
PROTEÍNA P53

E O CâNCER:

CONTROVÉRSIAS

E ESPERANÇAS

JALSI TACON ARRUDA, **BÁRBARA MARIOTTO BORDIN**,
LANA CRISTINA BUENO MIRANDA, DÉBORA LEMOS MALDI
MAIA, **KATIA KARINA VEROLLI DE OLIVEIRA MOURA**

Resumo: um importante instrumento no estudo do câncer são os recentes avanços da biologia molecular, que trouxe como um de seus principais elementos o gene supressor de tumor p53, ao qual é atribuído um papel significativo na carcinogênese, por possuir como principal função a preservação da integridade do genoma. A interação da p53 com a proteína viral E6 do HPV (Papiloma Vírus Humano) resulta na sua rápida degradação e perda da função. A relação entre a proteína p53 e a carcinogênese tem sido amplamente comprovada através do elevado índice de mutações encontradas em tumores malignos de diferentes tecidos. O objetivo desta revisão é apresentar uma análise dos conhecimentos atuais sobre o papel do gene p53 e sua relação com o câncer, para uma possível utilização clínica como elemento potencializador dos efeitos da terapia adjuvante com valor prognóstico.

Palavras-chave: gene p53, carcinogênese, LOH, polimorfismo e HPV

Nos últimos anos, houve grandes avanços nas ciências biológicas, graças ao desenvolvimento de novas técnicas para investigação da biologia molecular. Estas técnicas permitiram o conhecimento e a definição dos meca-

nismos moleculares e das estruturas responsáveis por processos celulares complexos, como, por exemplo, o câncer, que envolve danos genéticos, particularmente nos genes que regulam o ciclo celular, a estabilidade do DNA e a morte programada da célula (GRIFFITHS et al., 1998). Desde então, uma vasta literatura tem sido criada visando definir melhor o papel dos genes relacionados ao câncer, permitindo uma maior compreensão das alterações genéticas associadas as transformações do câncer. O início e a progressão de uma neoplasia é um processo de múltiplas etapas e envolve o acúmulo de alterações genéticas nas células. A visão atual é a de que os tumores surgem através de um processo no qual ocorrem as mutações somáticas de genes celulares, seguidas de uma seleção clonal da progênie variante com propriedades de crescimento agressivo. Estas alterações consistem na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor e parece que ambas são necessárias para um fenótipo neoplásico completo (LEWIN, 2000). Cerca de mais da metade (70%) dos cânceres humanos possuem principalmente uma deficiência na função do gene *p53*. As novas pesquisas relacionadas a esse gene podem auxiliar no desenvolvimento de uma possível utilização clínica, como elemento potencializador dos efeitos da terapia adjuvante com grande valor prognóstico.

ESTRUTURA DO GENE *p53* E SUA PROTEÍNA

O gene supressor de tumor *p53* está situado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 KiloDaltons (kDa), denominada *p53* em consequência do seu peso molecular. Esse gene possui 20 Kb e é composto por 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante, e altamente conservado, apresentando homologia estrutural entre diferentes espécies (ALMEIDA et al. 1999).

A proteína *p53* é constituída por 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína. O primeiro, chamado de domínio de transativação, está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal). Está compreendido entre os aminoácidos 28 e 42 e é responsável por regular a expressão de genes que atuam na parada do ciclo celular e na rota de apoptose. Na região central

existem quatro domínios de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 102 e 292, que possibilitam a ligação de p53 em sítios específicos do DNA. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal), existem dois domínios: o domínio de tetramerização, que se situa entre os aminoácidos 319 a 360, responsável pela formação de tetrâmeros de p53, que é a forma mais ativa (selvagem ou *wild-type*) em transativação; o domínio regulatório, que se situa entre os aminoácidos 364 a 393, cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (SILVA; AMARAL; CRUZ, 2003).

Uma vez ativada por fosforilação na extremidade N-terminal, a p53 não é capaz de ligar-se ao DNA de maneira específica. A ligação não-específica é causada pela ligação da extremidade C-terminal com o domínio central, bloqueando este domínio que pode ser revertido. Assim, a proteína p53 pode se ligar de maneira específica ao DNA, agindo como fator de transcrição. Essa ativação da proteína por fosforilação ou acetilação ainda é controversa, mas a modificação de p53 faz com que essa proteína possa atuar como fator de transcrição através da ligação em sequências específicas, promovendo a transativação *downstream* de genes alvos.

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo então referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (LANE; CRAWFORD, 1979). Sob condições fisiológicas normais, apresenta uma meia vida muito curta, calculada em seis minutos, tornando difícil sua detecção em razão da rápida degradação, o que não ocorre com o acúmulo da forma mutada no núcleo da célula, podendo ser facilmente detectada por técnicas de imuno-histoquímica, *Western blot*, ou por citometria de fluxo.

