



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

IGOR ANDRADE PESSÔA

POLIMORFISMOS DOS ÉXONS 4 E 7 DO GENE *TP53* EM
POPULAÇÕES DA REGIÃO AMAZÔNICA, ESTADO DO PARÁ

BELÉM
2009

IGOR ANDRADE PESSÔA

POLIMORFISMOS DOS ÉXONS 4 E 7 DO GENE *TP53* EM
POPULAÇÕES DA REGIÃO AMAZÔNICA, ESTADO DO PARÁ

Projeto de Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Biomédico.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ândrea K. C. Ribeiro dos Santos

BELÉM
2009

IGOR ANDRADE PESSÔA

**POLIMORFISMOS DOS ÉXONS 4 E 7 DO GENE *TP53* EM
POPULAÇÕES DA REGIÃO AMAZÔNICA, ESTADO DO PARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa:

**Sala LM 14, ICB - UFPA
Belém (PA), 11 de Dezembro de 2009.**

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos ICB – UFPA
(orientador)

Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano
(ICB – UFPA)

Prof. Dr. Sidney E. B. dos Santos
(ICB – UFPA)

Prof. Dr. – André Salim Khayat
(ICB – UFPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, que sempre me deu forças e coragem para lutar por meus objetivos, sempre guiando meus passos no sentido de conquistar meus ideais.

Aos meus pais Ivanildo Antonio dos Santos Pessôa e Maria Ledian Nunes de Andrade, responsáveis diretos pela minha educação, ensinando-me quase tudo que sei, a quem devo meus valores e caráter, sempre fazendo o possível pelo meu bem estar e visando um bom futuro

À todos meus familiares e amigos, que sempre estiveram presentes em momentos importantes na minha vida, tanto bons quanto ruins, dando todo tipo de apoio sempre que preciso.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, que me ofereceu a oportunidade de enriquecer meu conhecimento durante a minha graduação e no estágio, permitindo assim a conclusão desse trabalho.

E aos amigos do Laboratório de Genética Humana, que contribuíram de diversas formas para a elaboração e conclusão deste projeto.

SUMÁRIO

Sumário	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Resumo	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. OBTENÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS	10
3.2. POPULAÇÕES ESTUDADAS	10
3.3. ESCLARECIMENTO SOBRE O PROJETO	12
3.4. METODOLOGIA EMPREGADA	12
3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA	12
3.4.2. AMPLIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA ALVO DO GENE <i>TP53</i>	13
3.4.3. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	15
4. RESULTADOS	15
4.1. ANÁLISE DO ÉXON 4 NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS	16
4.2. ANÁLISE DO ÉXON 7 E REGIÕES ADJACENTES NAS POPULAÇÕES DE ALENQUER E BELÉM	18
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Representação e localização do gene <i>TP53</i> ; Estrutura 3D da p53 com o sítio de mutação	2
Figura 02. Mapa físico do gene <i>TP53</i> evidenciando as regiões de éxons codificantes e não codificantes	3
Figura 03. Principais domínios do p53	6
Figura 04. Localização dos municípios de Monte Alegre (em vermelho), Alenquer (em azul) e Prainha (em verde) (IBGE Mapas, adaptado).	11
Figura 05. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G)	17
Figura 06. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo em heterozigose Arg/Pro (G/C)	18
Figura 07. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo Pro/Pro (C/C)	18
Figura 08. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo selvagem C/C (posição 13.436)	21
Figura 09. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo em heterozigose C/T (posição 13.436)	22
Figura 10. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou os genótipos selvagens C/C e T/T (posições 13.491 e 13.511 respectivamente)	22
Figura 11. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou os genótipos em heterozigose C/T e T/G (posições 13.491 e 13.511 respectivamente)	23
Figura 12. Eletroferograma de um indivíduo que apresentou as alterações em homozigose T/T e G/G (posições 13.491 e 13.511 respectivamente)	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Seqüências dos iniciadores utilizados na PCR	14
Tabela 02. Condições de PCR dos segmentos estudados	14
Tabela 03. Resultados encontrados na genotipagem do éxon 4 do gene <i>TP53</i> nas populações estudadas	17
Tabela 04. Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene <i>TP53</i> na população de Belém	20
Tabela 05. Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene <i>TP53</i> na população de Monte Alegre	20
Tabela 06. Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene <i>TP53</i> na população de Prainha	21
Tabela 07. Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene <i>TP53</i> na população de Alenquer	21
Tabela 08. Valores de P após a realização do teste Qui-Quadrado nas amostras estudadas e na população global em relação aos alelos <i>TP53</i> ^{*13.491} T e <i>TP53</i> ^{*13.511} G	27
Tabela 09. Valores de P após a realização do teste Qui-Quadrado nas amostras estudadas e na população global em relação ao alelo <i>TP53</i> ^{*72} C	27

RESUMO

Diferentes alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento das neoplasias afetam os mecanismos de controle da proliferação e de morte celular. O *TP53* é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17, na região 17p13.1, que codifica a proteína p53 que regula a parada do ciclo celular e/ou indução da apoptose em casos de danos ao DNA. Este gene apresenta vários polimorfismos, que podem resultar em proteínas modificadas, como no éxon 4 o polimorfismo do códon 72 que altera o códon CGC para CCC. Esta alteração ocasiona a troca de um aminoácido arginina por uma prolina, modificando a capacidade da proteína de exercer sua função. O presente estudo teve como objetivo geral investigar alterações nucleotídicas nos éxons 4 e 7 e regiões intrônicas adjacentes do gene *TP53* nas populações da Amazônia (Belém, Monte Alegre, Prainha e Alenquer, todas no estado do Pará). Foram investigadas 263 amostras (Belém - 100, Monte Alegre - 64, Prainha - 50 e Alenquer - 49) obtidas de indivíduos da população em geral, analisadas por seqüenciamento direto no aparelho ABI Prism – 3130. Entre os indivíduos estudados observaram-se as seguintes alterações: i) Uma mudança de G → C no códon 72 (éxon 4) que altera o aminoácido Arginina para Prolina; ii) Três alterações no íntron 7, C → T na posição 13.436 do gene; C → T na posição 13.491; e T → G na posição 13.511. Não houve diferença estatística significativa entre a freqüência dos alelos *TP53*^{*72C}, *TP53*^{*13.436T}, *TP53*^{*13.491T} e *TP53*^{*13.511G}, quando comparadas as amostras das populações estudadas entre si, assim como quando comparadas com a freqüência na população global. Como o câncer pode ser considerado como uma herança multifatorial, diferentes fatores ambientais podem estar relacionados com o seu aparecimento, quando associados a diferentes mutações, como a observada no códon 72 do éxon 4 do gene *TP53*. Assim, os resultados do presente estudo apontam para a necessidade de maiores investigações, para que se possa mensurar o verdadeiro fator de risco para o desenvolvimento desta doença.

1. INTRODUÇÃO

Na última década do século XX e começo do século XXI, presenciamos o início de um dos projetos mais audaciosos para a humanidade, o Projeto do Genoma Humano. Este projeto resultou de um esforço internacional para determinar o conteúdo completo do genoma humano (definido como a soma total de todas as informações genéticas de nossa espécie). O resultado deste importante empreendimento revolucionou e tem revolucionado o entendimento de questões básicas da genética, como: o número de genes; a distribuição das diferentes formas presentes entre nos distintos grupos étnicos; o melhor entendimento do processo de expressão gênica (principalmente no que diz respeito ao processamento pós-traducional, até então relegado); assim como da abertura de novas linhas de investigações e pesquisas relacionadas ao entendimento do funcionamento do genoma e principalmente de suas patologias, como, por exemplo, a formação de processos neoplásicos (Nussbaum, 2002).

O gene *TP53*, como um dos principais genes supressores de tumor, é um marcador importante para triagem de mutações que podem conferir risco oncológico às populações humanas. Codifica a proteína p53, supressora tumoral que apresenta tamanho aproximado de 53 KDa, se liga especificamente ao DNA (Figura 1) e age como fator de transcrição (Hainaut & Hollstein, 2000). Mutações neste gene, localizado no cromossomo 17 (Figura 1), estão presentes em aproximadamente 50% dos cânceres humanos, tornando este gene o alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico (Hainaut & Hollstein, 2000). Sua seqüência completa possui 19 kb e a região codificante possui aproximadamente 2,6 kb distribuídos em 11 éxons (Figura 2).

