



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LUCAS PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE TP53 EM TUMORES DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

BRASÍLIA

2015

LUCAS PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE TP53 EM TUMORES DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado no formato de artigo  
científico ao UniCEUB como requisito  
parcial para a conclusão do Curso de  
Bacharelado em Biomedicina

Orientadora: Dra. Kelly Cristina Rodrigues  
Simi

Co-orientadora: Dra. Rosângela Vieira de  
Andrade

BRASÍLIA

2015

# ANÁLISE MOLECULAR DO GENE TP53 EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO

Lucas Pereira da Silva<sup>1</sup>  
Dra. Kelly Cristina Rodrigues Simi<sup>2</sup>  
Dra. Rosângela Vieira de Andrade<sup>3</sup>

## RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde o câncer foi responsável por quase 8,2 milhões de mortes em 2012. No Brasil as taxas crescem ano após anos. Entre 2014 e 2015 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 576.580 novos casos. O câncer conhecido como de cabeça e pescoço usualmente começa em células escamosas de mucosas na região da cabeça e pescoço. Esse câncer é categorizado pela área na qual ele se inicia. O uso de álcool e tabaco é o principal fator de risco para esse tipo de câncer. Contudo, infecção pelo HPV tem aumentado a incidência de câncer de orofaringe. O gene TP53 é o principal gene mutado em câncer humano. Algumas mutações oncogênicas conferem ganho de função. O polimorfismo do gene TP53 tem sido associado com o câncer de cabeça e pescoço. Foi analisado no presente trabalho amostras de tumores de cabeça e pescoço de 20 pacientes utilizando sequenciamento de alto desempenho do genoma. A média da idade dos pacientes era de 56 anos e a metade dos pacientes eram etilistas e/ou tabagistas. Foram encontrados onze polimorfismos do gene TP53, apenas quatro deles tinham descrição na literatura. A variante mais frequente entre as amostras foi a rs1042522 (uma mutação *missense*, R72P). Outros polimorfismos, tais como, rs1800370 (P36P), rs1800371 (P47S) e rs28934578 (R175H) foram observados. Esses achados demonstraram um importante papel da mutação de p53 no câncer de cabeça e pescoço e seu uso potencial como marcador molecular para diagnóstico.

Palavras-chave: rs1042522, polimorfismo, ganho de função, HPV, mutação

## ABSTRACT

According to health world organization cancer was responsible for 8,2 million of death in 2012. In Brazil rates grow up over years. Between 2014 and 2015 National Cancer Institute (INCA) estimated 576.580 new cases. Cancers that are know as head and neck usually begin in the squamous cells that line the moist, mucosal surfaces inside the head and neck. Cancer of head and neck are further categorized by the área of the head or neck in which begin. The use of alcohol and tobacco are the two most important risk factors for head and neck cancers. However, infection with HPV has increased incidence of oropharyngeal cancers. TP53 is of the most frequently mutated genes in human cancers. Some of the mutations being oncogenic confer gain-of-function properties. Polymorphism of TP53 gene has been associated in head and neck cancer. We analyzed 20 tumors of patient with head and neck cancer using deep sequencing of genome. The median ages of onset was 56 years old and half of them was tagist and/or used alcohol. We found eleven polymorphism of TP53 gene, only four of them were described in the literature. The variant more frequent between sample was rs1042522 (a *missense* mutation, R72P). Other polymorphisms such as rs1800370 (P36P), rs1800371 (P47S) and rs28934578 (R175H) were observed. These findings support an important biological role for p53 mutation for neck and head cancer and provide further evidence that mutation could have potential use as a molecular marker.

Key words: rs1042522, polymorphism, gain of function, HPV, mutation

<sup>1</sup>Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário UniCeub

<sup>2</sup>Professora de Imunologia do Centro Universitário UniCeub

<sup>3</sup>Professora e Pesquisadora da Universidade Católica

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Câncer

Segundo a Organização Mundial de Saúde o câncer é um termo genérico para um grande número de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo com a criação rápida de células anormais crescendo além dos seus limites habituais podendo invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para outros órgãos (NEWS.MED.BR, 2014).

O processo pelo qual uma célula normal torna-se progressivamente transformada em célula maligna requer uma série de mutações que leva a danos no genoma (BERTRAN, 2000).

A perturbação do ciclo celular com o crescimento desordenado de células caracteriza o início da neoplasia (DE BERARDINIS et al., 2008). A transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é um processo dependente de muitos fatores (PARSA, 2012). Os cânceres geralmente são esporádicos, indicando que a variação do ciclo provém de mutação nas células do tecido afetado. Por exemplo, a desordem de pontos de controle do ciclo celular como os proto oncogenes necessários para altas taxas de divisão celular que quando mutados podem favorecer o crescimento celular desordenado denominando-se oncogenes; e os genes supressores de tumor que realizam a regulação negativa como inibição ou supressão do crescimento celular. A perda de função por mutação ou deleção em ambos os alelos impede que exerçam sua função resultando em uma neoplasia (PASQUALUCCI et al., 2001). Outro fator é a ação imunológica que destrói as células cancerosas reconhecendo antígenos tumorais específicos, caso os antígenos não sejam expressos ou as células do sistema imune estejam afetadas, este processo para a regulação de tumores torna-se ineficaz (LEWIS, 2004).

Além das características biológicas individuais, os fatores ambientais também se associam as neoplasias como a radiação ionizante e a radiação ultravioleta, alimentação inadequada e sedentarismo, aflatoxinas (micotoxinas), álcool, tabaco e agentes biológicos como bactérias, parasitas e vírus correspondendo a cerca de 80% a 90% de todos os casos de neoplasias (KOSTARELI, 2013).

O câncer figura entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012 (WHO, 2014).

No Brasil a incidência de câncer cresce todo o ano, no período de 2014/2015 a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 576.580 novos casos (Tabela

1). Segundo o Ministério da Saúde as neoplasias representam a segunda causa de óbitos em todo o país. Dentre a localização primária do tumor, o câncer de cabeça e pescoço possui incidência mundial superior a meio milhão de casos por ano classificando-a como a quinta neoplasia mais comum no mundo. No Brasil em 2014 foram registrados 32.130 casos (INCA, 2015).

