipos RR, RP e PP, nos grupos casos e controle de artigos publicados entre 2000 e 2009 e os dados do presente estudo

| Referência | CASO |       |     |       |    |       |       | MESCLAR |       |     |       |    |       |       |
|------------|------|-------|-----|-------|----|-------|-------|---------|-------|-----|-------|----|-------|-------|
|            | RR   | f     | RP  | F     | PP | f     | TOTAL | RR      | f     | RP  | f     | PP | f     | TOTAL |
| 1          | 37   | 0.378 | 49  | 0.798 | 12 | 0.196 | 98    | 51      | 0.333 | 99  | 0.647 | 3  | 0.007 | 153   |
| 2          | 77   | 0.456 | 75  | 0.811 | 17 | 0.184 | 169   | 159     | 0.508 | 130 | 0.415 | 24 | 0.002 | 313   |
| 3          | 17   | 0.293 | 28  | 0.678 | 13 | 0.315 | 58    | 53      | 0.461 | 52  | 0.452 | 10 | 0.008 | 115   |
| 4          | 6    | 0,171 | 21  | 0,72  | 8  | 0,274 | 35    | 77      | 0,575 | 39  | 0,291 | 18 | 0,008 | 134   |
| TOTAL      | 137  | 0,379 | 173 | 0,803 | 50 | 0,195 | 360   | 340     | 0,503 | 320 | 0,416 | 55 | 0,001 | 715   |

Legenda: 1: Granja *et al.* (2004); 2: Rogounovitch *et al.* (2006); 3: Aral *et al.* (2007); 4: Reis (2010).

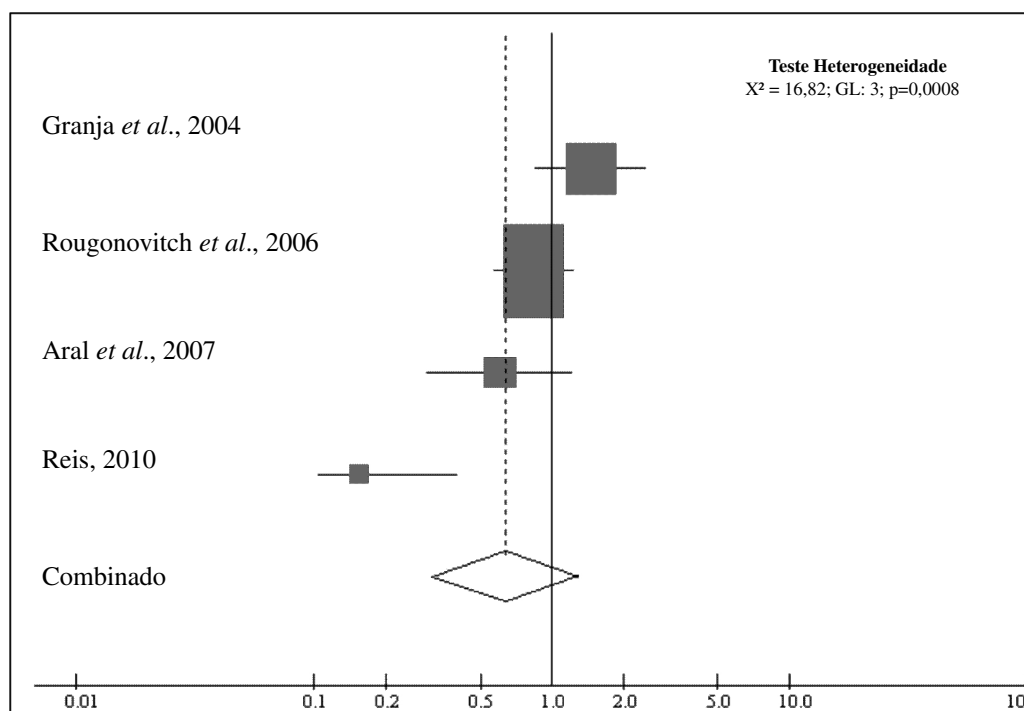


Figura 1: Odds ratios (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e RP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonianLaird*).