Mutações neste gene podem provocar uma instabilidade genômica, pois a p53 controla inúmeros processos celulares, como detecção e resposta a danos no DNA e resposta aos sinais de ativação oncogênica. Em função dos processos que participa este foi denominado “guardião do genoma” e “sentinela dos oncogenes” (Efeyan & Serrano, 2007).

As mutações herdadas no *TP53* estão associadas à síndrome de Li-Fraumeni, uma condição dominante rara que ocorre em famílias, nos quais há

uma história marcante de muitas formas de câncer (incluindo vários tipos de sarcoma ósseo e de tecidos moles, câncer de mama, tumores cerebrais, leucemia e carcinoma adrenocortical) que afetam vários membros destas famílias (Nussbaum, 2002).

A presença de mutações somáticas no *TP53* está relacionada com seu mecanismo de inativação, quando compartilhadas por ambas cópias do gene. De fato, mutações somáticas não são eventos raros, pelo contrário são encontradas na maioria de todos os tumores humanos. Desta forma, a perda da função da proteína p53 parece constituir uma etapa fundamental na carcinogênese (Varley, 2003).

A capacidade funcional da proteína p53 quando existe uma mutação no gene é definida pelo sítio específico da mutação e pelas propriedades bioquímicas da substituição de determinado aminoácido. Podendo variar de mutações que causam uma leve perda funcional até aquelas que produzem uma proteína essencialmente inativa. O comprometimento da p53 está freqüentemente relacionado ao risco de desenvolvimento de câncer (Zambett, 2007).

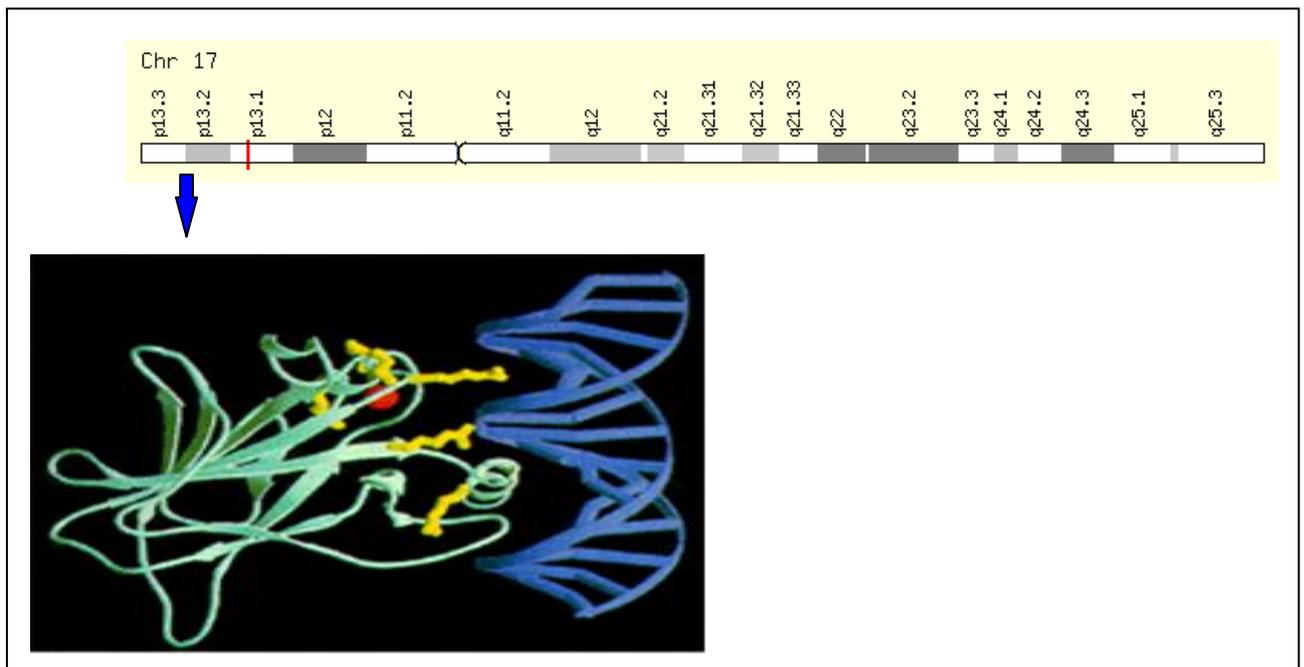


Figura 1: Representação e localização do gene *TP53* na posição 17q13.1 do cromossomo 17; estrutura 3D da p53 com o sítio de mutação e ao lado, uma

representação da molécula de DNA (www.ncbi.nlm.nih.gov com código, MIM:191170; www.genecards.org/pics/loc/GC17M007512.TP53.png).

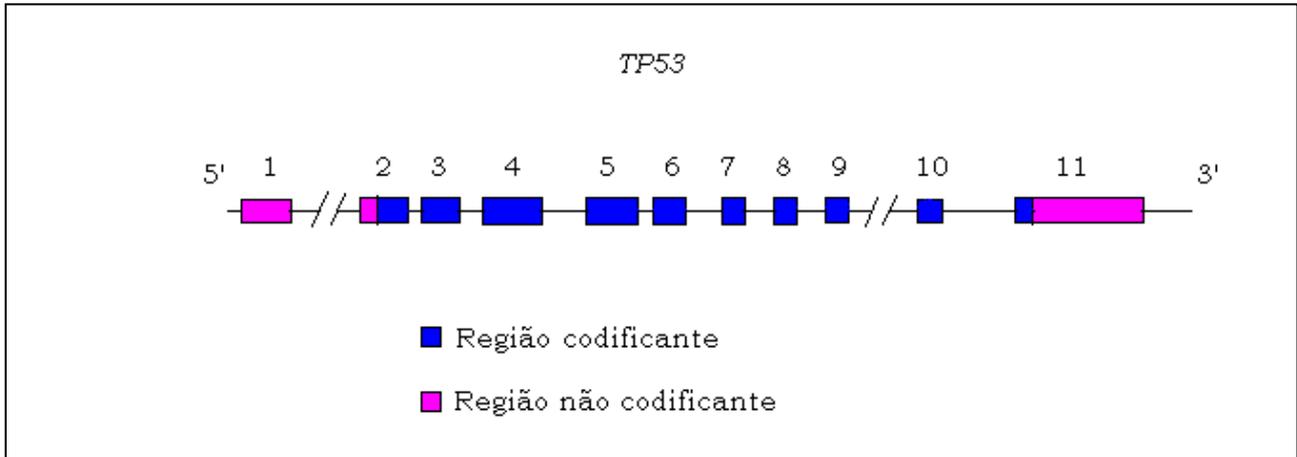


Figura 2: Mapa físico do gene *TP53* evidenciando as regiões de éxons codificantes e não codificantes (Costa,2009).

A proteína supressora de tumor p53, considerada a mais importante na prevenção do câncer tem sido estudada por mais de 20 anos. A primeira descrição da p53 foi como uma proteína celular que se liga ao antígeno SV40 T. Ironicamente, a p53 foi inicialmente classificada como uma proteína associada à transformação celular e como um proto-oncogene, pois está freqüentemente superexpressa em tumores e contribui para a imortalização e transformação de células primárias. No entanto, Levine *et al.*,1991, reconheceram que esses estudos detectaram p53 mutante, e em um outro estudo publicado 10 anos depois da identificação da p53 mutante, os autores demonstraram que a p53 selvagem inibe a transformação celular (Cadwell & Zambetti , 2001). Subseqüentemente, a proteína p53 foi apresentada como um elemento chave para a maquinaria de antiproliferação celular, capaz de induzir a apoptose ou a parada do ciclo celular em resposta a numerosos tipos de estresses. A perda dessa função é o principal contribuinte para a instabilidade genômica, transformação celular e tumorigênese (Cadwell & Zambetti , 2001). O gene *TP53* é altamente conservado em diversos organismos, sugerindo que a proteína codificada exerce um papel central e crítico na célula (Güran *et al.*, 1999).

A mutação da p53 geralmente resulta em inativação da função supressora de tumor. No entanto, algumas formas mutantes também conferem um fenótipo com ganho de função nova, manifestado pelo aumento do crescimento celular e pelo potencial tumorigênico. Essa função promotora de tumor pode significativamente contribuir para a iniciação e/ou progressão de neoplasias (Cadwell & Zambetti, 2001).

A p53 mutada também é detectável em muitas células que se encontram em alta taxa de replicação, mesmo não-tumorais, mas é indetectável ou presente só em níveis pequenos nas células em repouso (Mckurick, 1994).