FUNÇÃO

O termo “guardião do genoma”, atribuído a proteína p53, é decorrente da sua função como “policia molecular”, por monitorar a integridade do genoma. Atua como um sensor de danos no DNA e auxilia o sistema de reparo, utilizando os momentos de *checkpoints* para paralisar o ciclo celular ou induzir a apoptose,

previnindo, assim, que ocorra o proliferação de células com o DNA mutado (LEVINE; MOMAND; FINALY, 1991). Durante o ciclo de divisão celular, a p53 faz uma verificação se há eventual ocorrência de mutações na sequência do genoma, em consequência de uma replicação defeituosa do DNA. No caso de lesões por agentes físicos, químicos ou biológicos, é função da p53, através de uma cascata de reações, impedir que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular. Assim dois caminhos podem ser seguidos: a correção da mutação através da ativação da proteína de reparo ou a indução a apoptose (RIVOIRE *et al.*, 2001).

O dano ao DNA desencadeia rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da fosforilação da proteína. Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a super expressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA. No início do ciclo mitótico, o gene *p53* ativa transcricionalmente o gene *p21*, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*), que atua corrigindo a lesão no DNA. Caso a lesão seja extensa, a p53 ativa genes envolvidos no mecanismo de apoptose, suprimindo a ação de genes com ação antiapoptótica.

Nas células que apresentam o gene *p53* mutado e inativação da proteína p53, não ocorre a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA (CAVALCANTI JÚNIOR; KLUMB; MAIA, 2002). Essas células geneticamente instáveis tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica.

CONTROLE DA EXPRESSÃO DE p53

Pelo papel que a proteína p53 desempenha e por se tratar de uma molécula com potencial para causar importantes alterações

na célula, a concentração de p53 bem como suas atividades são reguladas e mantidas sob um rígido controle. Um dos processos para manter os níveis de p53 baixos é a degradação dessa proteína. Nesse contexto o oncogene *MDM2* (*Mouse Double Minute 2*) é importante, pois codifica uma proteína de mesmo nome e é um gene ativado por p53. A proteína MDM2 se associa ao domínio de transativação de p53, inibindo sua transcrição regulatória funcional, o que diminui a indução da apoptose e a parada do ciclo celular. Também é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, onde é degradada por uma via de ubiquitinação.

O transporte do complexo MDM2/p53 do núcleo para o citoplasma é mediado por proteínas exportinas que se ligam à MDM2 expondo o p53 a ubiquitinação e a complexos proteolíticos que, no final de suas ações, favorecem o controle negativo de p53. Assim, MDM2 atua como uma E3-ubiquitina-ligase, a qual se liga nos domínios de transativação da proteína e transporta p53 para o citoplasma onde é degradada (FERNANDES *et al.*, 2002). Essa regulação negativa da proteína p53, exercida pela proteína MDM2, pode ser neutralizada pela ação do produto de um gene supressor de tumor denominado *p14^{ARF}* (*ARF Alternative Reading Frame*) que é capaz de se ligar à proteína MDM2 e impedir qualquer ligação a p53. A proteína *p14^{ARF}* também pode degradar a MDM2 causando a liberação de p53 do complexo no núcleo (NYLANDER; DABEISTEEN; HALL, 2000).

A proteína p53 possui sinais de localização nuclear, chamados NLS (*Nuclear Localisation Signals*), os quais na maioria, se localizam na extremidade C-terminal, permitindo a sua entrada no núcleo. Recentemente foi demonstrada a existência de um sinal de exportação nuclear, denominado NES (*Nuclear Export Signal*), na extremidade C-terminal, no domínio de tetramerização da proteína. Quando a p53 está em forma de tetrâmero, o NES fica inacessível às exportinas, mas se a p53 se encontrar no estágio de dímero ou monômero, as exportinas podem se ligar a NES e a p53 poderá ser lançada para o citoplasma independentemente de MDM2. O acúmulo de p53 selvagem pode refletir uma resposta ao dano persistente do DNA pela atividade de carcinógenos, o que pode suportar as observações de que a super expressão de p53 é um indicador de transformação maligna (GARAY *et al.*, 2003).

PERÇA DA FUNÇÃO

A perda da função da proteína p53 pode ocorrer pelas seguintes situações: por alteração genética; por interação da proteína p53 com proteínas virais; e por interação da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular. As alterações genéticas podem ser: mutação pontual (*Missense*), deleção gênica (*Non Sense*) de um ou dois alelos do gene *p53* e inserção de nucleotídeos na sequência de DNA. Mutação pontual é a troca de um nucleotídeo, e é o tipo de mutação do gene *p53* mais frequentemente encontrado nas neoplasias. Essas mutações ocorrem principalmente entre os códons 120 e 290, situados entre os éxons 5 e 9, considerados sítios quentes (*hot spots*) de mutação, e resultam na transcrição de uma proteína não funcional (LUMB; CAVALCANTI JUNIOR, 2002). A deleção gênica, por sua vez, pode levar à transcrição de um códon de parada prematuro da proteína.