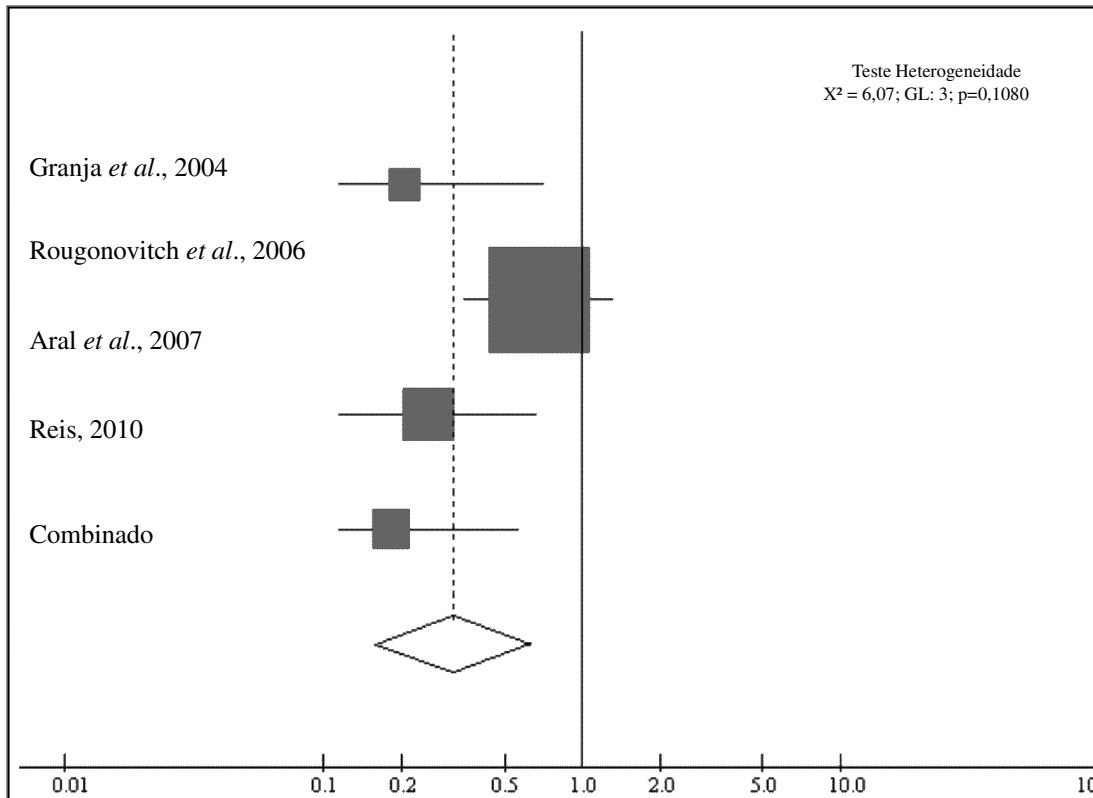


Figura 2: Odds ratios (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade não significativos (Teste de *Der Simonian-Laird*).