Nas células normais, o nível de expressão da proteína p53 é baixo, mas quando as células são tratadas com agentes mutagênicos - como a radiação - que danificam a molécula de DNA, o nível de p53 se eleva significativamente para mediar a parada do ciclo, prevenindo o processo neoplásico. Esta resposta ao dano na molécula de DNA é mediada por uma via de sinal de transdução ATM/ATR que aumenta a transcrição do gene *TP53*. Esta via também faz com que a proteína p53 seja convertida em uma forma estável e ativa, possivelmente por fosforilação. Uma vez ativada, a p53 estimula a transcrição de genes cujos produtos param o ciclo celular, permitindo assim que o DNA danificado seja reparado. Ou alternativamente, ativa outro grupo de genes cujos produtos levam a célula a apoptose (Louro, 2002).

A disfunção do *TP53* pode levar a desregularização desses processos, à mudança na resposta celular, como por exemplo a exposição à radiação e posterior alteração da radiosensibilidade (Alsbeih *et al.*, 2007).

A p53 não mutada responde normalmente à radiação com a elevação do seu nível de expressão, mediando a parada do ciclo celular e a ativação de genes de reparo (Lu-Hesselmann *et al.*, 2006; Niida & Nakanishi, 2006). Desta forma, o gene *TP53* é de grande importância para o monitoramento de radiosensibilidade.

A proteína p53 é um fator de transcrição com 393 aminoácidos que consiste em três domínios distintos: um domínio N-terminal de ativação de transcrição (TAD), um domínio central de ligação ao DNA (DBD) e um domínio C-terminal de homo-oligomerização (OD) (Snustad & Simmons, 2001).

A maioria das mutações que inativam a p53 estão situadas no domínio DBD. Estas mutações evidentemente prejudicam ou eliminam a habilidade da enzima p53 de se ligar as seqüências específicas de DNA que estão inseridas em seus genes-alvo, impedindo assim a ativação transcricional destes genes. Assim, as mutações em DBD são tipicamente recessivas, mutações de perda de função. Outros tipos de mutações também são encontrados no domínio C-terminal OD do polípeptídeo. As moléculas da p53 com esses tipos de mutações se dimerizam com polipeptídeos p53 tipo selvagem e impedem que os polipeptídeos tipo selvagem funcionem como ativadores de transcrição. Assim, as mutações em OD têm um efeito dominante negativo no funcionamento da p53 (Snustad & Simmons, 2001) (Figura 3).

O gene também apresenta vários polimorfismos, que são variações nucleotídicas presentes em pelo menos 1% da população. A maioria desses polimorfismos está localizada em íntrons, fora da região consenso de *splicing* e éxons. Como exemplo, citamos dois polimorfismos que modificam aminoácidos: mudança de serina para prolina no códon 47 e de arginina para prolina no códon 72 (Gallo *et al.*, 2005).

O polimorfismo de troca de aminoácido mais freqüente e amplamente estudado é o do códon 72, localizado no éxon 4 do gene. Esse polimorfismo apresenta importância na susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias e se distribui com diferentes prevalências entre diferentes grupos étnicos (Beckman *et al.*, 1994).

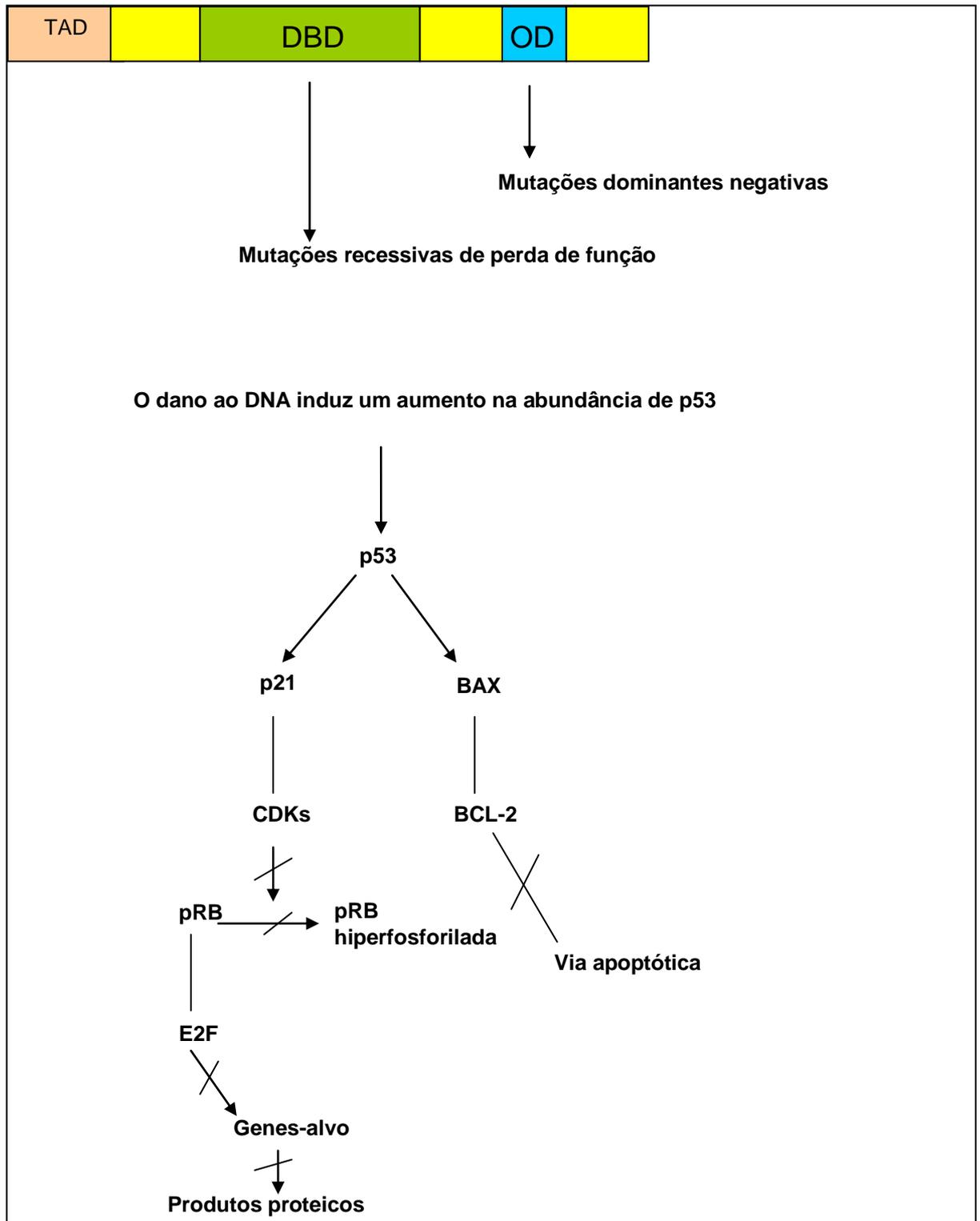


Figura 3: Principais domínios do p53. TAD, DBD e OD. Papel do p53 na resposta celular aos danos ao DNA. Foram identificadas duas vias de resposta. Dentro de cada via, a seta indica uma influência positiva ou mudança direcional, e a barra indica influência negativa. A barra perpendicular a uma seta indica que a influência, positiva ou negativa, está bloqueada. Modificado de Snustad & Simmons, 2001.

Estas alterações se relacionam às diferentes respostas e relação à exposição com fatores de risco, podendo favorecer a ocorrência de neoplasia.

Mais de 90% das mutações da p53 ocorrem na seqüência específica de ligação ao DNA no domínio central e são codificadas pelos éxons 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e 50% alteram os códons 175, 248, 249, 273 ou 282 dentro desse domínio (regiões chamadas de “hot spot”) (Cadwell & Zambetti ,2001).

Em geral, as mutações dentro do domínio central podem ser classificadas naquelas em que os aminoácidos contactam diretamente o DNA (ex: aminoácidos 248 e 273) e naquelas em que há alteração da conformação da p53, assim evitando a sua ligação específica ao DNA (ex: aminoácidos 143 e 175) (Cadwell & Zambetti ,2001).

Deleção de um dos alelos no gene *TP53* reduz a expressão dos tetrâmeros, resultando em diminuição da expressão dos genes inibidores do crescimento celular.

