



Estudo da Variante Polimórfica $p16^{CDKN2A}$ SNP rs11515 e o risco do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

Sabrina Ferreira de Jesus, Ugo Borges Pinheiro, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Ludmilla Regina de Souza, Lucyana Conceição Farias, Alfredo Maurício Batista de Paula, Andre Luíz Sena Guimarães

Introdução

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) é um problema de saúde pública mundial. Sua etiologia é complexa devido à natureza multigênica da doença e ao número elevado de agentes ambientais com potenciais ações carcinogênicas. É evidente que os principais agentes etiológicos são o tabaco e o álcool [1]. Entretanto, outros fatores tais como a predisposição genética tem um papel importante na gênese e progressão da doença [1]. Recentemente, demonstrou-se que as variações genéticas podem estar associadas com a susceptibilidade ao CECP [2], prognóstico e sobrevida da doença [3]. Além disso, polimorfismos genéticos parecem contribuir para o desenvolvimento do CECP. O papel dos polimorfismos genéticos em alterar os níveis de proteína, modificando funções e predispondo os pacientes a uma variedade de doenças, tem sido demonstrado extensivamente [4].

O avanço do conhecimento sobre a biologia molecular tem proporcionado a realização de inúmeros trabalhos sobre a participação de genes no desenvolvimento do CECP. Vários genes têm sido correlacionados com esta doença, no intuito de desvendar o complexo mecanismo da carcinogênese. Dentre estes genes destaca-se o $p16^{CDKN2A}$. O gene $p16^{CDKN2A}$, além de ser alvo de alterações genéticas relacionadas à doença, é um dos principais genes supressores tumorais epigeneticamente inativados [5]. O polimorfismo do gene $p16^{CDKN2A}$ (SNP rs11515) tem sido associado com uma baixa expressão de $P53$, que é um dos genes supressores de tumores tendo importante função sobre o controle do ciclo celular e apoptose. Este polimorfismo também foi relacionado com a agressividade do tumor [6]. No entanto, há uma escassez de pesquisas que avaliam as variações polimórficas $p16^{CDKN2A}$ (SNP rs11515) em relação às características clínico-patológicas do carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, enfatizando o risco para a doença. Dessa forma, este estudo teve por objetivo investigar a associação da frequência da variante polimórfica $p16^{CDKN2A}$ (SNP rs11515) e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Material e métodos

A. População Estudada

A presente análise foi baseada no modelo de estudo retrospectivo. Neste estudo foram analisados 96 pacientes com CECP, que foram submetidos ao diagnóstico e tratamento de 1997 a 2011. Estes pacientes foram recrutados a partir de banco de dados de diversas clínicas cirúrgicas que tratam do CECP, em Montes Claros, Brasil. O grupo de estudo foi dividido em duas categorias, sendo uma com 50 pacientes com idade <60 anos e outra com 46 pacientes que tinham ≥ 60 anos. Um grupo controle de 100 indivíduos escolhidos aleatoriamente, sem CECP também foi incluído no estudo.

B. Isolamento de DNA e genotipagem $p16^{CDKN2A}$

O DNA foi isolado a partir de dez seções de tecido de 10 μ m de espessura a partir de cada bloco de amostras de CECP, utilizando o KitDNeasyTissue (Qiagen, Chatsworth, CA). O polimorfismo do gene $p16^{CDKN2A}$ (SNP rs11515) foi avaliado por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). O produto de PCR de 144 pb a partir do gene $p16^{CDKN2A}$ foi digerido pela enzima de restrição endonuclease HaeIII (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Assim, é importante saber que o alelo C de tipo selvagem tem duas bandas (109 e 35 pb), enquanto que o alelo G tem somente uma banda (144 pb). Para este procedimento, 10 μ L de DNA foram amplificados e digeridos com 2,5 U de HaeIII durante 16 h a 37 ° C.

C. Condução da Eletroforese

Os produtos de PCR para o polimorfismo e fragmentos digeridos foram verificados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em 200 V constante durante 1,0 h e manchados com nitrato de prata. Resultados de eletroforese foram estimadas usando um padrão de 100 pb.

D. Análise estatística

As diferenças entre os casos de CECP e o grupo controle foram determinadas através dos testes qui-quadrado e Fisher. Tempo de sobrevida foi calculada a partir da data do diagnóstico a data da última visita de acompanhamento ou à data da morte usando o Kaplan-Meier e comparando com o teste log rank. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.



Apoio financeiro: FAPEMIG/ CNPq /CAPES

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes1187/08

Resultados

A frequência genotípica do polimorfismo do gene $p16^{CDKN2A}$ rs11515 em ambos os grupos está apresentada na **Tabela 1**. Não foram observadas diferenças entre o grupo controle e CECP. A distribuição de genótipos foi semelhante para os dados a partir de um População Central sul-Africano e uma população Africano-Americano (banco de dados NCBI dbSNP). As distribuições de genótipos do polimorfismo $p16^{CDKN2A}$ de acordo a idade, as características moleculares, e parâmetros clínico-patológicos encontram-se resumidas na **Tabela 2**. Treze pacientes de cada grupo apresentaram TNM I / II. Foi observado que não houve diferença entre os genótipos do $p16^{CDKN2A}$ e os parâmetros clínico-patológicos.