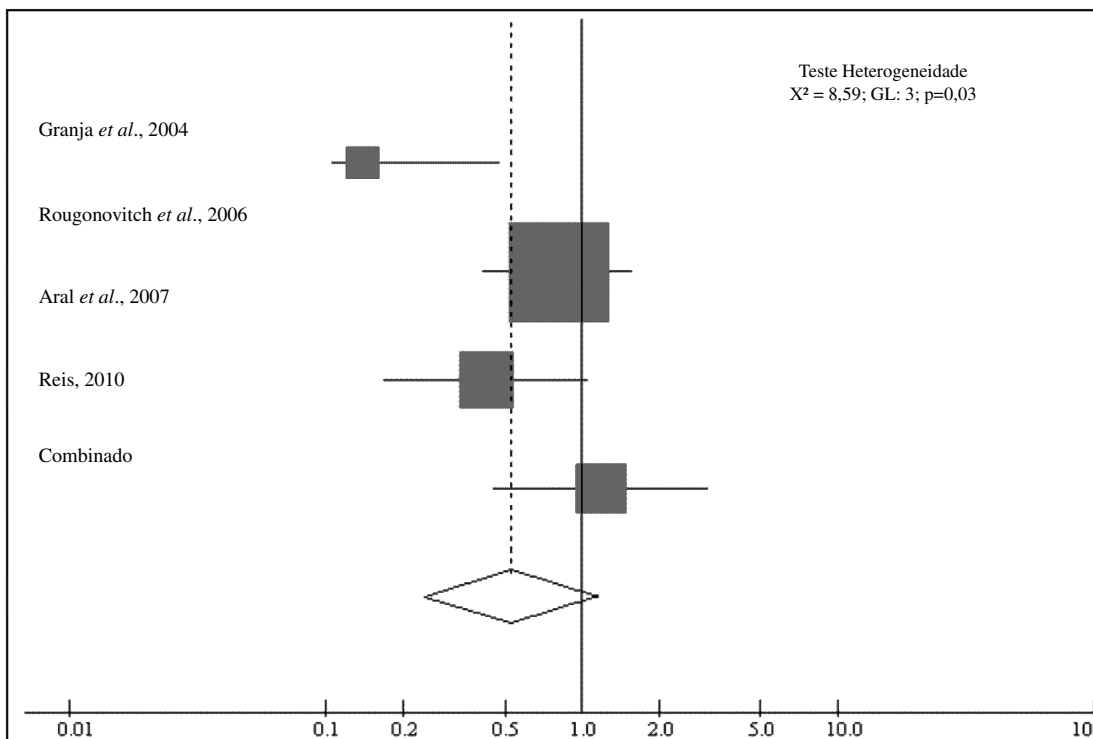


Figura 3: Odds ratios (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RP e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian Laird*).

Adicionalmente, os dados do polimorfismo de TP5372 foram agrupados em cada artigo, confrontando os valores de RR isolados com os valores de RP e PP unidos.



Calculou-se as Odds Ratios (OR), a variação de OR dentro do intervalo de confiança de 95% e a probabilidade de significância (p) [Tabela 7]. Ao aplicar o teste de DerSimonian-Laird (AYRES *et al.*, 2007), o OR dos trabalhos combinados (OR = 0,58; IC95% = 0,30-1,14; p=0,11) não indicou diferença entre os grupos estudados (Figura 4).

Adicionalmente, os dados do polimorfismo de TP5372 foram agrupados em cada artigo, confrontando os valores de RR isolados com os valores de RP e PP unidos. Calculou-se as Odds Ratios (OR), a variação de OR dentro do intervalo de confiança de 95% e a probabilidade de significância (p) [Tabela 7]. Ao aplicar o teste de DerSimonian-Laird (AYRES *et al.*, 2007), o OR dos trabalhos combinados (OR = 0,58; IC95% = 0,30-1,14; p=0,11) não indicou diferença entre os grupos estudados (Figura 4).

Tabela 7: Distribuição do polimorfismo do gene TP53, RR x RP e PP, em casos e controles dos artigos publicados entre 2000 e 2009 e os dados do presente trabalho.

| Referência                        | Casos |         | Controle |         | RR X RP               |
|-----------------------------------|-------|---------|----------|---------|-----------------------|
|                                   | RR    | RP e PP | RR       | RP e PP | OD (IC 95%) p         |
| Granja <i>et al.</i> , 2004       | 37    | 61      | 51       | 102     | 1.23 (0.71-2.05) 0.56 |
| Rougonovitch <i>et al.</i> , 2006 | 77    | 90      | 159      | 154     | 0.82 (0.56-1.20) 0.37 |
| Aral <i>et al.</i> , 2007         | 17    | 41      | 53       | 62      | 0.48 (0.24-0.95) 0.05 |