Uma mutação no gene *p53*, seja pontual ou não, altera de forma significativa a proteína p53, o que resulta na incapacidade de efetuar a parada do ciclo celular ou disparar o mecanismo de apoptose. As formas mutadas da proteína apresentam ainda a capacidade de interagir com a proteína selvagem, impedindo a supressão tumoral. Este fenômeno é conhecido como “efeito dominante negativo”, visto que a mutação de um dos alelos do gene *p53* produz o que parece ser um efeito dominante sobre o alelo normal restante (LEMONS, 1995).

A síndrome de Li-Fraumeni é uma rara síndrome autossômica dominante, caracterizada por mutações herdadas que ocorrem na linhagem germinativa do gene *p53* e por um fenótipo clínico de múltiplas neoplasias primárias (LI; FRAUMENI, 1969). É uma síndrome de predisposição ao câncer e os portadores possuem uma probabilidade de vinte e cinco vezes mais chances de desenvolver vários tipos de tumores malignos (FELIX, NAU, TAKAHASHI, 1992; PINTO *et al.*, 2002).

HETEROZIGOSIDADE DE *p53*

A perda somática de um alelo de um gene supressor de tumor envolve frequentemente a perda do material cromossômico, vari-

ando em extensão desde algumas centenas de pares de bases a uma sub-banda ou até ao cromossomo completo. Estes eventos são chamados de perda de heterozigosidade (LOH *Loss Of Heterozygosity*), que consiste na comparação de *loci* polimórficos do DNA extraído de um tecido normal e de um tumoral do mesmo indivíduo (OSBORNE; HAM SHERE, 2000). A análise de LOH já identificou várias regiões cromossômicas com perdas em tumores, processo fundamental na carcinogênese. A maioria das LOH é resultante da instabilidade genética e está associada ao fenótipo maligno em razão das mutações ou deleções adicionais no alelo normal, sendo então necessárias à inativação ambos os alelos (FERRERAS *et al.*, 2001).

Esta perda de heterozigosidade do cromossomo 17, detectada pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), mostra o *locus* do gene *p53* provando sua inativação. É um fenômeno que ocorre em aproximadamente 80% das lesões com mutações de *p53*, estabelecendo uma frequência de LOH em 50% dos tumores (LEVINE; MOMAND, 1990). A predisposição individual está relacionada à alta probabilidade de ocorrer uma inativação somática adicional do alelo *p53* normal, seja por rearranjo cromossômico ou por mutações de ponto em uma das células do indivíduo (BROOKES, 1999).

POLIMORFISMO DE *p53*

À medida que as seqüências nucleotídicas do genoma humano foram sendo desvendadas, uma constatação evidente foi a do grande número de variações de ponto encontradas, ao se comparar segmentos correspondentes do genoma. Comumente estas mutações que ocorrem a cada 600 bases, aproximadamente, são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs (*Single Nucleotids Polimorphisms*) e correspondem a posições em que existe uma alternância dos nucleotídeos em uma frequência alélica mínima de 1% (GUIMARÃES; COSTA, 2002). Os SNPs podem promover *splicing* alternativo, alterando o padrão ou a expressão de genes quando ocorrem em seqüências de promotores, gerando ou suprimindo códon de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e causando, assim, alterações na iniciação da tradução (KWOK; GU, 1999).

Quando essas mutações ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações futuras e se fixam na população em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismo (HAHN; WEIBERG, 2002).

Os HPVs são vírus da família *Papovaviridae*, com mais de cem tipos identificados, e correspondem a um adenovírus, com DNA circular, capaz de infectar os humanos. O ciclo produtivo de todos os papilomavírus está acoplado à diferenciação celular epitelial. Tais células exibem morfológicamente a coilcitose (do grego *Koilos* – cavidade), mitoses anormais, aneuploidias e alterações na estrutura do cromossomo. Porém, essas células só passam a ser tumorigênicas quando são expostas a oncogenes celulares ativados.

A replicação do genoma do HPV tem origem numa região denominada Longa Região de Controle (LCR *Long Control Region*). Essa região é regulada pelo produto do gene *E2*, a proteína *E2*, e por proteínas celulares. Como a entrada do genoma viral no hospedeiro se dá através da linearização do DNA circular do vírus e posterior inserção no genoma, esse mecanismo faz com que o genoma viral perca o gene *E2*, havendo uma super expressão dos genes virais, com o aumento das proteínas *E6* e *E7*, responsáveis pelo estímulo da proliferação e transformação celular. A proteína *E6* recruta a proteína celular *E6-AP* (*E6 Associated Oncoprotein*), que funciona como uma *E3-ubiquitina-ligase*, para o complexo que contém a proteína *p53*. Este recrutamento resulta na ubiquitinação de *p53* e é seguido por sua rápida degradação. A ubiquitinação é uma evidência experimental que sugere a degradação de caspases via ubiquitina-proteassoma (SOUVINOS; RIZOS; SPANDIDOS, 2001). Sem a proteína *p53*, a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA. Assim, aumenta a frequência das mutações, e esse acúmulo é a causa subjacente desenvolvimento de neoplasias. A oncogenicidade depende do grau de afinidade entre as proteínas do gene supressor de tumor *p53* e a viral *E6*.