O efeito de supressor tumoral que a proteína p53 exerce, é alcançado com a regulação da transcrição de vários outros genes. Assim, o p53 inibe a proliferação celular por ativar o gene que codifica a proteína p21, um inibidor do complexo ciclina-proteína CDK. Quando a p21 é sintetizada em resposta ao estresse celular, os complexos ciclina-CDK são inativados, e a célula é parada, impedindo a progressão do estágio G1 para S da mitose (Snustad & Simmons, 2001). Durante esta paralisação, o DNA danificado da célula pode ser reparado. Garantindo assim, a integridade genética da célula. As células sem p53 funcional têm dificuldade em aplicar este mecanismo de inativação.

Outro efeito da p53 em resposta ao estresse celular, diferente do sistema de reparar dos danos celulares, é a ativação da resposta apoptótica. Um mecanismo que parece envolver o produto protéico do gene *BAX*. A proteína BAX é um antagonista da proteína BCL-2, que normalmente suprime a via apoptótica. Quando o gene *BAX* é ativado pela p53, seu produto protéico libera BCL-2 de seu modo supressor. Esta liberação inicia a via apoptótica (Snustad & Simmons, 2001).

Tendo em vista a importância da radiação ionizante para a indução de danos ao DNA é necessário, além de uma abordagem física, um monitoramento biológico através de determinados marcadores. Esses

marcadores são difíceis de serem especificados para exposição à radioatividade. Desse modo os marcadores genéticos mais importantes são aqueles envolvidos no desenvolvimento de neoplasias, como proto-oncogenes e genes supressores tumorais (Costa, 2009).

Mutações no gene *TP53* estão presentes em mais de 50% de todos os casos de câncer. Alterações neste gene podem resultar em proteínas variantes cujas propriedades podem ser modificadas.

Estas alterações também estão relacionadas às diferentes respostas da proteína p53, em relação à exposição com fatores de risco, podendo favorecer a ocorrência de neoplasias.

A presença de mutações que podem inativar a p53 reforçam a gravidade dessa patologia e a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias de investigações capazes de auxiliarem no melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos com o câncer. Uma das ferramentas que poderá modificar este panorama é a caracterização de polimorfismos genéticos peculiares ao desenvolvimento do tumor. A reunião de todas essas informações poderá ampliar a capacidade de prever o comportamento dessa neoplasia e permitir o estabelecimento de condutas preventivas e/ou terapêuticas de forma mais precisa (Assumpção *et al.*, 2001).

Portanto, nesse estudo foram investigadas diferentes populações do estado do Pará quanto a alterações existentes no gene *TP53*, sendo importante a realização de um levantamento das freqüências alélicas para uma posterior comparação das freqüências polimórficas obtidas entre as populações estudadas e dessas com outras descritas na literatura, e assim, avaliar se essas freqüências divergem significativamente ou não, em função de diferenças étnicas, geográficas e diferentes exposições a fatores de risco.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral investigar e descrever frequências alélicas do gene *TP53* em populações que habitam diferentes regiões da Amazônia (Belém, Monte Alegre, Prainha e Alenquer, todas no estado do Pará), em relação às principais alterações nucleotídicas presentes nos éxons 4 e 7.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar as mutações raras e/ou novas encontradas nessa população;
- Comparar as frequências polimórficas obtidas entre as populações estudadas;
- Comparar as frequências polimórficas obtidas nas populações estudadas com as descritas no banco de dados genético (GeneBank).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

Foram investigadas 263 amostras de indivíduos das populações da Amazônia no estado do Pará (Belém - 100, Monte Alegre - 64, Prainha - 50 e Alenquer - 49) obtidas na população em geral. Para a realização do trabalho foram retiradas cerca de 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo estudado, usando EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante. Após a colheita as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Citogenética Humana e ao Laboratório de Genética Humana e Médica, ambos da Universidade Federal do Pará (UFPA) onde foram realizados os procedimentos necessários para a realização das análises de biologia molecular.

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical sob o protocolo número 002/2007-CEP/NMT (Anexo 1).

3.2. POPULAÇÕES ESTUDADAS

A importância do presente trabalho ocorre em função da localização de reservas de urânio na mesorregião do Baixo Amazonas, que inclui a microrregião de Santarém e mais especificamente no município de Monte Alegre. Este, segundo a Companhia de Recursos Naturais (CPRM) possui a maior área de mineração de urânio do mundo, superior a 800 km², que se expande para os municípios de Alenquer e Prainha (Figura 4). Sabe-se que em Monte Alegre, a maioria das casas foram construídas com pedras retiradas da floresta onde se encontram reservas de urânio, localizadas a apenas 20 metros de profundidade (Melo, 1999).

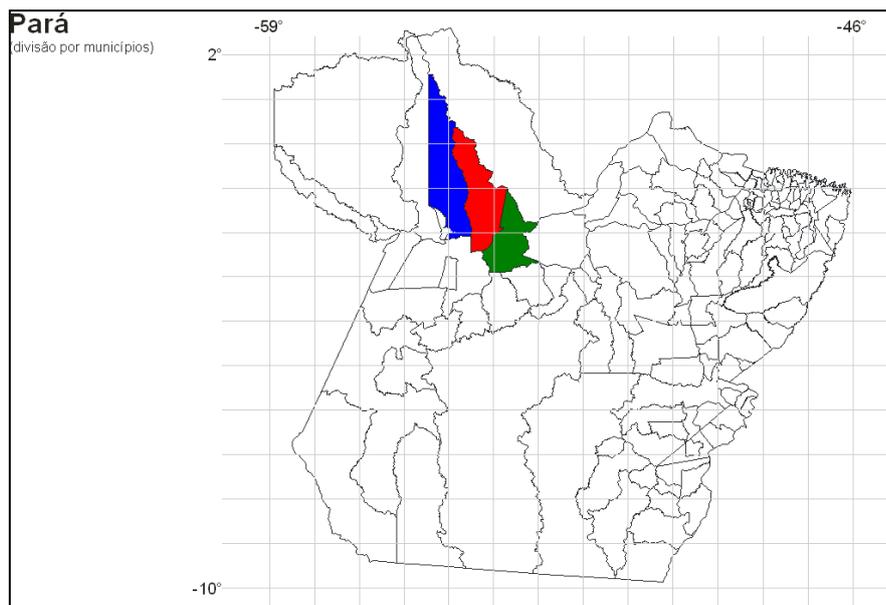


Figura 4: Localização dos municípios de Monte Alegre (em vermelho), Alenquer (em azul) e Prainha (em verde) (IBGE Mapas, adaptado).

A localização geográfica do município de Monte Alegre está a uma latitude de $02^{\circ}00'28''$ sul e a uma longitude de $54^{\circ}04'09''$ oeste, com altitude de 38 metros fazendo fronteira com as cidades de Almerim, Alenquer, Prainha e Santarém, todas no estado do Pará. Possui um território de 21.703 Km^2 e uma população de 61.350 pessoas segundo a contagem populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE Cidades, 2009).

Alenquer localiza-se a uma latitude de $01^{\circ}56'30''$ sul e a uma longitude de $54^{\circ}44'18''$ oeste, estando a uma altitude de 52 metros fazendo limites com as cidades de Almerim, Óbidos, Monte Alegre e Santarém. Possui uma população de 52.661 habitantes residentes em uma área de 22.282 Km^2 (IBGE Cidades, 2009).

Prainha é um pequeno município localizado a uma latitude de $01^{\circ}48'00''$ sul e a uma longitude de $53^{\circ}28'48''$ oeste, estando a uma altitude de 70 metros. Apresenta divisas com os municípios de Monte Alegre, Almerim, Porto de Moz, Medicilândia, Uruará e Santarém. Seu território apresentava 32.642 Km^2 na sua criação em 1935, mas sofreu uma redução, passando para uma área de apenas 12.599 Km^2 , onde habitam 26.436 pessoas (IBGE Cidades, 2009).

A cidade de Belém, capital do estado do Pará, localiza-se a uma latitude de 01° 27' 21" sul e longitude de 48° 30' 16" oeste, na região oriental do estado do Pará. Atualmente se constitui na maior metrópole da região Amazônica, com importante fator migratório. O processo de formação desta população se confunde com o da região que apresenta a contribuição de distintos grupos étnicos ameríndios, europeus e africanos. Possui uma população de 1.408.847 habitantes residentes em uma área de 1.065 Km² (IBGE Cidades, 2009).

3.3. ESCLARECIMENTO SOBRE O PROJETO

Este projeto faz parte de um projeto maior que investiga polimorfismos/mutações em diferentes genes presentes nas populações humanas, principalmente aquelas que habitam a região Amazônica. Desta forma, o presente estudo irá ampliar o tamanho amostral para a investigação do éxon 4 e 7 do gene *TP53*, nas populações Belém, Monte Alegre, Alenquer e Prainha, no estado do Pará.