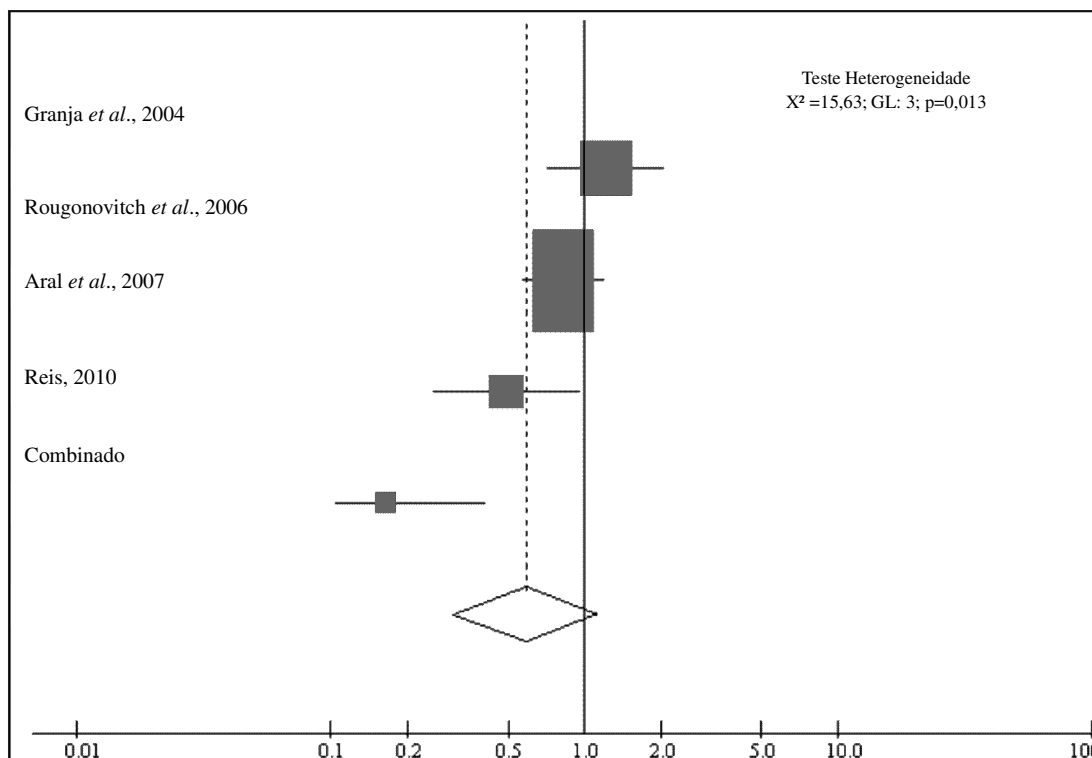


Figura 4: Odds ratios (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR x RP+PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*).

Na análise apresentada verificamos que os dados combinados RR X RP +PP apresentaram o do valor de  $p=0,013$ , demonstrando uma significância abaixo da curva. No entanto, para os outros genótipos RR X RP e RP X PP as análises indicaram diferença entre os grupos.

## DISCUSSÃO

As frequências alélicas para p53Arg apresentaram percentual elevado tanto nos

casos quanto no grupo controle. A diferença estatística significativa ( $p= 0,02$ ) pelo teste do  $X^2$  na distribuição das frequências alélicas de p53Arg entre os grupos analisados corroboram com evidências de que o alelo p53Arg é o mais comum nas populações Latino-Americanas (GALLO *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos têm relacionado o risco aumentado com o câncer de tiróide, a presença do alelo p53Pro (BOLTZE *et al.*, 2002; GRANJA *et al.*, 2004; ARAL *et al.*, 2007).