**Tabela 1:** Estimativas para 2014/2015, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos casos novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta	Casos	Taxa bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,2
Traqueia, Brônquio e pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade oral *	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe*	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide*	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,467
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
<b>Todas as neoplasias</b>	<b>302.350</b>	<b>309,53</b>	<b>70.750</b>	<b>334,08</b>	<b>274.230</b>	<b>269,35</b>	<b>81.250</b>	<b>343,85</b>

\* Sítios de câncer de cabeça e pescoço

Fonte: INCA 2015

## 1.2 Câncer de cabeça e pescoço

Segundo Colombo e Rahal (2009), enquadram-se neste grupo de neoplasias os sítios anatômicos: cavidade oral, laringe glótica e supraglótica, glândulas, faringe, cavidade nasal e seios paranasais. De acordo com o INCA (2015), possui maior frequência no sexo masculino com 19.300 novos casos em homens e 12.830 novos casos em mulheres estimados para 2014/2015. Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer de cavidade oral é a quinta neoplasia mais comum em homens e o câncer de Tireoide é a quinta neoplasia mais comum em mulheres em 2012 foi registrado 145 mil óbitos para o câncer de cavidade oral.

O câncer de cabeça e pescoço é histologicamente definido como carcinoma epidermóide prevalente em mais de 90% dos casos. Apresenta-se com uma massa

tumoral com depressão central e bordas endurecidas e elevadas (aspecto crateriforme) (PEDRON 2006).

O tabagismo constitui-se o principal fator de risco, 90% dos indivíduos com câncer de laringe e assoalho de boca são tabagistas. O consumo demasiado de bebida alcoólica eleva em 2 a 6 vezes o risco de desenvolver esta neoplasia, já ambos os fatores atuam em sinergia elevando em 15 vezes o risco com relação a pessoas sem estes vícios (VIEIRA et al., 2012 in MARTINS; MACHADO 2012).

No que se refere à alimentação inadequada, a carência de vitamina A e carotenoides também se associam ao aparecimento desses tumores. A vitamina A atua induzindo a diferenciação em células morfológicamente normais, suprimindo o fenótipo maligno com inibição da proliferação celular e pela melhoria nos mecanismos de defesa do hospedeiro, enquanto o  $\beta$ -caroteno que atua na proteção contra danos produzidos pela radiação (PERES et. al., 2003).

### 1.3 Relação entre TP53 e câncer

O gene TP53, localizado no cromossomo 17p13, codifica uma proteína que atua na repressão do crescimento celular e sinalização da morte celular por apoptose. Mutações de ponto, inserções e deleções nos éxons 5, 8 e 9 estão presentes em 60% dos tumores de cabeça e pescoço. Alguns estudos associam mutações neste gene ao aumento de recorrência dos tumores (EDSTROM, 2001).

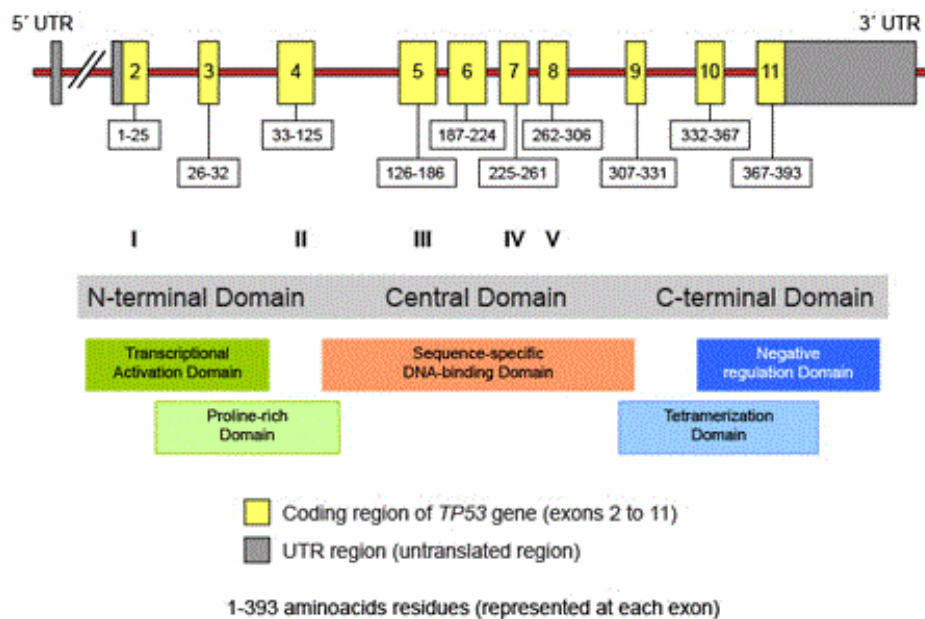
**Figura 1** - Localização cromossômica do gene TP53, indicando sondas para amplificação do gene (**D17s960**: Sonda para domínio de tetramerização; **D17s634**: Sonda antisense)



**Fonte:** Leica Biosystems, 2015

O gene da proteína p53 é formada por 11 exões, sendo o primeiro não codificante. A proteína resultante consiste de 393 aminoácidos divididos em quatro regiões principais. A p53 contém uma região reguladora, que pode ligar-se à porção central da proteína alvo inibindo interações DNA-proteína específica, uma região central, que permite a ligação ao DNA nas regiões reguladoras de genes alvo, um domínio carboxiterminal que contém uma região de tetramerização e um domínio amino-terminal que é o local de ligação da proteína MDM2 (LOYO et al., 2013).

**Figura 2** - Estrutura e organização do gene TP53 e da proteína P53



**Fonte:** St. Jude Children's Research Hospital, 2012

A proteína p53 atua como um fator de transcrição que induz a parada do crescimento celular, senescência e morte celular por apoptose após stress celular. Esta relação se dá pela regulação da transcrição de vários genes alvo, incluindo P21 que atua na progressão do ciclo celular e os genes BAX e PUMA que promovem a apoptose. O stress como resultado de ativação de oncogenes ou perturbações de controle do ciclo celular caracteriza fases iniciais da evolução do tumor. A replicação aberrante de DNA desencadeia uma resposta a danos sofridos no próprio DNA envolvendo ativação da ataxia telangiectasia mutated (ATM) e Serina/treonina proteína quinase 1 e 2 (Chk1 e Chk2) (VOUSDEN; PRIVES, 2009).

Esta resposta dependente de p53 serve para eliminar células tumorais incipientes ou células de outro modo danificadas. Uma grande fração de tumores humanos

carregam mutações pontuais no TP53 que dão origem a substituições de um único aminoácido na proteína p53, como consequência, as células tumorais de transporte de p53 mutantes são capazes de escapar da apoptose e senescência e progredirem para variantes malignas (MULLER; VOUSDEN, 2014).