Discussão

É estabelecida a grande influência de alterações genéticas e agentes ambientais no CECP. Estudos têm enfatizado as modificações epigenéticas como fatores relevantes no mecanismo da doença. No entanto, não há um conhecimento preciso da importância dos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais para os pacientes com CECP. Polimorfismos genéticos envolvidos no controle do ciclo celular podem estar associados ao desenvolvimento e risco para o CECP. Entretanto, no presente estudo isso não foi observado com a variante polimórfica $p16^{CDKN2A}$ (SNP rs11515).

O gene supressor de tumor $p16^{CDKN2A}$ é um dos principais reguladores do ciclo celular e é frequentemente inativado em tumores sólidos [5]. Evidências *in vitro* utilizando ensaio funcional relataram que $p16^{CDKN2A}$ inibe crescimento de células e prisão na fase G0-G1 do ciclo celular. O mecanismo de ação da $p16^{CDKN2A}$ parece ser através da inibição de CDK4 e CDK6, que conduz a um bloqueio de fosforilação por pRB [7]. Além disso, metilação $p16^{CDKN2A}$ tem um impacto na sobrevida CECP [8]. Este marcador é um candidato interessante para a detecção precoce e avaliação de riscos. Descobrimos que os indivíduos portadores de CECP com tumores de grande porte e com doença metastática apresentaram pior sobrevida geral. Estes resultados são consistentes com os conceitos fundamentais que estabelecem a contribuição dos fatores tamanho do tumor e metástase linfonodais para maior agressividade do CECP [9]. Um estudo anterior mostrou que o alelo G do polimorfismo rs11515 está fortemente associado à susceptibilidade a alguns tipos de câncer humano, incluindo indivíduos com carcinoma da bexiga [10]. Usando testes bivariados, observamos que nem alelos nem genótipos tiveram um impacto sobre a sobrevida geral, por meio de testes estatísticos multivariados.

Estudos futuros são necessários para promover uma melhor compreensão da participação do polimorfismo rs11515 em pacientes com CECP. Tendo em vista a complexidade da doença e a necessidade de um maior entendimento dos mecanismos envolvidos em diferentes faixas etárias, mais estudos são necessários para elucidar o CECP tanto em sua etiopatogênese como no comportamento biológico.

Conclusão

Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que não há diferenças na distribuição de rs11515 entre os grupos controle e CECP. Além disso, não há diferença entre genótipos rs11515 e os parâmetros clínico-patológicos. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão das relações entre o processo da doença e fatores genéticos e, eventualmente, levar a um diagnóstico mais preciso, tratamento e prognóstico em pacientes com CECP.

Referências:

- [1] ARGIRIS, A. *et al.* Head and neck cancer. 371(9625):1695–709. Lancet 2008.
- [2] WANG, JR. *et al.* Association of two BRM promoter polymorphisms with head and neck squamous cell carcinoma risk. *Carcinogenesis*. 2013.
- [3] FRAGA, A. *et al.* High hypoxia-inducible factor-1alpha expression genotype associated with Eastern Cooperative Oncology Group performance in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*. 2012.
- [4] ZHENG Y, *et al.* Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002.
- [5] TSYGANKOV D. *et al.* A quantitative model for age-dependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009.
- [6] SAUROJA, I. *et al.* Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000.
- [7] LIGGETT JRWH, *et al.* p16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*. 1996.
- [8] FARIAS LC, *et al.* Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol*. 2010.



[9] DE OLIVEIRA MV, *et al.* Prognostic value of microvessel density and p53 expression on the locoregional metastasis and survival of the patients with head and neck squamous cell carcinoma. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry. 2013.

[10] SAKANO S, *et al.* Clinical course of bladder neoplasms and single nucleotide polymorphisms in the CDKN2A gene. International Journal of Cancer.2003.

Tabela 1. Frequência genotípica do polimorfismo RS11515 do gene *p16* em pacientes CECP e grupo controle

Gene/genótipo	Controle n (%)	CECP n (%)	Valor p
RS11515			
GG	07 (7)	07 (7.3)	0.200
CG	26 (26)	15 (15.6)	
CC	67 (67)	74 (77.1)	

Todos os valores foram calculados utilizando o teste de χ^2 .

Tabela 2. Genótipo *p16* e sua associação com aspectos clínico-patológicos e características do grupo em estudo

Variáveis	Número (%)			Valor p
	GG	CG	CC	
Idade *				
Jovem	2 (28.6)	9 (60.0)	39 (52.7)	0.379
Idoso	5 (71.4)	6 (40.0)	35 (47.3)	
Sexo *				
Masculino	6 (85.7)	14 (93.3)	68 (91.9)	0.825
Feminino	1 (14.3)	1 (6.7)	6 (8.1)	
História familiar de qualquer tipo de câncer *				
Ausente	6 (85.7)	10 (66.7)	41 (55.4)	0.243
Presente	1 (14.3)	5 (33.3)	33 (44.6)	
Tabagismo *				
Nunca	6 (85.7)	15 (100)	70 (94.6)	0.368
Sempre	1 (14.3)	0 (0.0)	4 (5.4)	
Locais anatômicos *				
Anterior	2 (28.6)	8 (53.3)	33 (44.6)	0.552
Posterior	5 (71.4)	7 (46.7)	41 (55.4)	
Estadiamento clínico TNM *				
I/II	1 (14.3)	6 (40.0)	19 (25.7)	0.383
III/IV	6 (85.7)	9 (60.0)	55 (74.3)	
Metástase locoregional *				
Ausente	0 (0.0)	8(53.3)	27 (36.5)	0.053
Presente	7 (100)	7 (46.7)	47 (63.5)	

* p <0,05 (significativo, analisados por Fisher ou teste χ^2)