O polimorfismo do códon 72 de TP53 no éxon 4 é extensivamente estudado por causar impacto na sequência codificadora do gene, gerando variantes polimórficas com características bioquímicas e biológicas distintas, além de estar associado ao maior risco de desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (THOMAS *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2003; LATTUADA *et al.*, 2004). Várias alterações celulares que podem culminar com o desenvolvimento de tumores vêm sendo estudadas em todo o mundo. Inúmeras pesquisas são publicadas anualmente objetivando associar tais modificações à iniciação, promoção e progressão dos cânceres humanos, incluindo o câncer de tiróide (ARAL *et al.*, 2007; ROGOUNOVITCH *et al.*, 2006; GRANJA *et al.*, 2004 e BOLTZE *et al.*, 2002).

O gene TP5372 está no centro de várias vias regulatórias celulares (BOJESSEN & NORDESTGAARD, 2008). A variante p53Arg é a mais eficiente na indução da apoptose, enquanto que a variante p53Pro induz o bloqueio do ciclo celular em G1 e a ativação de mecanismos de reparo p53-dependentes de forma mais eficaz (REIS, 2010; BOJESSEN, NORDESTAGAARD, 2008; DUMONT *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 1999).

Os poucos estudos publicados envolvendo o polimorfismo de TP5372 e a suscetibilidade ao câncer tiroideano foram descritas em quatro regiões diferentes: Turquia, Rússia, Brasil e Alemanha. A análise de OR nos resultados apresentados não revelou nenhum genótipo como fator potencial ao risco de câncer de tiróide. No entanto, Rogounovitch *et al.* (2006) sugerem que o genótipo p53 ArgPro pode contribuir para o risco de CPT.

Aral *et al.* (2007), Granja *et al.* 2004 e Boltze *et al.* 2002 indicam que as frequências genotípicas comparadas entre os grupos caso e controle sugerem que o genótipo p53Pro Pro atue como fator de risco a carcinogênese tiroideana. Por outro lado, estes estudos também relatam que a presença do alelo arginina implica como um efeito protetor contra a carcinogênese, similarmente aos nossos achados quando em homozigose (OR: 0,15;  $p<0,0001$ ).

Os dados sobre as frequências gênicas e genotípicas da literatura mundial são conflitantes em diversos sítios anatômicos, fato que pode ser atribuído às diferenças étnicas

entre as populações estudadas. Além desses, outros fatores podem contribuir para a divergência de resultados nos mais variados estudos, incluem o tamanho amostral, o tipo de amostra utilizada como fonte de DNA, as técnicas de detecção utilizadas e as variações inter-laboratoriais dos protocolos usados (REIS, 2010; ALMEIDA, 2008; BRENNAN *et al.*, 2004).

A oscilação ou deriva genética, atuando em conjunto com a seleção natural, envolve flutuações aleatórias nas frequências de alelos, devido a erros de amostragem, havendo a tendência de fixar-se um ou a outro alelo, especialmente em populações muito pequenas. Dessa maneira, a deriva genética também pode estar associada à discrepância dos resultados encontrados na literatura, uma vez que a estabilidade das frequências alélicas varia conforme o tamanho das populações (ALMEIDA, 2008). Os erros de amostragem podem ocorrer devido ao fato de se utilizarem populações relativamente pequenas, como as que incluímos em nosso trabalho.

No presente estudo, sugere-se que os indivíduos portadores do genótipo p53 Arg Arg apresentam um efeito protetor a carcinogênese. Por outro lado, os dados não apresentaram associação significativa entre as características clínicas-patológicas analisadas e um genótipo que atue como fator de risco a carcinogênese tiroideana.

O polimorfismo de TP5372 e a associação por meta-análise demonstra que o grupo de pacientes com câncer de tireóide variou entre 58 (ARAL *et al.*, 2007), 169 (ROUGONOVITCH *et al.*, 2006) e 98 indivíduos (GRANJA *et al.*, 2004). Sobre o grupo controle, os artigos trabalharam com indivíduos saudáveis, variando entre 115 (ARAL *et al.*, 2007), 313 (ROUGONOVITCH *et al.*, 2006) e 153 (GRANJA *et al.*, 2004). Agrupando todos os estudos, incluindo os dados do presente estudo, tem-se um total de 715 participantes.