Mutações no gene TP53 estão associados a 50% de todos os cânceres, estudos de epidemiologia molecular do câncer tem valorizado as análises de mutações deste gene. (GALLO et al, 2004). Mutações de inativação no gene TP53, em especial, emergem como o acontecimento genético dominante, com uma taxa de mutação de 69,8%. A inativação funcional do TP53 também pode ocorrer através de outros mecanismos, incluindo a superexpressão ou amplificação de MDM2, que modula a degradação p53 proteossômica pela ubiquitinação da região carboxiterminal (BROWN ET. al., 2009).

A proteína p53 exerce efeitos funcionais através da interação direta com outras proteínas reguladoras do ciclo celular, mutações *missense*, ao alterarem a estrutura terciária das proteínas p53 podem modificar estas interações e interromper a função das proteínas. Este efeito é conhecido como ganho de função que pode se comportar como uma oncoproteína (MOUNTZIOS; RAMPIAS; PSYRRI 2014) levando a um fenótipo tumoral agressivo com o aumento da metástase.

O TP53 é o gene mais frequentemente mutado no câncer, os elevados níveis de expressão de TP53 mutante *missense* em muitos tumores, e a existência de ganho de função são promotores de tumor, todos fazem p53 um alvo relevante e de intervenção terapêutica no câncer (GAIDDON et al., 2001). Vários estudos têm mostrado que a reconstituição do tipo selvagem p53 em modelo murino induz a regressão tumoral rápida. Estes resultados demonstram que a recuperação de expressão p53 do tipo selvagem é de fato suficiente para a eliminação de tumores, mesmo na presença de outras alterações genéticas associadas. Este é presumivelmente devido ao papel crítico da p53 na resposta celular pró-apoptótica e pró-senescente (BYKOV; WIMAN 2014)

Segundo INCA (2015), no Brasil, são estimados para 2014/2015 cerca de 12.430 novos casos de câncer de cavidade oral e glândula tireoide em homens e 12.060 em mulheres. O câncer de cabeça e pescoço possui a quinta maior incidência no país, porém, cerca de 80% dos tumores são diagnosticados em estágio já avançado. Desta forma, a análise das variantes da proteína p53 associadas com esse tipo de câncer é importante para o estabelecimento de possíveis marcadores que podem ser utilizados no diagnóstico precoce.



O objetivo deste trabalho foi sequenciar o gene TP53 de amostras tumorais de cabeça e pescoço buscando uma maior compreensão do ambiente tumoral para estabelecimento de possíveis marcadores.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de amostras**

As amostras foram fornecidas pelo Hospital de Base do Distrito Federal sob responsabilidade das médicas Ana Carolina Salles e Fabiane Santos Cesário. As amostras de tumor foram coletadas no centro cirúrgico do hospital supracitado e mantidas em tubos contendo RNA Later e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília até seu processamento.

### **2.2 Extração de DNA**

O DNA das amostras foi extraído em até 48 horas após a coleta utilizando um Kit de extração de DNA da Quiagen® QIAamp Blood and Tissue (50) seguindo o protocolo de Extração do fabricante.

### **2.3 Quantificação em gel de agarose e Qubit**

Posteriormente as extrações as amostras foram submetidas a testes identificando a presença do DNA de boa qualidade por corrida em gel de agarose a 0,8% 15 minutos a 90 V e 150 mA. As amostras também foram submetidas à quantificação por Qubit (Invitrogen®).

### **2.4 Avaliação da pureza do DNA**

Resquícios de proteínas podem interferir em uma série de análises, tornando necessária a avaliação da pureza do material genético obtido como parâmetro de qualidade. A pureza da extração de DNA foi analisada pelo aparelho Nanodrop® tendo por princípio a espectrofotometria. O padrão de absorção típico da proteína a 280 nm e determinar a relação entre  $A_{260}/A_{280}$ . A razão ótima entre  $A_{260}/A_{280}$  para o DNA situa-se na faixa de 1,8 a 2,0. A presença de proteínas tende a reduzir esses valores. A razão  $A_{260}/230$  refere-se à concentração de DNA em relação a metabólitos secundários e componentes do tampão consideradas ideias entre 1,8 e 2,2.

## 2.4 Sequenciamento de alto desempenho

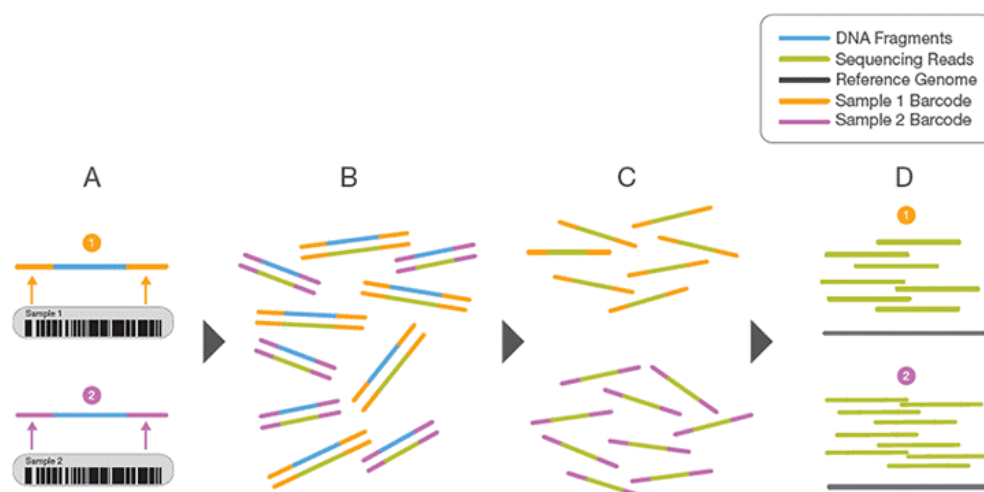
Para o preparo da biblioteca foi necessário 50 ng de DNA, quantificados com Qubit dsDNA BR Assay (Life Technologies®) e com qualidade  $A_{260/280}$  entre 1,8 e 2,0, quantificado no nanodrop.