No polimorfismo do gene *p53* (tipo selvagem), no códon 72 do éxon 4, pode ocorrer uma prolina (CCC, *p53Pro*) ou uma arginina (CGC, *p53Arg*). A degradação da proteína *p53* mediada pela proteína viral *E6* tem sido proposta por vários autores como fator de risco para o desenvolvimento de câncer, principalmente cervical, associado ao HPV. Análises *in vitro* indicam que a pro-

teína E6 de HPVs de alto risco (16, 18 e 31 – lesões malignas) causa a rápida degradação da p53, ao contrário dos HPVs de baixo risco (6 e 11 – lesões benignas), e que possuam o alelo arginina, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de carcinomas cervicais invasivos (LO *et al.*, 1992).

As isoformas do gene *p53*, para a posição 72, têm sido avaliadas na tentativa de determinar seu papel e sua importância no desenvolvimento de vários tumores associados com infecções pelo HPV. O genótipo Arg/Arg versus Arg/Pro ou Pro/Pro para o códon 72 do gene *p53* tem sido considerado um importante fator de risco para as neoplasias cervicais. No entanto, percebe-se que existem controvérsias quanto aos resultados.

Em 1992, as pesquisas realizadas por Lo *et al.* (1992) e Storey (1998), mostram que a mutação do gene *p53* não é um acontecimento comum no câncer cervical, ocorrendo em 3 dos 14 casos estudados pelos autores. Os estudos realizados por Storey *et al.* (1998) e Zehbe *et al.* (1999) indicam uma elevada ocorrência do genótipo p53Arg/Arg em pacientes com câncer cervical associado ao HPV, quando comparados com uma população normal. Relatam que o genótipo homozigoto p53Arg/Arg é até 7 vezes mais susceptível ao desenvolvimento de câncer do que o genótipo heterozigoto p53Arg/Pro em pacientes com tumores cervicais associados ao HPV, sendo que o genótipo homozigoto p53Pro/Pro teria uma menor predominância neste tipo de câncer. Os resultados indicam que a proteína viral E6 dos HPVs 16 e 18 degrada com mais eficiência o genótipo p53Arg/Arg, com uma frequência de 73%, 24% do genótipo p53Arg/Pro e 3% do genótipo p53Pro/Pro *in vivo*. Por outro lado, a proteína viral E6 de HPV 11 é menos ativa para p53Arg/Arg e inativa para p53Pro/Pro, evidenciando que o polimorfismo do códon 72 de *p53* possivelmente estaria implicando no precoce estágio da doença e implicando na predisposição das lesões. Assim, o alelo p53Arg, na ausência do alelo p53Pro, conferiria a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral, mais propriamente associado à iniciação e progressão dos tumores. Zehbe *et al.* (1999) e Agorastos (2000), comprovaram em pacientes italianas e suíças que a homozigose para p53Arg teria maior risco no desenvolvimento do carcinoma cervical.

Agorastos *et al.* (2000) e Burbano (2000), também confirmaram os resultados encontrados por Storey (1998) e Zehbe *et al.*

(1999). Porém observaram que tanto no grupo étnico como nos métodos laboratoriais utilizados, o grau da lesão provocada pelo HPV e o tamanho da amostra podem implicar em resultados controversos. As evidências levam a crer que o genótipo p53Arg/Arg indica uma característica genética de alguma importância na predisposição ao câncer. Mas já a presença do alelo p53Arg/Pro em heterozigose não seria suficiente para desenvolver o fenótipo de um tumor.

Burbano *et al.* (2000) e Suarez-Rincón *et al.* (2002), utilizando a técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) em hiperplasias epiteliais da mama, não encontraram nenhum polimorfismo indicativo de mutação da p53. Essa ausência de mutação é um indicativo de que este gene não está envolvido no processo de malignização na carcinogênese da mama, pressupondo-se que mutações da p53 sejam um evento tardio neste tipo de câncer. Ferreras *et al.* (2001) e Levine e Momand (1990), analisando a associação do HPV com a perda de LOH em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, identificaram a interação do HPV 16 em 31% dos casos, ao passo que a perda de LOH do gene p53 foi de 61% dos casos, demonstrando serem fatores que parecem atuar independentemente na tumorigênese. Ambos são fatores implicados na carcinogênese e podem se associar atuando sinergicamente, mas também podem aparecer independentes em muitos tumores.