A meta - análise é definida como procedimento estatístico que consiste numa revisão quantitativa e resumida de resultados e estudos distintos, mas relacionados. O objetivo principal foi comparar e possivelmente combinar os resultados de diferentes trabalhos publicados acarretando numa conclusão geral. Apesar dos poucos estudos envolvendo este polimorfismo e o câncer de tireóide, podemos ressaltar que a relação entre o genótipo e o fenótipo originado do polimorfismo gênico de TP5372 ainda não é suficientemente compreendido.

No entanto, para esta neoplasia em particular, os dados para o polimorfismo de TP5372 revelaram heterogeneidade pela meta-análise. Embora, a maioria dos artigos associe a combinação genotípica p53 Pro/Pro como susceptível ao carcinoma tiroideano. Por outro lado, os dados do presente estudo não apresentaram associação significativa entre as características clínicas-patológicas e genótipo que atue como fator de risco a carcinogênese tiroideana.

Os polimorfismos genéticos podem influenciar no risco para o desenvolvimento de nódulos tiroideanos malignos, sugerindo que a patogênese de tumores tiroideanos pode ser devida à exposição contínua aos fatores ambientais vinculadas a susceptibilidade genética. Um perfil genotípico para genes relacionados à susceptibilidade nos carcinomas tiroideanos poderá selecionar grupos que poderiam se beneficiar de medidas preventivas e/ou de intervenções diagnósticas e terapêuticas.

## THE TP53 GENE POLYMORPHISM AT CODON 72 IN THYROID CARCINOMAS: A META-ANALYSIS

*Abstract: we hypothesized that polymorphisms of the common germline polymorphism of TP5372 gene may be associated with the risk of thyroid cancer. To evaluate the role of such polymorphisms, we investigated 35 cases of thyroid cancer compared with 134 controls of the healthy individuals. For the determination of the polymorphism in the gene TP5372, the samples were submitted to conventional PCR reaction. We included case-control studies that compare the incidence of germline polymorphism of TP5372 in patients with thyroid cancer by DerSimonian-Laird method. The frequency of the p53 Arg allele was significantly higher in the patient and control groups. The genotype p53Arg Arg presents a lower risk to thyroid cancer, indicating that the allele arginine in homozygosis can present a protective effect against thyroid carcinogenesis (OR: 0.15;  $p < 0.0001$ ). The data of the meta-analysis demonstrates that the relation between the genotype and phenotype from the TP5372 polymorphism is not associated with the genetic susceptibility at thyroid cancer.*

*Keywords: Polymorphism. Gene TP5372. Thyroid cancer. Genetic susceptibility. Meta-analysis.*

### Referências

- ALMEIDA PSR. Polimorfismo do gene TP53 em sarcomas moles no adulto. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO. 89p. 2008.
- ARAL C, CAGLAYAB S, OZISIK G et al. The association of p53 codon 72 polymorphism with thyroid cancer in Turkish patients. *Marm Med Jour.* v.20, n.1, p.1-5, 2007.
- AYRES M, AYRES JR. M, AYRES DL, SANTOS AS. *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá; p. 132-214, 2007.
- BERGAMASCHI D, GASCOM M, HILLER L, SULLIVAN A et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73- dependent apoptosis. *Cancer Cell.* v. 3, p.387-402, 2003.
- BOJESSEN SE, NORDESTGAARD BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle.* v.7, n.2, p.158-163, 2008.
- DUMONT P, LEU JI, DELLA PIETRA III AC, GEORGE DL, MURPHY M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. *Nat Genetics.* v.33, p.357-365, 2003.
- BOLTZE C, ROESSNER A, LANDT O. et al. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J oncol.* v.21, n.5, p. 1151-1154, 2002.
- BOND GL, LEVINE AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene.* v.26, n.9, p.1317-1323, 2007.
- BRENNAN SMF, SILVA IDCG, ZEFERINO LC et al. Prevalence of codon 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer. *Genet Mol Biol.* v.27, n.4, p. 496-499, 2004.
- DEAN, D S. & GHARIB, H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v.22, n.6, p.901-911, 2008.