O preparo da biblioteca foi executado seguindo o protocolo Trusight Enrichment DNA Sample Preparation kit (Illumina®) onde 20  $\mu$ l de DNA genômico de 2,5 ng / mL (50 ng total) foi adicionado a cada poço da placa. Em seguida foi adicionando 25  $\mu$ l do tampão de tagmentação (TD) e 5  $\mu$ l da enzima TED1 e com o auxílio de uma pipeta multicanal, misturou suavemente para cima e para baixo 10 vezes as amostras. A placa foi coberta e centrifugada a 280xg a 20 ° C durante 1 minuto. Logo após a centrifugação a placa foi colocada no termociclador e foi realizada a seguinte programação: 55°C por 5 minutos e posteriormente mantida a 10° C.

Na etapa seguinte a lavagem da tagmentação, foi inserido em cada poço 15  $\mu$ l de tampão ST e misturado suavemente por 10 vezes e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, então foi realizada uma nova centrifugação a280xg por 1 minuto a 20° C, logo após a centrifugação foi transferido todo o conteúdo da placa a uma nova placa limpa em seguida, foi feito a purificação da solução com o uso de beads magnéticas. Após a incubação das beads com DNA, os tubos forma colocados em uma estante magnética para retirada do sobrenadante. Em seguida, foram feitas duas lavagens com etanol 70%. Após a retirada de todo o etanol, o DNA foi ressuspendido em água nuclease free, então, colocou-se novamente a solução na estante magnética, em seguida, retirou-se o sobrenadante e as amostras foram colocadas numa placa de PCR.

Depois foi adicionado um único nucleotídeo de adenina nas extremidades dos fragmentos para que, posteriormente, eles fossem ligados aos adaptadores contendo as regiões indexes (‘código de barra’) e regiões complementares a iniciadores universais de cada amostra. Após a adição dos indexes, uma nova purificação com auxílio de beads magnéticas foi realizada. Posteriormente, foi feito uma PCR dos fragmentos com uso de iniciadores universais que se anelam as sequências dos adaptadores em uma região anterior a sequências indexes. Em seguida, fez-se um gel com o Bioanalyzer chip High Sensitivity Bioanalyzer (Agilent®) para verificar a qualidade da biblioteca.

**Figura 3 - Preparação da Biblioteca (index)**



Em A as amostras de DNA com regiões indexes separadas. Em B todas as amostras são misturadas em um único tubo e são amplificadas com os adaptadores comuns necessários para o cluster do sequenciamento. Em C as amostras estão prontas para análise ilustradas separadas apenas para identificar as amostras diferentes. Em D encontra-se as amostras sequenciadas comparadas com o genoma de referência.

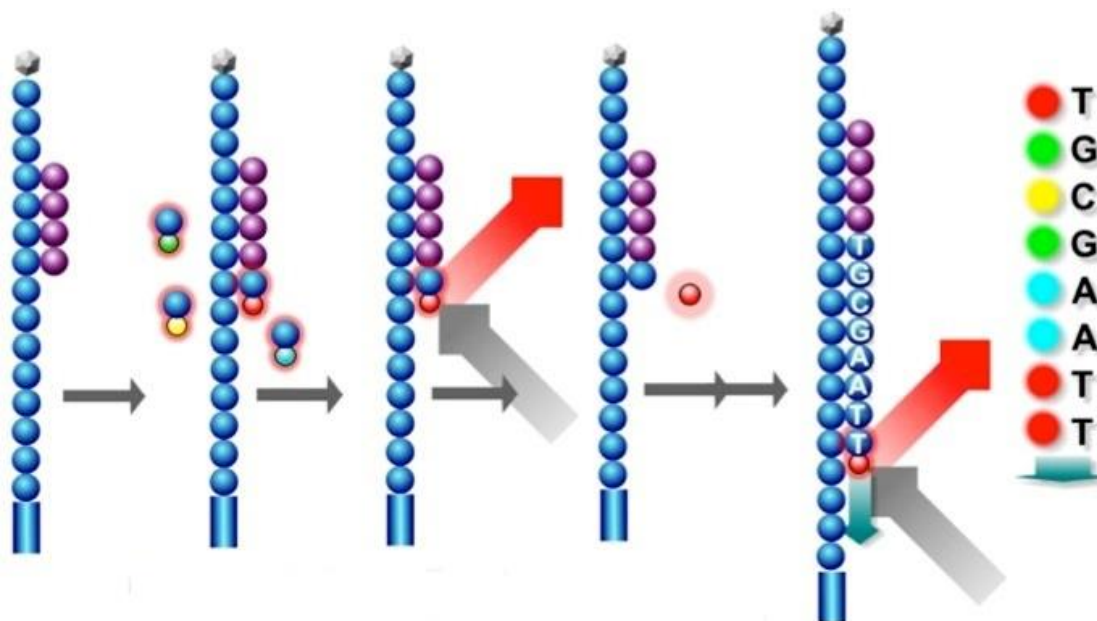
**Fonte:** Illumina®, 2013

Uma vez que as bibliotecas já possuíam as sequências indexes, as mesmas foram agrupadas (187,5 ng de DNA de cada amostra) em um único tubo. Foi feito a captura das regiões de interesse, as quais seguiram de acordo com o protocolo do fabricante (Agilent®). Adicionou-se o mix contendo as sondas da biblioteca de captura para separar as regiões de interesse. Após esta etapa, as amostras foram incubadas por 24 horas a 65 °C. Posteriormente, adicionou-se o mix contendo beads magnéticas de estreptavidina, previamente lavadas, aos tubos com amostras hibridizadas. A captura e as sucessivas lavagens da beads (com dois tampões) se mantiveram a 65 °C para manter a especificidade das sondas. Em seguida, as sondas foram ressuspensas em água nuclease free. Posteriormente, foi feito, uma reação de PCR para amplificar a biblioteca de exoma, visando a realização do sequenciamento.

Por fim a validação da biblioteca para garantir a cobertura estimada do sequenciamento através da quantificação por Qubit dsDNA HS Assay e a verificação do tamanho dos fragmentos com o Bioanalyzer foi feita. Os fragmentos de DNA enriquecidos foram desnaturados com NaOH e diluídos a 8 picomolar (pM). Em seguida, as amostras foram adicionadas à flow-cell de densidade de 800 K clusters/mm<sup>2</sup> e colocadas no sequenciador MiSeq 2000 (Illumina®).