Suarez-Rincón *et al.* (2002) e Kawamata *et al.* (2002), realizaram um estudo com amostras de câncer cervical utilizando tecido incluído em parafina e controles negativos de tecido normal. Os resultados obtidos indicam as proporções dos genótipos: p53Pro/Pro 0,05%, p53Pro/Arg 0,5% e p53Arg/Arg 0,45% nas amostras de câncer. Nos controles negativos as percentagens foram de 0,08; 0,62 e 0,30%, respectivamente, sem encontrar diferença significativa entre os grupos. Concluíram, assim, que a homozigose para arginina não é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical, discordando do autor Storey²⁷ que encontrou resultados semelhantes, porém associando a homozigose para arginina como um fator de risco ao câncer. Kawamata *et al.* (2002) e Tamara (2001), pesquisaram em pacientes japonesas HPV positivas a degradação da p53 pela proteína E6 do HPV 16. Obtiveram as frequências para os genótipos p53Pro/Pro, p53Pro/Arg

e p53Arg/Arg, respectivamente, de: 12, 49 e 39% nos controles de células normais, 18, 55 e 27% em lesões intra-epiteliais escamosas, e 11, 41 e 48% em cânceres invasivos. A expressão dos níveis de p53 em células normais e os genótipos do códon 72 não foram afetados pela introdução do HPV 16 e de sua proteína viral E6. Em um estudo experimental com duas metodologias diferentes – PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e SSCP –, avaliaram 40 pacientes com câncer cervical primário e 20 mulheres saudáveis. Neste estudo em particular, os resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos, no que se refere ao polimorfismo de p53, à presença de HPV e ao câncer cervical (KOUSHIK; PLATT; FRANCO, 2004).

Koushik *et al.* (2004) e Jee *et al.* (2004) revisaram artigos publicados entre 1998 e 2002 e concluíram que os resultados desconhecidos podem estar associados principalmente às metodologias utilizadas. Desta forma, na literatura, encontram-se diferentes resultados para as análises do polimorfismo do gene p53. Também Jee *et al.* (2004) e Khaled *et al.* (2003) realizaram um levantamento bibliográfico de 27 artigos que discutiam a importância do polimorfismo do gene p53 no desenvolvimento dos tumores cervicais. Os resultados sugeriram que as isoformas do gene p53 para o códon 72 estão associadas ao aumento do risco para os carcinomas cervicais invasivos. No entanto, esse risco parece depender de outras variáveis de riscos, como o país em que o estudo foi realizado, o tipo celular acometido e o HPV associado à lesão.

Um estudo importante avaliando 3371 amostras de câncer cervical, divididas em grupo de casos (mulheres HPV positivas) e grupo controle (mulheres HPV negativas), foi realizado na Universidade do Arizona. A detecção do polimorfismo de p53 e dos tipos de HPV foi realizada por PCR. Os resultados não indicaram associação entre p53Arg e o grau citológico, em ambos os grupos. Assim, os achados não corroboraram outros estudos que conferem ao polimorfismo o aumento do risco de câncer cervical quando associado a HPV de alto risco oncogênico³⁶. Comar *et al.* (2004) realizaram um estudo na região nordeste da Itália, avaliando mulheres com lesões cervicais e infecção por HPV. O objetivo do estudo era propor um rastreamento em mulheres com perfil de risco para o câncer cervical. Porém, os resultados não indicaram correlação positiva entre o polimorfismo de p53 e HPV. Desta

forma, os pesquisadores concluíram ser irrelevante a utilização de tal rastreamento como estratégia de prevenção secundária.

O'Connor *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2004), utilizando a técnica de PCR, analisaram 34 pacientes com tumor de pele e 20 amostras normais, e não encontraram o resultado indicado por Storey (1998) e Zehbe *et al.* (1999). A conclusão desta pesquisa sugere que não existe uma correlação positiva entre a presença de HPV e o polimorfismo de p53Arg para o códon 72, no desenvolvimento dos cânceres de pele na população estudada. Um estudo desenvolvido na Universidade de São Paulo avaliou o polimorfismo do gene *p53* em 22 biópsias de pacientes com câncer de pele e 27 indivíduos saudáveis, pela técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). A conclusão do estudo indicou que o polimorfismo p53Arg tem um importante papel no desenvolvimento de lesões malignas de pele Bastiaens *et al.* (2001). Bastiaens *et al.* (2001) e Cortezzi (2004) realizaram um estudo com o intuito de discutir a necessidade de fazer uma triagem, para o polimorfismo de p53, em pacientes com carcinoma cutâneo de células escamosas. Para isso, foram analisados 86 indivíduos com histórico de carcinoma cutâneo e 168 controles. Adicionalmente, foram testados 121 amostras de carcinoma de células basais e 108 casos de melanoma maligno. As análises estatísticas não revelaram diferenças significantes entre os grupos. Assim, os autores concluíram que a homozigose de arginina não parece representar um fator de risco importante para os carcinomas cutâneos de células escamosas e, por isso, a triagem não é recomendada. Outro estudo analisou 50 tumores de cabeça e pescoço e 142 indivíduos saudáveis, pela técnica de PCR. Os resultados não sugeriram associação entre os genótipos ou alelos do gene *p53* e o desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço. Segundo os autores, parece que o alelo arginina não confere proteção contra esses tipos de cânceres, contrariando alguns dos achados para os tumores cervicais (SAYHAN *et al.*, 2001).