- DELSIMONIAN R, LAIRD N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clin Trials*. v.7, p.77-88, 1986.
- DUMONT P, LEU JI, DELLA PIETRA III AC, GEORGE DL, MURPHY M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. *Nat Genetics*. v.33, p. 357-365, 2003.
- FAGIN JA & MITSIADES N, Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract and Res Clinl Endocrinol& Met*. v.22, n.6, p.955-969, 2008.
- FERREIRA G.; ROCHA JC. Susceptibilidade genética ao câncer *Oncologia Molecular*. In: *Oncologia Molecular*. Editora Atheneu. São Paulo, SP. 2004, p.295.
- GALLO CVM, MENDONÇA GAS, MORAES E, OLIVIER M, HAINAUT P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. *Mutat Res*. v. 589, n.3, p. 192-2007, 2005.
- GRANJA F, MORARI EC, CORREA LA, ASSUMPCÃO LV, WARD LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett*. v.210, n.2, p.151-157, 2004.
- KENT WDT, HALL SF, ISOTALO PA, HOULDEN RL, GEROGE RL, GROOME PA. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *Canadian Med Assoc or its licensors*. v.177 n.11, p. 1357-1361, 2007.
- LATTUADA D, VIGANO P, SOMIGLIANA E, ABBIATI A, CANDIANI M, DI BLASIO AM. Analysis of the codon 72 polymorphism of the TP53 in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod*. v. 10, n.9, p. 651-654, 2004.
- MALAGUARNERA, V.V, VIGNERI, R. & FRASCA, F. P53 family proteins in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v.14, p. 43-60, 2007.
- MATSUO SE, MARTINS L, LEONI SG, HAJJAR D, RICARTE-FILHO JCM, EBINA KN, KIMURA ET. Marcadores Biológicos de tumores tiroideanos. *Arq Bras Endocrinol Metab* v.48, n.1, p.114-125, 2004.
- RIBEIRO JR U, SAFATLE-RIBEIRO AV. p53 in clinical contexts: yes or not? *Arq Gastroenterologia*. v.43, n.1, p.6-7, 2006.
- REIS DSM, MORIHISA IA, MEDEIROS KC, FERNANDES LM. et al. Cancer de tireóide em Goiânia: estudo descritivo de base populacional no período de 1988 a 2003. *Rev Bra de Cir Cab e Pes*. v.37, n.2, p.62-66, 2008.
- REIS AAS. Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO. 196p. 2010.
- ROGOUNOVITCH TI, SAENKO VA, ASHIZAWA et al. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep*. v.15, n.49, p.49-956,2006.
- SOURVINOS G, RIZOS E, SPANDIDOS DA. P53 Cofon 72 polymotphisms in linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncol*. v.37, n.7,p.572-578, 2001.
- SYWAK M, PASIEKA JL E OGILVIE T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. *Journal of Surgical Oncology*. v.86, p.44-54, 2004.
- THOMAS M, KALITA A, LABRECQUE S, PIM D, BANKS L, MATLASHEWSKI G. Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. *Mol Cell Biol*. v.19, n.2.p. 1092-1100, 1999.

\* Recebido em: 03.03.2012.

Aprovado em:20.03.2012.

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa de Doutorado concedida à aluna Angela Adamski da Silva Reis, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás; à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás pelo fomento que proporcionou o desenvolvimento das atividades experimentais deste estudo.

### **ANGELA ADAMSKI DA SILVA REIS**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Universidade Federal de Goiás (UFG).

### **DANIELA DE MELO E SILVA**

Núcleo de Pesquisas Replicon. Departamento de Biologia. Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

### **MARIA PAULA CURADO**

Hospital Araújo Jorge. Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

### **APARECIDO DIVINO DA CRUZ**

Núcleo de Pesquisas Replicon. Departamento de Biologia. PUC Goiás. E-mail:acruz@pucgoias.edu.br