O primeiro desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) é adicionado à reação, a enzima DNA polimerase catalisa a incorporação do dNTP na fita de DNA, se este for complementar à fita molde, cada ligação é acompanhada pela liberação de pirofosfato (PPi) numa quantidade equivalente à quantidade de nucleotídeo aderido a fita. ATP sulfurylase converte o pirofosfato para ATP na presença de adenosina 5' fosfossulfato (APS). A luciferase utiliza este ATP convertendo a luciferina para oxiluciferina, que gera luz visível em quantidades proporcionais à quantidade de ATP. A luz produzida é detectada por um chip e vista como um pico na saída de dados de um software. Cada pico (sinal de luz) é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. Enquanto a reação ocorre, a apirase, uma enzima de degradação de nucleotídeos, continuamente degrada nucleotídeos não incorporados e ATP. Quando a degradação está completa, mais nucleotídeos são adicionados.

**Figura 4 - Sequenciamento**



Sequenciamento de tecnologia por síntese utilizando o método de terminador-base reversível que permite a detecção de bases simples incorporados ao DNA. Um terminador fluorescentemente marcado é visualizada como se cada dNTP é adicionado e depois clivado para permitir a incorporação da base seguinte.

**Fonte:** Illumina®, 2013

## 2.5 Análise dos dados

A partir dos dados obtidos no sequenciamento foi realizada análise de frequência das alterações através do dbSNP e 1000 genomes e seu impacto previsto de acordo com os algoritmos Mutation Taster, Polyphen2 e SIFT.

A ferramenta MutationTaster realiza uma rápida avaliação se alterações na sequência do DNA são um potencial causador de doenças, analisando a conservação evolutiva, perda de funções proteicas, mudanças do sítio de splicing e mudanças que possam afetar a quantidade de mRNA.

O algoritmo Polyphen2 é uma ferramenta utilizada para predição de um possível impacto na substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana. O SIFT prediz se uma substituição de um aminoácido afeta a função de uma proteína utilizando o grau de conservação de resíduos de aminoácidos em um alinhamento de proteínas da mesma família.

### 2.6 Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa foi aprovada com o parecer número 530.346 em 12 de fevereiro de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Católica de Brasília com área temática em genética humana. Sob o título: “Análises genéticas moleculares para busca de indicadores prognóstico no Carcinoma de Cabeça e Pescoço” sob a responsabilidade da pesquisadora Fabiane Kellem Oliveira dos Santos Cesário.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA pela utilização do kit Qiagen® QIAamp DNA Blood Mini Kit foi bastante eficiente (Figura 5). O DNA extraído foi utilizado para o sequenciamento das amostras.

**Figura 5** - Análise em gel de Agarose 0,8% das amostras de DNA extraídas



Primeiro poço sem descrição encontra-se o marcador (Lader 1kb), poços numerados de DF-01 à DF-14 referem-se as amostras de DNA extraídas dos pacientes.

A boa qualidade das amostras extraídas permite uma análise segura dos dados pelo sequenciamento no aparelho Miseq (Illumina) e garante confiabilidade aos resultados. O quadro 1 apresenta a relação de concentração do DNA em relação às proteínas (A260/280) e a razão A260/230 com relação à concentração de DNA e metabólitos secundários e componentes do tampão como fenóis. A razão de absorvância 260 nm e 280 nm é usada para assegurar a pureza de DNA. Uma razão de aproximadamente 1,8 é aceita como “pura” para DNA. Já a razão 260/230 é usada para mensurar a pureza secundária do DNA. É esperado uma razão de 2,0-2,2 para DNA “puro” (WILFINGER et al, 1997). Como mostra o quadro 1, as amostras de DNA de todos os pacientes obtiveram uma razão ótima, tanto para 260/280 (variando de 1,84 a 1,99) quanto para 230/260 (variando de 2,0 a 2,21) confirmando a pureza do material sequenciado.

A determinação exata da concentração das amostras analisadas no aparelho Qubit® (espectrofotômetro) seguindo as recomendações do fabricante encontra-se com concentração entre 33 ng/μl e 213 ng/μl.

**Quadro 1:** Qualidade e concentração das amostras

Paciente	Nanodrop		Qubit
	260/280	260/230	
DF-01	1,97	2,0	213 ng/μl
DF-02	1,84	2,0	33,7 ng/μl
DF-03	1,97	2,15	29,2 ng/μl
DF-04	1,9	2,14	134 ng/μl
DF-05	1,91	2,21	78,8 ng/μl
DF-06	1,89	2,17	81,6 ng/μl
DF-07	1,95	2,1	48,6 ng/μl
DF-08	1,91	2,2	159 ng/μl
DF-09	1,96	2,1	192 ng/μl
DF-10	1,88	2,05	51 ng/μl
DF-11	1,86	2,18	67,2 ng/μl
DF-12	1,94	2,11	66 ng/μl
DF-13	1,9	2,08	168 ng/μl
DF-14	1,99	2,08	90,6 ng/μl

**Primeira coluna:** Identificação dos pacientes; **Segunda coluna:** Razão de absorvância do DNA das amostras extraídas e Proteínas **Terceira coluna:** Razão de absorvância do DNA e componentes do tampão; **Quarta coluna:** Quantificação por Qubit espectrofotômetro das amostras extraídas.

O quadro 2 apresenta os dados clínicos dos 14 pacientes selecionados identificando idade em anos, sexo, sendo M para masculino e F para feminino, hábitos de fumar e/ou beber definidos como sim em caso afirmativo, não caso negativo e Ex se o indivíduo abandonou o hábito. QT definido como quimioterapia, RXT como radioterapia e localização identificando a localização primária do tumor.

Foram selecionados pacientes entre 31 e 70 anos com média de idade de 56,2 anos e mediana de 60,5 sem distinção entre os sexos. Quanto à localização primária do tumor foi evidenciado cervical direita, tireóide, orofaringe, glote e infra glote, boca, parótida, prega vocal, cervical anterior, língua, amígdala esquerda, base de língua e mandíbula. Apenas 2 dos 14 pacientes iniciaram a radioterapia, enquanto que a quimioterapia foi adotada a um único paciente, até o presente momento, não há paciente executando ambos os tratamentos