Os genótipos de *p53* para o códon 72 também foram avaliados em câncer de cólon, com a utilização das técnicas de PCR e digestão com enzimas de restrição, em um trabalho realizado na Turquia. Tal estudo concluiu que os genótipos de *p53* não parecem estar associados com o risco de desenvolver o câncer de cólon ou mesmo com a infecção por HPV (SOULITZIS *et al.*, 2002). Por outro lado, Soultizis *et al.* (2002) e Katiyar *et al.* (2003), es-

tudando o mesmo polimorfismo em tumores da bexiga, encontraram resultados diferentes. A pesquisa avaliou, por PCR, amostra de sangue de 50 pacientes com câncer de bexiga e 99 indivíduos saudáveis agrupados por idade e região geográfica. Os resultados indicaram uma provável implicação do polimorfismo de *p53* na carcinogênese dos tumores de bexiga e que, ao contrário das evidências em câncer cervical, indivíduos com genótipo *p53Arg/Arg* têm um risco maior de desenvolver tal câncer. Na Índia, Katiyar *et al.*, (2003) e Alvarez e Romero (2003) avaliaram o polimorfismo *Arg/Pro* de *p53* e o risco do desenvolvimento de tumores cervicais e da cavidade oral associados aos HPVs 16 e 18. Para o câncer cervical foram analisadas 128 biópsias tumorais HPV positivas e 36 HPV negativas, 34 casos de displasia cervical e 104 controles normais. Adicionalmente, foram analisados 13 amostras de câncer oral HPV negativas e 31 positivas e 20 controles negativos. Os resultados indicaram que a interação entre as oncoproteínas do HPV e o polimorfismo de *p53*, especialmente, em homozigose para Arginina no códon 72, parece não estar relacionada com o desenvolvimento dos tumores cervical e oral. Desta forma, os autores sugerem que esta interação não deve servir como um biomarcador para identificação precoce de risco para os cânceres estudados.

Em suma, os estudos realizados nos últimos anos, na tentativa de associar o polimorfismo de *p53*, a presença de HPV e o desenvolvimento de câncer cervical foram controversos. Vários estudos encontraram correlação positiva dessas variáveis (OJEDA *et al.*, 2003; ABBA *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2000), e, de maneira contrária, outros não encontraram diferença estatística significativa entre os grupos analisados (KAWAMATA *et al.*, 2002; GUSTAFSSON *et al.*, 2001; MAGPAL, SAHNI, DAS, 2002). Muitos estudos têm sido realizados, em vários sítios anatômicos, com diferentes técnicas, na tentativa de associar o polimorfismo de *p53* com a infecção pelo HPV e com o desenvolvimento de tumores distintos. Os resultados mostram um desencontro que pode sugerir a ausência de uma correlação importante. Esse desencontro de resultados pode estar relacionado com as diferentes técnicas utilizadas, com o grupo étnico, com a região em que a pesquisa foi conduzida, entre outros aspectos. Talvez o polimorfismo de *p53* associado ao HPV não seja o fator de risco mais importante ou principal para o desenvolvimento de vários tumores.

DISCUSSÃO

Com os conhecimentos e, principalmente, com um entendimento mais amplo das possibilidades de interação de um gene e seu sistema de ação, será possível estabelecer uma metodologia de reparo genético para um desarranjo funcional, visando restabelecer o genótipo normal. Um grupo de genes envolvidos nesse processo são aqueles denominados genes supressores tumorais, os quais parecem agir normalmente como reguladores da proliferação celular. Fazendo parte desse grupo, destaca-se o gene *p53* cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer, por levar a um aumento de uma população celular com maior instabilidade genética. Por exercer importante função de detecção de alterações no DNA e, conseqüentemente, correção ou apoptose, a proteína *p53* é um elemento fundamental na prevenção do desenvolvimento de tumores. O gene *p53*, é extensivamente estudado nas neoplasias, mostrando que pacientes com mutações apresentam um pior prognóstico. Porém, as contradições entre os resultados de diversas análises impedem a utilização desses conhecimentos na prática clínica, o que indica que uma mutação possa ser tecido-específica.

A carcinogênese pode ser compreendida como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, particularmente os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA. Não existem dúvidas de que o gene *p53* tem um papel crítico na carcinogênese, entretanto ainda é incerto dizer que a expressão da proteína *p53* mutada, relatada em vários estudos, em que alguns autores não consideram a correlação entre a super expressão e a presença de HPV, seja realmente cofator para o desenvolvimento da carcinogênese.

O câncer é uma doença que aflinge milhões de pessoas todos os anos. A identificação molecular de mutações e polimorfismos genéticos traduz-se para a saúde pública como possibilidade de caracterização da susceptibilidade individual ao câncer, podendo no futuro conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce, bem como para o aconselhamento genético e o desenvolvimento da terapia gênica. As pesquisas sobre o polimorfismo do códon 72 relacionado com o HPV e perda de heterozigosidade do gene *p53* são importantes no conhecimento

dessa doença. Sua relação com a carcinogênese tem sido amplamente comparada através do elevado índice de mutações do gene *p53*. Essas mutações são consideradas as alterações genéticas mais freqüentes nos tumores malignos humanos de diferentes tecidos, ocorrendo em cerca de 70% das neoplasias. Numerosos estudos foram realizados com o objetivo de analisar seu potencial para utilização clínica, como elemento de valor prognóstico.