3.4. METODOLOGIA EMPREGADA

Para a análise molecular das amostras das populações estudadas, o material foi encaminhado para o Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA. As técnicas utilizadas no presente projeto estão descritas abaixo.

3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração das amostras controles foi feita pela técnica fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Em seguida foi feita a quantificação e preparo do DNA dessas amostras para a análise. O protocolo usado para extração segue descrito abaixo:

- Adicionar sangue total (300 μ L) e 900 μ L de solução salina (9 g/L de NaCl) em um tubo de 2 mL;
- Levar ao agitador por 20 min;
- Centrifugar (14.000 rpm/ 3 min);
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 900 μ L de tampão de lise de hemácias (5 mmol/L de MgCl, 20 mmol/L de Tris-HCl, PH 7,8);
- Levar ao agitador por 15 min;
- Centrifugar (14.000 rpm/ 6 min);
- Repetir esse processo de lise de hemácias por 3 vezes;
- Desprezar o sobrenadante e adicionar ao pellet 500 μ L de tampão lise de leucócitos (0,2 mol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris-HCl, PH 7,8);
- Misturar em Vortex até dissolver o pellet novamente;
- Levar para Banho Maria a 55°C por 30 minutos ou mais;
- Adicionar 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio;
- Agitar o tubo em Vortex e depois no agitador por 15 min;
- Centrifugar 14.000 rpm/3 min. E transferir o sobrenadante para um outro tubo;
- Adicionar 500 μ L de clorofórmio-isopropanol (24:1), e agitar por 15 minutos;
- Centrifugar 14.000 rpm/3 min e transferir o sobrenadante para outro tubo e adicionar 990 μ L de isopropílico;
- Centrifugar 14.000 rpm/ 10 min e desprezar o sobrenadante;
- Deixar o DNA secando a temperatura ambiente por 24 horas e em seguida adicionar água destilada e autoclavada(300 μ L).

3.4.2. AMPLIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA ALVO DO GENE *TP53*

Para o presente estudos foram analisados os éxons 4 e 7 do gene *TP53*, sendo que em relação ao éxon 4 existe um polimorfismo bem caracterizado no códon 72.

Para a análise do segmento de interesse foi empregada a técnica de PCR (Polymerase chain reaction) que utiliza iniciadores (primers) específicos construídos com o auxílio do programa Primer Express versão 2.0.0 (Applied Biosystem, USA). As condições de PCR para um volume de 20 μ L são as seguintes: 100 ng de DNA genômico, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μ M de cada “primer”, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de Taq polimerase.

Os iniciadores utilizados em cada reação estão descritos na Tabela 1, as condições para o PCR estão descritas na Tabela 2.

O produto do PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5% utilizando SYBR SAFE como corante e posteriormente visualizado em um transluminador.

Tabela 1: Seqüências dos iniciadores utilizados

Gene	Região	Seqüência de iniciadores	Amplificação (pb)
<i>TP53</i>	Éxon 4	5' TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGAT 3' 5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3'	199
<i>TP53</i>	Éxon 7	5' TTGGCCTGTGTTATCTCCT 3' 5' TGATGAGAGGTGGATGGGTAG 3'	253

Tabela 2: Condições de PCR dos segmentos estudados

Segmentos	Etapas/Tempo			N° de Ciclos
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>TP53</i> éxon 4	95 °C/ 1 min	60 °C/ 1 min	72 °C/ 1 min	35
<i>TP53</i> éxon 7	95 °C/ 1 min	60°C/ 1 min	72 °C/ 1 min	35

3.4.3. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento direto do produto da PCR do gene *TP53* foi realizado no seqüenciador automático ABI Prism – 3130 (Applied Biosystem, USA). A metodologia utilizada baseia-se na síntese bioquímica da cadeia de DNA, através do método Sanger *et al.*, (1997) pelo kit ABI PRISM™ Big Dye 3.1v Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem, USA).

As fitas de DNA foram sequenciadas na direção 5' - 3', utilizando-se para isso os primers “*TP53F* - Foward e *TP53R* - Reverse”. As seqüências nucleotídicas produzidas foram diretamente editadas no programa Sequencing analysis V 5.2 em computador Dell, acoplado ao seqüenciador ABI prism 3130 DNA Sequencer. Posteriormente as seqüências foram exportadas para um PC para análises posteriores com auxílio do programa ChromasPro V1.3.3.

4. RESULTADOS

A amostra investigada foi composta de 263 indivíduos das populações da Amazônia no estado do Pará (Belém - 100, Monte Alegre - 64, Prainha - 50 e Alenquer - 49).

Foram geradas 519 seqüências com o objetivo de analisar as possíveis alterações nucleotídicas presentes nos éxons 4 e 7 do gene *TP53*, além de parte dos íntrons que flanqueiam o éxon 7. Todas as alterações encontradas estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Entre os indivíduos estudados observaram-se as seguintes alterações:

- Uma mudança de G → C no códon 72 (éxon 4) que altera o aminoácido Arginina para Prolina (Figuras 5, 6, 7);
- Três alterações no íntron 7, C → T na posição 13.436 do gene (Figuras 8, 9), C → T na posição 13.491 e T → G na posição 13.511 (Figuras 10, 11, 12).

4.1 ANÁLISE DO ÉXON 4 NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

Belém - Em relação à investigação desse polimorfismo na população de Belém, foram totalizadas 100 amostras, das quais obtivemos resultados em 98 indivíduos. Como resultado observou-se: 49% das amostras com o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G), 40,8% apresentaram o genótipo em heterozigose Arg/Pro (G/C), enquanto 10,2% apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), conforme Tabela 3. Como frequência alélica foi observado um valor $TP53^{*72}C$ 0,306.

Monte Alegre - No presente estudo foram investigadas e analisadas 64 amostras dessa população, sendo identificadas apenas alterações referentes ao polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*. Os resultados apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G) em 48,4% dos indivíduos, o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C) foi observado em 42,2%, enquanto 9,4% dos indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), conforme apresentado na Tabela 3. O resultado de frequência do alelo $TP53^{*72}C$ nessas populações foi 0,305.

Prainha - No presente estudo foram investigadas e analisadas 50 amostras dessa população, sendo identificadas apenas alterações referentes ao polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*. Os resultados apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G) em 52% dos indivíduos, o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C) foi observado em 38%, enquanto 10% dos indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), conforme apresentado na Tabela 3. O resultado de frequência do alelo $TP53^{*72}C$ nessas populações foi 0,29.

Alenquer - No presente estudo foram investigadas e analisadas 49 amostras dessa população, sendo identificadas apenas alterações referentes ao polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*. Os resultados apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G) em 44,9% dos indivíduos, o genótipo (em

heterozigose) Arg/Pro (G/C) foi observado em 40,8%, enquanto 14,3% dos indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), conforme apresentado na Tabela 3. O resultado de frequência do alelo $TP53^{*72}C$ nessas populações foi 0,347.

Tabela 3: Resultados encontrados na genotipagem do éxon 4 do gene *TP53* nas populações estudadas.

Genótipos	Belém	Monte Alegre	Prainha	Alenquer
Homozigoto G/G	48	31	26	22
Heterozigoto G/C	40	27	19	20
Homozigoto C/C	10	6	5	7

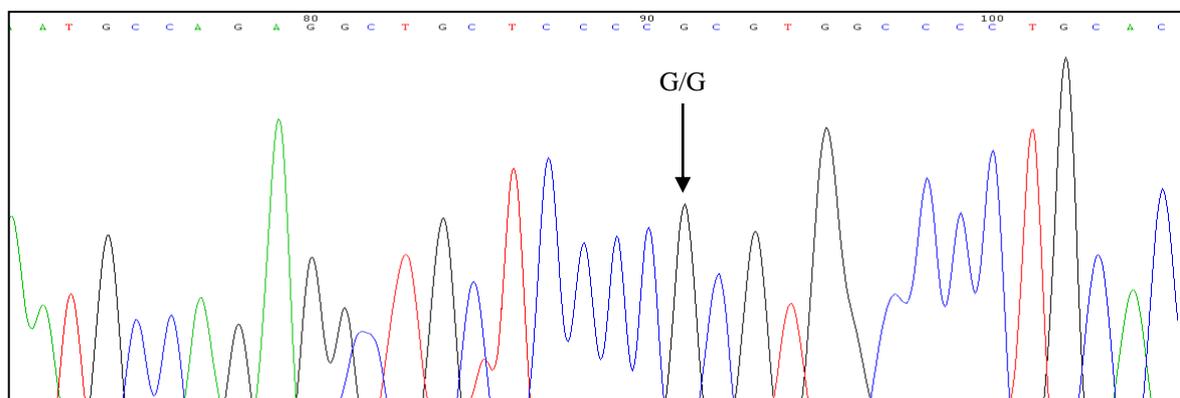


Figura 5: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G).