**Quadro 2:** Dados Clínicos

Identificação	Idade	Sexo	Tabagista	Etilista	QT	RXT	Localização
DF-01	53	M	Não	Não	Não	Não	Cervical direita
DF-02	58	M	**	**	**	**	Tireóide
DF-03	33	F	Ex	Social	Não	Não	Orofaringe
DF-04	70	M	Sim	Ex	**	**	Orofaringe
DF-05	63	M	Sim	Não	**	**	Glote e Infra glote
DF-06	65	M	Não	Ex*	**	**	Boca
DF-07	65	F	**	**	**	**	**
DF-08	59	M	Sim	Sim	Não	Sim	Prega vocal direita
DF-09	65	F	Sim	Não	Não	Sim	Pele e Parótida
DF-10	51	F	Não	Sim	**	**	Cervical anterior
DF-11	63	M	Sim	Ex	**	**	Língua/Amígdala esquerda
DF-12	62	M	Ex	Sim	**	**	Parótida
DF-13	31	F	Não	Não	Não	Não	Base de Língua
DF-14	49	F	Não	Não	Sim	Não	Cervical anterior e Mandibular

**Primeira coluna:** Identificação dos pacientes; **Segunda coluna:** Idade dos pacientes (em anos) **Terceira coluna:** sexo dos pacientes (M para masculino e F para feminino); **Quarta coluna:** Informação fornecida pelo paciente quanto ao consumo de cigarros (SIM para caso afirmativo, NÃO para caso negativo e EX se paciente abandonou o hábito) **Quinta coluna:** Informação fornecida pelo paciente quanto ao consumo de bebidas alcólicas (SIM para caso afirmativo, NÃO para caso negativo, EX se paciente abandonou o hábito e Social com consumo moderado) **Sexta coluna:** Paciente submetido a quimioterapia (SIM para caso afirmativo, NÃO para caso negativo) **Sétima coluna:** Paciente submetido a radioterapia (SIM para caso afirmativo, NÃO para caso negativo) **Oitava coluna:** Localização primária do tumor. (\*ex etilista há 8 meses; \*\*Dados não informados)

O genoma de 20 pacientes, onde 14 apresentaram alguma variante para o gene TP53 foi sequenciado. Todos os pacientes listados no quadro 3 são heterozigotos para o gene em questão e possuem uma ou mais mutações em região de éxons. As mutações observadas foram: mutação silenciosa (mudança em um nucleotídeo sem alteração do aminoácido), mutação *missense* (mudança em um nucleotídeo com mudança de aminoácido), mutação *nonsense* (mutação com inserção de códon de parada, produz proteína truncada) e mutação *frameshift* (inserção ou deleção de aminoácido, podendo levar a alteração drástica da proteína).

**Quadro 3:** Variantes encontradas

Paciente	Id SNP	Variante	Genótipo	Éxon	Códon	Tipo de Mutação	AA
DF-01	Não encontrado	ctT/ctC	Het	Sim	194	Silenciosa <sup>1</sup>	L
	Não encontrado	cGc/cAc	Het	Sim	156	Missense <sup>2</sup>	R->H
	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
	rs1800370	ccG/ccA	Het	Sim	36	Silenciosa	P
DF-02	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-03	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-04	Não encontrado	cGc/cCc	Het	Sim	283	Missense	R->P
DF-05	Não encontrado	TCGAA/T	Het	Sim		Frameshift <sup>3</sup>	
	Não encontrado	gTg/gGg	Het	Sim	218	Missense	V->G
	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-06	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-07	rs28934578	cGc/cAc	Het	Sim	175	Missense	R->H
	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-08	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-09	Não encontrado	Cga/Tga	Het	Sim	342	Nonsense <sup>4</sup>	R->*
	Não encontrado	ttC/ttT	Het	Sim	341	Silenciosa	F
	Não encontrado	Gaa/Taa	Het	Sim	286	Nonsense	E->*
	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
	rs1800370	ccG/ccA	Het	Sim	36	Silenciosa	P
DF-10	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-11	Não encontrado	cTt/cGt	Het	Sim	194	Missense	L->R
	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-12	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R
DF-13	rs1800371	Ccg/Tcg	Het	Sim	47	Missense	P->S
DF-14	rs1042522	cCc/cGc	Het	Sim	72	Missense	P->R

**Primeira coluna:** Identificação dos pacientes; **Segunda coluna:** Id SNP **Terceira coluna:** Variante descrita em seu códon de leitura; **Quarta coluna:** Genótipo (HET para heterozigoto e HOM para



homozigoto); **Quinta coluna:** Localização da variante no gene. (SIM para região de éxon e NÃO para demais regiões); **Sexta coluna:** Número do códon refere-se ao aminoácido da proteína; **Sétima coluna:** Tipo de mutação **Oitava coluna:** Aminoácido resultante posterior a seta e \* definido como término da produção da proteína.

<sup>1</sup>**Silenciosa:** Alteração do nucleotídeo mantém o mesmo aminoácido formado no códon de leitura;

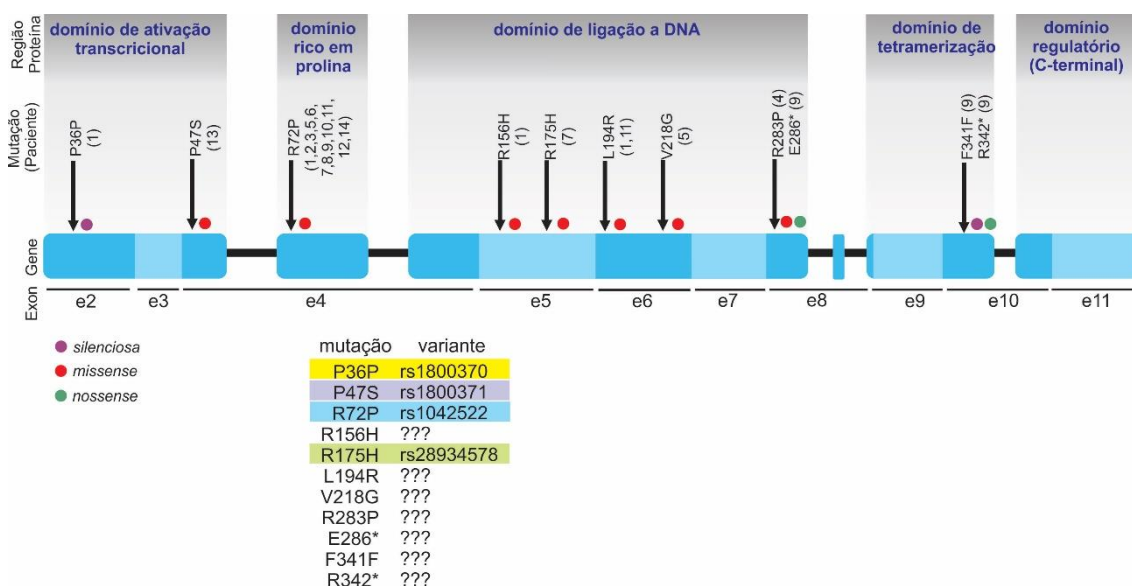
<sup>2</sup>**Missense:** A alteração do nucleotídeo fornece um aminoácido diferente da proteína selvagem;

<sup>3</sup>**Frameshift:** Inserção ou a deleção de nucleotídeos (em número não múltiplo de 3), perturbando a matriz de leitura, modificando toda sequência de códon a partir da mutação e resultando em um produto gênico completamente diferente do original;

<sup>4</sup>**Nonsense:** Mutação de nucleotídeo que ocasiona em um stop códon.