Referências

ABBA, M. C. *et al.* The *p53* codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. Centro de Investigaciones em Genetica Basica y Aplicada (CIGEB), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2003, n. 1, p. 63-66.

AGORASTOS, T. *et al.* *p53* codon 72 polymorphism and risk of intraepithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women. *Eur. J. Cancer Prev.*, v. 9, p. 113-118, 2000.

ALMEIDA, J. D. *et al.* Expressão do gene *p53* no carcinoma bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia*, São José dos Campos, v. 1, n. 1, jul/dez. 1999.

ALVAREZ, A. S.; ROMERO, M. R. Risk factors for cervico-uterine cancer associated to HPV: *p53* codon 72 polymorphism in woman attending Hospital Care. Hospital General, SDD y Laboratorio Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Juarez, Durango, Durango, 2003, v. 71, n. 12, p. 12.

BASTIAENS, M. T. *et al.* Cutaneous squamous cell carcinoma and *p53* codon 72 polymorphism: A need for screening? Department of Dermatology, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands, v. 30, n. 1, p. 56-61, 2001.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. *Gene*, v. 23, n. 2, p. 177-186, 1999.

BURBANO, R. R. *et al.* Investigation of single strand conformational alterations of the TP53 gene in epithelial hyperplasias of the breast. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 46, n. 4, p. 401-406, 2000.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. *p53* e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

COMAR, M. *et al.* *p53* at codon 72 polymorphism, Human Papillomavirus infection and cervical lesions: A cross-sectional study from northeastern Italy. Department of Public Medicine Sciences, U.C.O. Hygiene and Preventive Medicine, University of Trieste, I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, Via Dell'Istria 65/1, Trieste 34100, Italy. v. 15, n. 2, p. 114-210, 2004.

CORTEZZI, S. S. *et al.* Analysis of Human Papillomavirus prevalence and

TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. Instituto de Biociencias, Letras e Ciencias Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 2004, v. 1, n. 1, p. 44-9.

FELIX, C. A.; NAU, M. M.; TAKAHASHI, T. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal Chin. Invest.*, v. 89, p. 640-647, 1992.

FERNANDES, M. G. M. *et al.* MIB 1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 1, p. 29-37, 2002.

FERRERAS, A. M. *et al.* Asociación entre la integración del virus del papiloma humano y la pérdida de heterozigosidad del gen p53 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinol. Esp.*, v. 52, p. 546-552, 2001.

GARAY, H. M. *et al.* Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. *Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 30, jan./jun. 2003.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* Genética e diferenciação celular. In: INTRODUÇÃO a genética. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 682-708.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. Sutis diferenças de um código. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 26, p. 24-27, 2002.

GUSTAFSSON, A. C. *et al.* HPV-Related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Dermato-Venereol*, v. 81, n. 2, p. 125-129, 2001.

HAHN, W.; WEIBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature*, v. 2, p. 231-341, 2002.

JEE, S. H. *et al.* Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: A meta-analysis. Departament of Epidemiology and Health Promotion, Graduate Scholl of Health Science and Management, Yonsei University, Seoul, South Korea., v. 85, n. 3, p. 301-308, 2004.

KATIYAR, S. *et al.* Polymorphism of the p53 codon 72 Arg/Pro and the of Hpv type 16/18 - associated cervical and oral cancer in India. Division of Molecular Oncology, Institute of Cytology and Preventive Oncology, Maulana Azad Medical College Campus, Bahadur Shah Zafaz Marg, New Delhi, India, 2003, v. 252, n. 1-2, p. 117-124.

KAWAMATA, Y. *et al.* HPV-16-E6-mediated degradation of intrinsic p53 is compensated by upregulation of p53 gene expression in normal cervical keratinocytes. *Int. J. Oncol.*, v. 21, p. 561-567, 2002.

KHALED, H. M. *et al.* Correlation between p53 mutation and HPV in bilharzial cancer. Medical Oncology Department. Cairo University, Egypt, Cairo, v. 21, n. 5, p. 334-341, 2003.

KLUMB, C. E.; CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia*, v. 24, n. 2, p. 111-115, 2002.

KOUSHIK, A.; PLATT, R. W.; FRANCO, E. L. p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia. *A Meta-Analysis Review*, v. 13, p. 11-22, 2004.

KWOK, P. Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol. Med. Today*, v. 5, p. 12538-12543, 1999.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. *Nature*, v. 278, p. 261-263, 1979.

LEMOES, J. A. R. Efeitos das mutações do gene supressor de tumor p53 na leucemogênese. Sociedade Brasileira de Genética, Revisão (Monografia da Faculdade de Medicina) – USP, Ribeirão Preto, 1995. V. 2.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J. Tumor supressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1032, p. 119-36, 1990.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumour supressor gene. *Nature*, v. 351, p. 453-456, 1991.

LEWIN, B. Oncogenes e câncer. In: GENES VII. São Paulo: Artmed, 2000. p. 837-73.