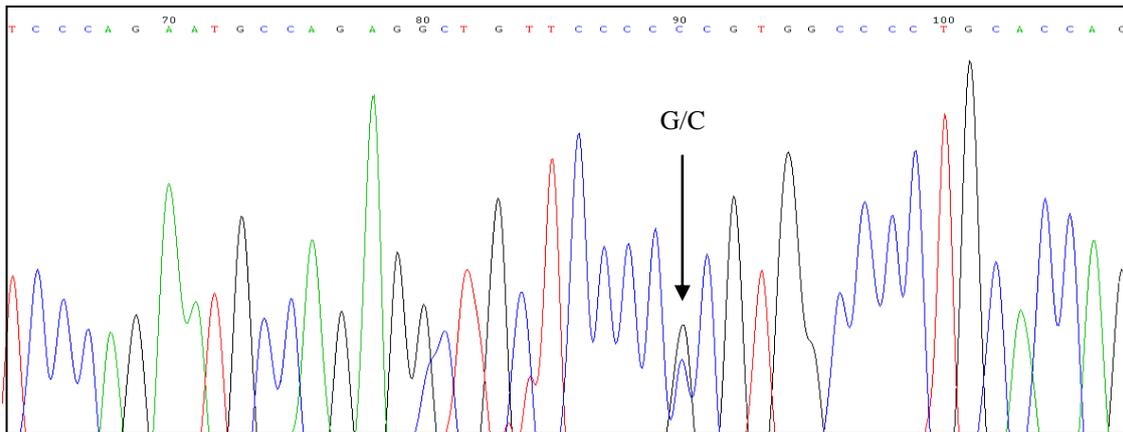


Figura 6: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo em heterozigose Arg/Pro (G/C).

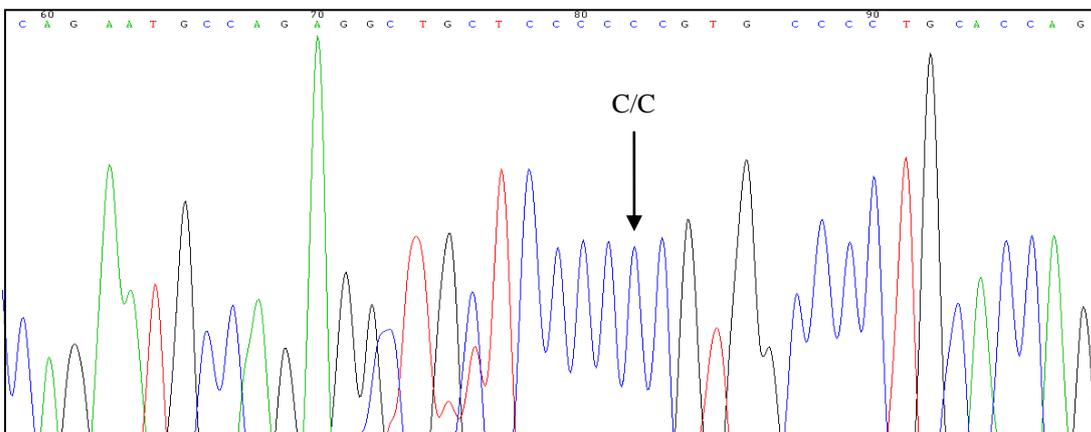


Figura 7: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo Pro/Pro (C/C).

4.2. ANÁLISE DO ÉXON 7 E REGIÕES ADJACENTES NAS POPULAÇÕES DE ALENQUER E BELÉM

Belém - Foram investigadas um total de 100 amostras dessa população, das quais obtivemos resultado em 98 indivíduos, sendo identificadas duas alterações no íntron 7 (C → T na posição 13.491 do gene e T → G na posição 13.511). Não foi encontrada nessa amostra nenhuma alteração de C → T na posição 13.436 do gene. Os resultados observados em relação às alterações nas posições 13.491 e 13.511 foram de 79,6% das amostras com os genótipos

selvagens C/C e T/T; enquanto que 19,4% apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G; e 1% com os genótipos T/T e G/G conforme a Tabela 4. Como frequência alélica foram observados valores de $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,107.

Monte Alegre - Foram investigadas um total de 64 amostras dessa população, das quais obtivemos resultado em 61 indivíduos, sendo identificadas duas alterações no íntron 7 (C → T na posição 13.491 do gene e T → G na posição 13.511). Não foi encontrada nessa amostra nenhuma alteração de C → T na posição 13.436 do gene. Os resultados observados em relação às alterações nas posições 13.491 e 13.511, foram de 77% das amostras com os genótipos selvagens C/C e T/T; enquanto que 23% apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G; nenhum indivíduo apresentou os genótipos T/T e G/G conforme Tabela a 5. Como frequência alélica foram observados valores de $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,115.

Prainha - Foram investigadas e analisadas um total de 50 amostras dessa população, sendo identificadas duas alterações no íntron 7 (C → T na posição 13.491 do gene e T → G na posição 13.511). Não foi encontrada nessa amostra nenhuma alteração de C → T na posição 13.436 do gene. Os resultados observados em relação às alterações nas posições 13.491 e 13.511, foram de 86% das amostras com os genótipos selvagens C/C e T/T; enquanto que 14% apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G; nenhum indivíduo apresentou os genótipos T/T e G/G conforme a Tabela 6. Como frequência alélica foram observados valores de $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,07.

Alenquer - Foram investigadas e analisadas um total de 49 amostras dessa população, sendo identificadas três alterações no íntron 7 (C → T na posição 13.436 do gene, C → T na posição 13.491 e T → G na posição 13.511). Os resultados apresentaram em relação à posição 13.436, o genótipo selvagem C/C em 98% dos indivíduos; enquanto que o genótipo (em heterozigose) C/T foi observado em 2%; e nenhum indivíduo apresentou essa alteração em homozigose (T/T), conforme apresentado na Tabela 7. O resultado da

freqüência do alelo $TP53^{*13.436}T$ nessa população foi 0,01. Em relação as alterações nas posições 13.491 e 13.511, observaram-se 77,6% das amostras com os genótipos selvagens C/C e T/T; enquanto que 16,3% apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G; e 6,1% com os genótipos T/T e G/G conforme a Tabela 7. Como freqüência alélica foram observados valores de $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,143.

Tabela 4: Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene $TP53$ na população de Belém.

Genótipos	13.436 C→T	13.491 C→T	13.511 T→G
Homozigoto C/C - C/C - T/T	98	78	78
Heterozigoto C/T - C/T - T/G	0	19	19
Homozigoto T/T - T/T - G/G	0	1	1

Tabela 5: Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene $TP53$ na população de Monte Alegre.

Genótipos	13.436 C→T	13.491 C→T	13.511 T→G
Homozigoto C/C - C/C - T/T	61	47	47
Heterozigoto C/T - C/T - T/G	0	14	14
Homozigoto T/T - T/T - G/G	0	0	0

Tabela 6: Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene *TP53* na população de Prainha.

Genótipos	13.436 C→T	13.491 C→T	13.511 T→G
Homozigoto C/C - C/C - T/T	50	43	43
Heterozigoto C/T - C/T - T/G	0	7	7
Homozigoto T/T - T/T - G/G	0	0	0

Tabela 7: Resultados encontrados na genotipagem do éxon e íntron 7 do gene *TP53* na população de Alenquer.