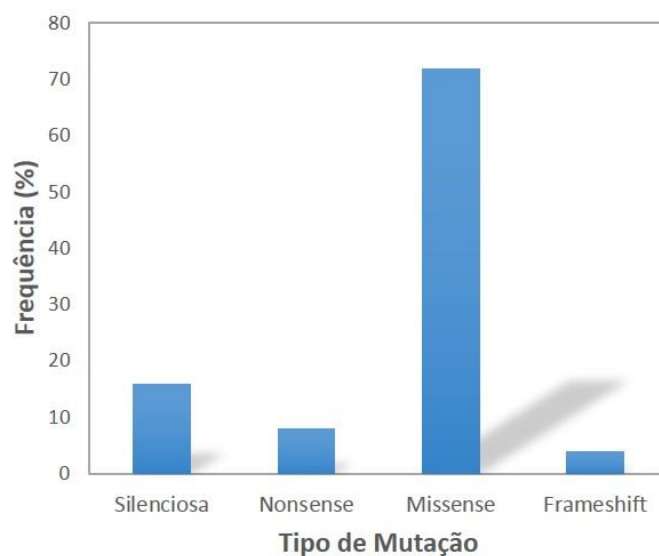
Quatro (n=4) variantes descritas na literatura: rs1800370 (n=1), rs1800371 (n=1), rs1042522 (n=12) e rs28934578 (n=1) e sete sem descrição (Quadro 3 e Figura 6) foram identificadas. Dentre os tipos de mutação a que apresentou a maior frequência entre os pacientes foi a mutação *missense* (12 pacientes – Figura 7) o que sugere que proteínas com ganho de função é um fator comum neste tipo de neoplasia (HOBLES; HARRIS, 2010).

**Figura 6** – Variantes do gene TP53 encontrados em pacientes com câncer de cabeça e pescoço



Na figura estão representadas todas as mutações encontradas por meio do sequenciamento de alto desempenho. As mutações estão representadas de forma a indicar o códon mutado e o aminoácido modificado (Ex.: P47S, mutação no códon 47 com substituição de Prolina por uma Serina).

**Figura 7** – Frequência dos tipos de mutações encontradas



Além disso, três mutações silenciosas em quatro pacientes foram observadas, sendo a única mutação já descrita em literatura comum a dois pacientes, encontrada no éxon 4 códon 36 (P36P/rs1800370). Os outros 2 pacientes possuem mutação no éxon 6 códon 194 (L194R) e éxon 10 códon 341 (F341F) ambas sem descrição na literatura.

Dos pacientes listados a maior parte (n=12) apresentaram a mutação *missense* no éxon 4 códon 72 (R72P/rs1042522). Esse polimorfismo codifica um aminoácido básico, a arginina, no lugar de um aminoácido neutro apolar: prolina.

O polimorfismo no códon 72 Arg/Pro da proteína p53 é um polimorfismo funcional cuja distribuição fenotípica é significativamente diferente entre as etnias. A sua associação com o câncer de cabeça e pescoço é ainda controversa. Contudo, diversos trabalhos têm demonstrado a relação direta desse tipo de polimorfismo com o câncer de cabeça e pescoço, principalmente associado ao HPV (MOJTAHEDI et al, 2010; LOEB et al, 2012). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que pacientes com essa variante possuem maior suscetibilidade a degradação da p53 pela proteína E6 do HPV, especialmente associado ao tabagismo e ao etilismo (JIRA, et al, 2013; YANG, et al, 2013)

Com exceção dos pacientes 6, 10 e 14 todos os pacientes que apresentaram a variante rs1042522 foram ou são tabagistas, demonstrando que o tabagismo é um fator importante para a expressão desse polimorfismo.

O paciente 7, além de apresentar a variante rs1042522, também apresentou a variante rs28934578. Essa variante origina-se de uma mutação no éxon 5 que leva a substituição de uma arginina por uma histidina no códon 175 (R175H). Essa mutação

resulta na mudança estrutural da proteína p53 podendo comprometer a sua função. Alguns estudos têm associado essa variante com a incidência de câncer de mama (HOLLSTEIN et al, 1991; DAMINENI et al, 2014).

O paciente 13 apresentou apenas o polimorfismo rs1800371, mutação *missense* com substituição de prolina por serina no códon 47 éxon 4 (P47S). Esse paciente se declarou como não tabagista e não etilista. Muitos estudos mostraram que esse polimorfismo parece ser um fator de risco para diversos tipos de câncer e muitas outras doenças. LI et al (2005) observaram que o polimorfismo rs1800371 pode ter um papel importante no risco de câncer, progressão e eficácia da terapia enquanto que LEITE et al (2006) mostraram que pacientes transplantados renais com esse tipo de mutação eram suscetíveis a infecção pelo vírus herpes tipo 6 (HHV6) e tipo 1 (HHV1).

Além disso, mutações *missense* nos éxons 5 (R156H), 6 (194R) e 8 (R283P e E286\*) ainda não descritas na literatura foram identificadas que condizem com os achados de EDSTROM (2001) que afirma que mutações de ponto, inserções e deleções nestes éxons estão presentes em cerca de 60% dos tumores de cabeça e pescoço. A mutação R156H tem sido associada a carcinoma (mama), glioma e neoplasias hematopoiéticas (DONE, et al, 1998; SUZUKI et al, 2004; GAD et al, 2007)

Em um único paciente foram evidenciadas duas mutações *nonsense*, mutação que introduz um *stop códon* (códon de parada), uma no domínio central da proteína e outra no domínio carboxiterminal indicando a produção de uma proteína truncada.

As mutações *missense* não descritas na literatura presentes no domínio central da proteína, ou seja em áreas de contato direto de DNA, resultam na progressão tumoral acelerado e reduzem a capacidade de resposta terapêutica dos tumores de cabeça e pescoço (HOBLES & HARRIS, 2010).