LI, F. P.; FRAUMENI JUNIOR, J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann. Int. Med.*, v. 71, p. 747-753, 1969.

LO, K. W. *et al.* Presence of p53 mutation in human cervical carcinomas associated with HPV-33 infection. *Anticancer Res.*, v. 12, p. 1989-1994, 1992.

NAGPAL, J. K.; SAHNI, S.; DAS, B. R. P53 codon 72 polymorphism and susceptibility to development of human papiloma virus-associated cervical cancer in Indian woman. *Eur. J. Clin. Investig.*, v. 32, n. 12, p. 943-948, 2002.

NISHIKAWA, A. *et al.* P53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 10, n. 5, p. 402-407, 2000.

NYLANDER, K.; DABEISTEEN, E.; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal Oral Patol Med*, v. 29, p. 413-25, 2000.

O'CONNOR, D. P. *et al.* p53 codon 72 polymorphism and Human Papillomavirus associated skin cancer. Pathology Department, Royal College of Surgeons in Ireland, Ireland, v. 54, n. 7, p. 539-542, 2001.

OJEDA, J. M. *et al.* p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer. Centro de Oncologia Preventiva, ICBM, Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Santiago, 2003, v. 36, n. 2, p. 279-283.

OLIVEIRA, W. R. *et al.* Association of p53 arginine polymorphism whit skin cancer. Departament of Dermatology, University of São Paulo, v. 43, n. 7, p. 489-493, 2004.

OSBORNE, R. J.; HAMSHERE, M. G. A genome-wide map showing common

regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res.*, v. 60, p. 3706-3712, 2000.

PINTO, F. N. et al. Mutação do gene p53 induzindo predisposição hereditária ao câncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. *Rev. Med.*, São Paulo, v. 81, n. ¼, p. 42-6, jan./dez. 2002.

RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 47, n. 2. 179-184, 2001.

SAYHAN, N. et al. P53 codon 72 genotypes in colon cancer. Association with Human Papillomavirus infection. *Molecular Oncology and Hematopathology Research and Application Center*, Istanbul, Turkey, 2001, v. 109, n. 1-2, p. 25-34.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. HPV e câncer: o papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 29, p. 48-54, 2003.

SOULITZIS, N. et al. p53 codon 72 polymorphism and its associaton with bladder cancer. *Laboratory of Virilgy, Medical School, University of Crete*, P. O. Box1393, Heraklion, Crete, Greece, 2002, v. 28, n. 2, p. 175-183.

SOUVINOS, G.; RIZOS, E.; SPANDIDOS, D. A. p53 codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncology*, v. 37, p. 572-578, 2001.

STOREY, A. *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature*, v. 393, p. 229-234, 1998.

SUAREZ-RINCÓN, A. E. et al. Polymorphism in codon 72 of the p53 gene and cervico-uterine cancer risk in Mexico. *Ginecol. Obstet. Mex.*, v. 70, p. 344-48, 2002.

TANARA, G. et al. TP53 codon 72 polyimorphism does not affect risk of cervical cancer in patientes from the Gambia. *Genoa, Italy.*, v. 14, p. 280-283, 2003.

ZEHBE, I. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet.*, v. 354, p. 218-219, 1999.

Abstract: an important instrument in the study of the cancer, they are the recent progresses of the molecular biology, that he/she brought as one of their main elements the gene supressor of tumor p53, to which a significant paper is attributed in the carcinogênese by possessing as main function to the preservation of the integrity of the genoma. The interaction of the p53 with the protein viral E6 of HPV (Papiloma Human Virus), it results in his/her fast degradation and perch of the function. The relationship between the protein p53 and the

carcinogênese has been thoroughly proven through the high index of mutations found in malignant tumors of different woven. The objective of this revision is to present an analysis of the current knowledge about the paper of the gene p53 and his/her relationship with the cancer, for a possible clinical use as element potencializador of the effects of the therapy adjuvante with value prognostic.

Key words: *gene p53, carcinogenesis, LOH, polimorphisms and*

HPV

* Agradecemos aos amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, pela amizade e companheirismo, especialmente à Bárbara Mariotto Bordin e Lana Cristina Bueno Miranda. À professora Doutora Katia Karina Verolli de Oliveira Moura, pelo apoio e confiança em mim depositados e, especialmente, pela amizade. À Universidade Católica de Goiás e ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

JALSI TACON ARRUDA

Especialista em Genética Humana. Bióloga. Bolsista do CNPq – PIBIC/Prope-Universidade Católica de Goiás (UCG).

BÁRBARA MARIOTTO BORDIN

Biomédica. Bolsista do CNPq – PIBIC/Prope-UCG.

LANA CRISTINA BUENO MIRANDA

Biomédica. Bolsista do CNPq – PIBIC/Prope-UCG.

DÉBORA LEMOS MALDI MAIA

Prof^ª adjunta, Mestre – UCG

KATIA KARINA VEROLLI DE OLIVEIRA MOURA

Professora Doutora na UCG. Orientadora. E-mail: kkverolli@ucg.br