#### **4. CONCLUSÃO**

Tabagismo e etilismo constituem principal fator de risco para este tipo de neoplasia e atuam em sinergia Tumores de cabeça e pescoço possuem maior incidência após os 50 anos de idade, porém o número de adultos jovens com câncer de orofaringe, amígdala e base de língua vem crescendo, parte desse aumento pode ser por mudanças no comportamento sexual relacionado à infecção pelo vírus HPV. Outro fator que pode ser associado ao aumento dos tumores associados ao HPV é a variante rs1042522 que possui maior suscetibilidade a degradação da proteína pela proteína E6 do vírus.

Mutação *missense* (levando a expressão de uma proteína p53 mutante) na linha germinativa têm um início cancro significativamente mais cedo do que os pacientes com mutações em TP53 , que resultam na perda de expressão da proteína p53 por conferir ganho de função a proteína.

O uso do sequenciamento de alto desempenho do genoma tumoral e análise mutacional são ferramentas que auxiliam na compreensão da carcinogênese e devem auxiliar no diagnóstico e tratamento dos pacientes. Esses achados demonstraram um importante papel da mutação de p53 no câncer de cabeça e pescoço e seu uso potencial como marcador molecular para diagnóstico.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular aspects of medicine**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dez. 2000.
- BROWN, CJ et al. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. **Nature Review Cancer**, Londres, v.9, n.12, p. 862–873, Dez. 2009.
- BYKOV, V.J.N; WIMAN, K.G. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. **Febs Letters**, Amsterdam, v.588, n. 16, p.2622-2627, Ago. 2014.
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.55, n.2, p.165-174, abr. 2009
- DAMINENI, S. et al. Germline mutations of TP53 gene in breast cancer. **Tumor Biology**, Van Godewijckstraat, v. 35, n. 9, p. 9219-9227, Set. 2014.
- DE BERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 11-20, jan. 2008.
- DONE, S. J. et al. p53 mutations in mammary ductal carcinoma in situ but not in epithelial hyperplasias. **Cancer research**, Madison v. 58, n. 4, p. 785-789, fev. 1998.
- EDSTROM, S. et al. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. **The Laryngoscope**, Boston, v. 111, n. 1, p. 124-130, jan. 2001.
- GAD, S. et al. Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1 $\beta$  gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. **British journal of cancer**, London, v. 96, n. 2, p. 336-340, nov. 2007.
- GAIDDON et al. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. **Molecular Cellular Biology**, Washington, v. 21, n.5 p.1874–1887. Mar. 2001.
- GALLO, C.V.M. et al, Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: uma associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.2, p.167-175, Jun. 2004.
- HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49-53, 1991.
- INCA. **Estimativa2014**. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014 disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>> acesso em: 18 abr. de 2015

JIRA, C., et al. Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16 (rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) Genes in Thai Cervical Cancer Patients with HPV 16 Infection. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v.14, n.1, p.341-346, Jan. 2013.

KOSTARELI, E. et al. HPV-related methylation signature predicts survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Journal of Clinical Invest**, London, v.123, n.6, p 2488-2501, Jun. 2013.

LEITE, J. L. et al. Polymorphisms at exon 4 of p53 and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients. **Transplant international**, Vienna, v. 19, n. 9, p. 732-737, jun. 2006.

LEWIS, R. **Genética Humana – conceitos e aplicações**. 5 Ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004

LI, X. et al. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. **Journal of Biological Chemistry**, Hong Kong, v. 280, n. 25, p. 24245-24251, abr. 2005.

LOEB, K. R. et al. Analysis of Tp53 codon 72 polymorphisms, Tp53 mutations, and HPV infection in cutaneous squamous cell carcinomas. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e34422, abr. 2012.

LOYO MD., et al, Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. **Head & Neck**, New York, v.35, n.3, p.454-463, Mar 2013.

MARTINS, C.; MACHADO, I. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: VIEIRA, S.C. et al. **Oncologia Básica**. 1 Ed. Teresina: Fundação Quixote.2012. p.9-23.

MOUNTZIOS G; RAMPIAS T; PSYRRI A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. **Annals of oncology**, Oxford, v.25, n.10, p.1889-1900, abr. 2014.

MOJTAHEDI, Z. et al. p53 codon 72 polymorphism association with head and neck squamous cell carcinoma. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 316-320, maio/jun. 2010.

MULLER, P.A.; VOUSDEN, K.H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer Cell**, Cambridge, v.25, n.1, p.304–317, mar. 2014

NEWS.MED.BR, 2014. **OMS lança o World Cancer Report 2014: a batalha contra o câncer não será vencida apenas com o tratamento**. Disponível em: <<http://www.news.med.br/p/saude/520472/oms-lanca-o-world-cancer-report-2014-a-batalha-contra-o-cancer-nao-sera-vencida-apenas-com-o-tratamento.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2014;

PARSA, N. Environmental factors inducing human cancers. **Iranian journal of public health**, Teerã v. 41, n. 11, p. 1-9, nov. 2012.

PASQUALUCCI, L. et al. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. **Blood**, New York, v. 104, n. 10, p. 3318-3325, ago 2004.

PEDRON, I.G, et al. Carcinoma Epidermóide: Diagnóstico e condutas imediatas. **Revista Instituto Ciências da Saúde**; São Paulo, v. 24, n.3, p-237-24,1 jul./set. 2006.

PERES, W.A.F, et al. Atuação da vitamina A e carotenoides na hepatocarcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.49, n.2, p.113-120, abr. 2003.

ROBLES, A.I.; HARRIS, C. C. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, New York v. 2, n. 3, p. 01-15, mar 2011.

SUZUKI, S. et al. Relationship between genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and NAT2), drinking habits, histological subtypes, and p53 gene point mutations in Japanese patients with gastric cancer. **Journal of gastroenterology**, Baltimore, v. 39, n. 3, p. 220-230, mar 2004.

VOUSDEN, K.H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, Cambridge, v.137 n.3, p.413-431, Maio 2009.

WILFINGER, W. W.; MACKAY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**, New York, v. 22, n. 3, p. 474-6, 478-481, Mar 1997.

YANG G, et al. Association of p53 and MDM2 polymorphisms with risk of human papillomavirus (HPV)-related esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **The international journal of Cancer Epidemiology, detection and prevention**. New York, v.37, n.5, p.629-633, Jul. 2013.