Genótipos	13.436 C→T	13.491 C→T	13.511 T→G
Homozigoto C/C - C/C - T/T	48	38	38
Heterozigoto C/T - C/T - T/G	1	8	8
Homozigoto T/T - T/T - G/G	0	3	3

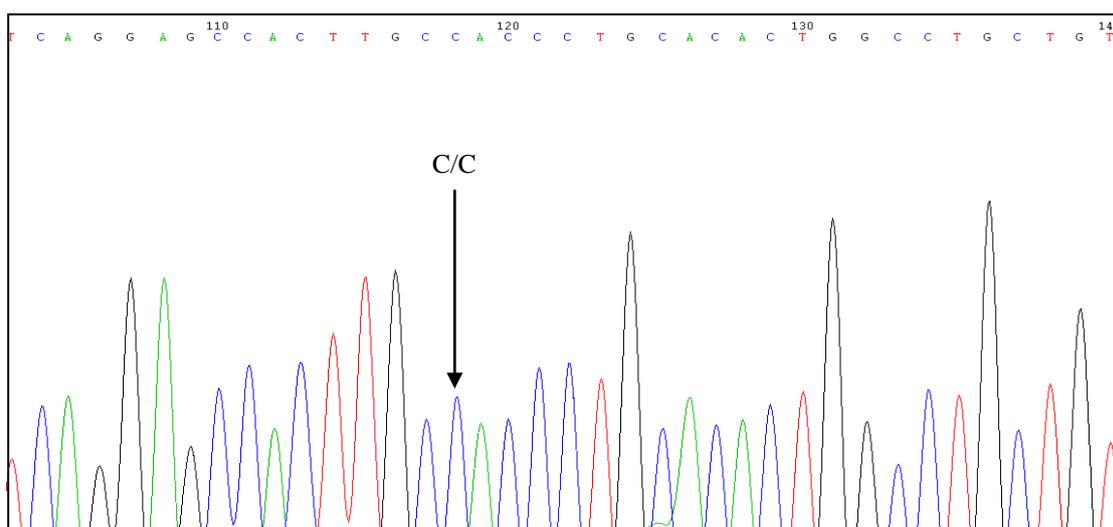


Figura 8: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo selvagem C/C (posição 13.436).

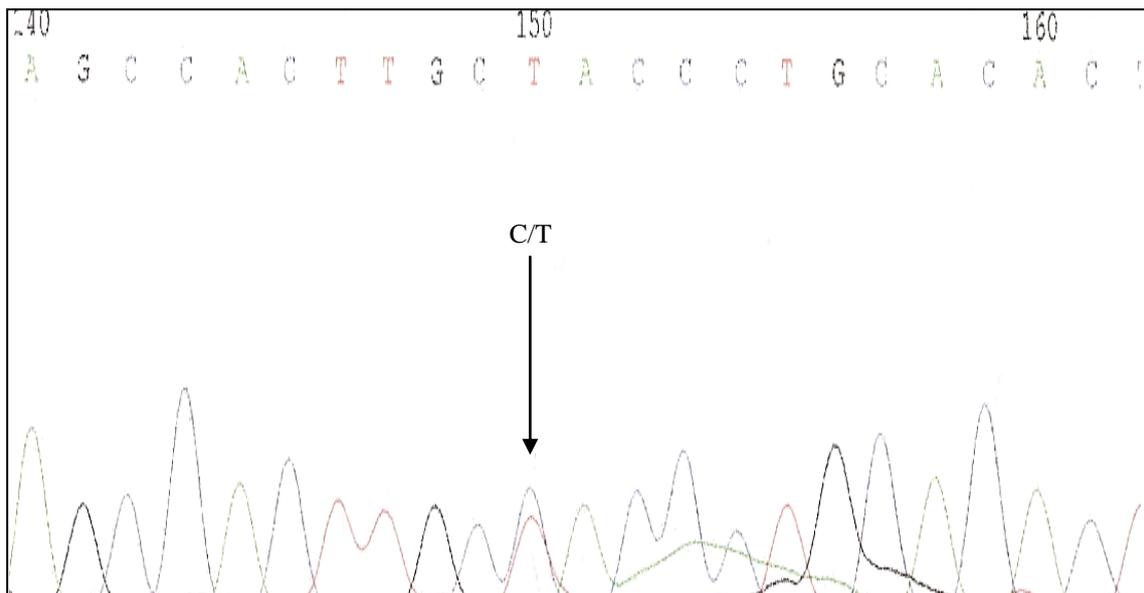


Figura 9: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou o genótipo em heterozigose C/T (posição 13.436) indicado pela seta.

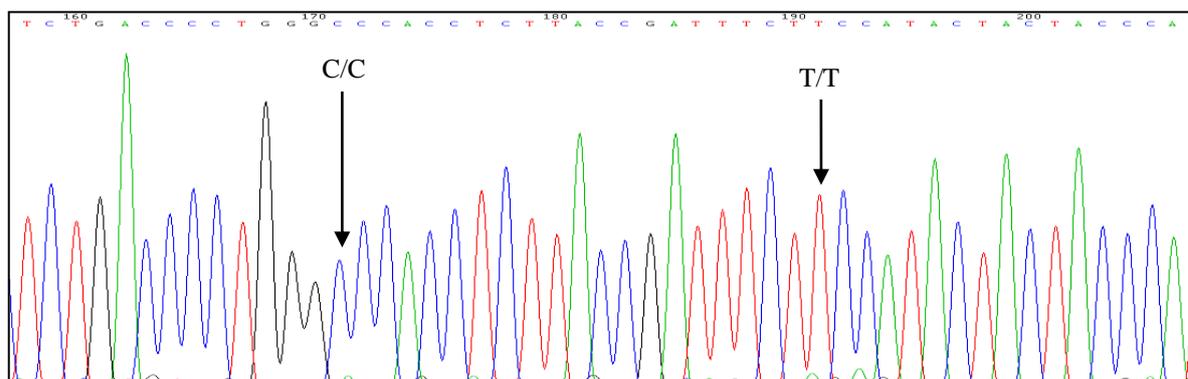


Figura 10: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou os genótipos selvagens C/C e T/T (posições 13.491 e 13.511 respectivamente) indicado pela seta.

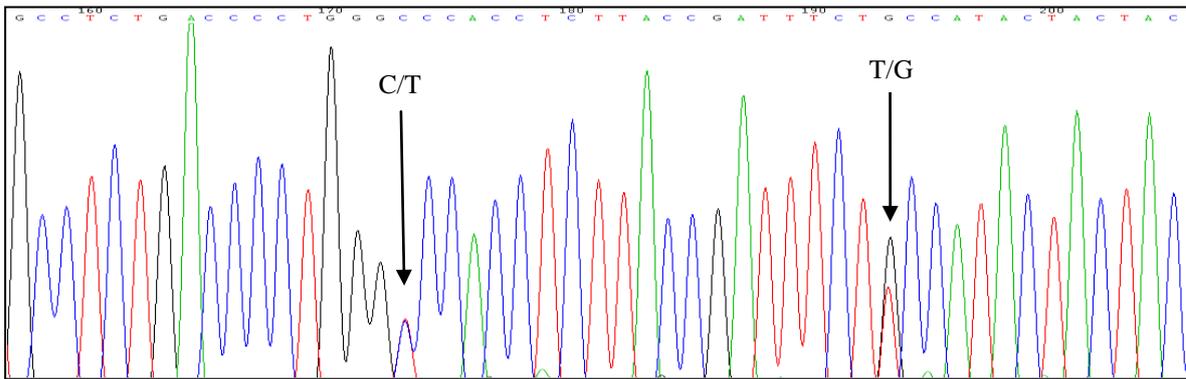


Figura 11: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou os genótipos em heterozigose C/T e T/G (posições 13.491 e 13.511 respectivamente) indicado pela seta.

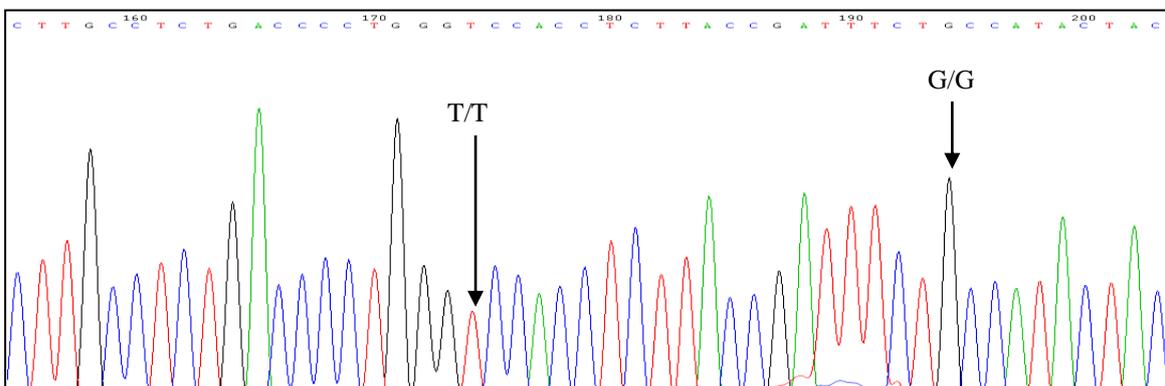


Figura 12: Eletroferograma de um indivíduo que apresentou as alterações em homozigose T/T e G/G (posições 13.491 e 13.511 respectivamente) indicado pela seta.

5. DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado as ações quimiotóxicas e radioativas do urânio, como causa de nefrotoxicidade, problemas reprodutivos e desenvolvimentais, assim como provocar mutações e favorecer o desenvolvimento de câncer (Harrison & Stather, 1996; Miller *et al.*, 1998; Durakovieae, 1999; McDiarmid, 2001; Craft *et al.*, 2004; Vacquier, 2009).

O presente estudo objetivou avaliar as mutações no gene de supressão tumoral, o *TP53*, nas populações de Belém, Monte Alegre, Prainha e

em Alenquer. Vale ressaltar, que as três últimas populações habitam uma das maiores reservas de urânio do mundo e desta forma estão expostas às baixas doses deste elemento radioativo, que podem modificar o ambiente celular e ocasionar alterações na molécula de DNA. As frequências das mutações encontradas nessas populações foram comparadas entre si e com outras populações estudadas e publicadas na literatura e em banco de dados internacionais. Estas alterações podem funcionar como biomarcadores de efeitos carcinogênicos, de radiosensibilidade e desenvolvimento de neoplasias (Gallo *et al.*, 2005; Alsbeih *et al.*, 2007).

A p53 não mutada responde normalmente à radiação com a elevação do seu nível de expressão, mediando a parada do ciclo celular e a ativação de genes de reparo (Lu-Hesselmann *et al.*, 2006; Niida & Nakanishi, 2006). Portanto, esta proteína é importante para o monitoramento de radiosensibilidade as altas ou baixas doses de radiação, combinadas ou não a outros tipos de estresses (Mitchel, 2005).

No presente estudo foram encontradas três mutações no íntron 7 (C → T na posição 13.436; C → T na posição 13.491, T → G na posição 13.511). Duas destas alterações foram encontradas com caráter de polimorfismo no íntron 7 (C → T na posição 13.491 e T → G na posição 13.511). No entanto, estas alterações não são representativas de susceptibilidade direta ao desenvolvimento de câncer.

Na análise da população de Belém, para as alterações das posições 13.491 e 13.511, observou-se que 78 indivíduos apresentaram os genótipos selvagens C/C e T/T, enquanto que 19 indivíduos apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G, e apenas um indivíduo apresentou o genótipo em homozigose T/T e G/G. Assim, a frequência dos alelos $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ nessa população foi de 0,107, enquanto que a frequência global para o mesmo alelo polimórfico descritas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) é de 0,159 e 0,157, respectivamente.

Em relação à análise da população de Monte Alegre para as alterações das posições 13.491 e 13.511, 47 indivíduos apresentaram os genótipos selvagens C/C e T/T, enquanto que 14 indivíduos apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G, e nenhum indivíduo apresentou o genótipo em homozigose T/T e G/G ($TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,115).

Em relação à análise da população de Prainha as alterações nas posições 13.491 e 13.511, 43 indivíduos apresentaram os genótipos selvagens C/C e T/T, enquanto que 7 indivíduos apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G, e nenhum dos indivíduos apresentou o genótipo em homozigose T/T e G/G ($TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$ 0,07).

Na análise realizada na população de Alenquer, para a posição 13.436 do gene *TP53*, 48 indivíduos apresentaram o genótipo selvagem C/C, enquanto que apenas um indivíduo apresentou o genótipo (em heterozigose) C/T, e nenhum indivíduo apresentou essa alteração em homozigose (T/T). A freqüência do alelo $TP53^{*13.436}T$ nessa população foi de 0,01, enquanto que a freqüência global desse alelo é 0,006. Em relação às alterações nas posições 13.491 e 13.511, observou-se que 38 indivíduos apresentaram os genótipos selvagens C/C e T/T; enquanto que oito apresentaram os genótipos em heterozigose C/T e T/G; e três apresentaram os genótipos T/T e G/G, respectivamente. Como freqüências dos alelos $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$, nessas populações, observou-se 0,143.

Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre a freqüência dos alelos $TP53^{*13.436}T$, $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$, quando comparadas as amostras das populações estudadas entre si, assim como quando comparadas com a freqüência na população global (Tabela 8).

No presente trabalho foi detectada um único tipo de alteração que efetivamente pode originar a troca de aminoácidos, presente no éxon 4. Essa variação trata-se de um polimorfismo que tem como consequência a mudança do aminoácido Arginina (CGC) pelo aminoácido Prolina (CCC). O alelo que codifica a Prolina é menos efetivo como fator de transcrição (realiza parada do ciclo celular, ativa a via apoptótica, ativa a expressão de genes relacionados ao reparo do DNA e reprime oncogenes), conduzindo à uma susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer (Dumont *et al.*, 2003). Portanto, indivíduos com genótipo $TP53^{72}C/C$ são mais radiosensíveis e se tornam alvos para as ações de saúde pública em regiões que apresentam radioisótopos.

ASSUMPÇÃO *et al.*, 2005 investigaram esse polimorfismo em 36 indivíduos de uma população de origem japonesa, residentes em Tomé-Açú, no estado do Pará, e observaram uma distribuição em 48% dos indivíduos a combinação genotípica Arg/Arg; 48% Arg/Pro e 4% Pro/Pro.

Inúmeros estudos que indicam a associação do polimorfismo com a susceptibilidade à carcinogênese (Dumont *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2007; Fernández-Rubio *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009).

De forma contrária, outros estudos envolvendo o polimorfismo não encontraram associação com o desenvolvimento de câncer (Khadang *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2008). Provavelmente estes trabalhos não encontraram associação porque o polimorfismo não é um fator determinante para o desenvolvimento de neoplasias e sim um fator de susceptibilidade. Indivíduos com o genótipo $TP53^{72}C/C$ só irão desenvolver câncer se expostos a diferentes fatores, incluídos os agentes mutagênicos e carcinogênicos, como as radiações (Alsbeih *et al.*, 2007).

KHAYAT *et al.*, 2005 estudaram um total de 56 pacientes com câncer gástrico e 56 indivíduos controles. Nesse estudo, não houve uma diferença estaticamente diferente entre a distribuição do alélica no códon 72 nos pacientes (Arg=0,73 e Pro=0,27) e controles (Arg=0,69 e Pro=0,31).

Na análise realizada na população de Belém, 48 indivíduos apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G); 40 apresentaram o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C); e 10 indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), com frequência do alelo $TP53^{*72}C$ de 0,306, enquanto que a frequência global para esse polimorfismo é de 0,352.

Em relação a população de Monte Alegre, 31 indivíduos apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G); 27 apresentaram o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C); e 6 indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), com frequência do alelo $TP53^{*72}C$ de 0,305.

Na análise realizada na população de Prainha, 26 indivíduos apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G); 19 apresentaram o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C); e 5 indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), com frequência do alelo $TP53^{*72}C$ de 0,29.

Na análise realizada na população de Alenquer, 22 indivíduos apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (G/G); 20 apresentaram o genótipo (em heterozigose) Arg/Pro (G/C); e 7 indivíduos apresentaram o genótipo Pro/Pro (C/C), com frequência do alelo $TP53^{*72}C$ de 0,347.

Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre a frequência do alelo $TP53^{*72}C$, quando comparadas as amostras das populações estudadas entre si, assim como quando comparadas com a frequência na população global (Tabela 9).

Adicionalmente, comparamos as amostras da população de Belém contra o conjunto de amostras das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer (Frequência do alelo $TP53^{*72}C$ de 0,313). O resultado também não apresentou diferença estatística significativa entre a frequência do alelo $TP53^{*72}C$, com valor de $P=0,7378$.

Tabela 8: Resultado do teste Qui-Quadrado na comparação das amostras estudadas e da população global em relação aos alelos $TP53^{*13.491}T$ e $TP53^{*13.511}G$.

Amostra	Belém	M. Alegre	Prainha	Alenquer	Pop. Global
Belém		P=0,3148	P=0,2581	P=0,3534	P=0,3739, P=0,3711 resp.
M. Alegre	P=0,3148		P=0,2673	P=0,3638	P=0,3824, P=0,3804 resp.
Prainha	P=0,2581	P=0,2673		P=0,3044	P=0,3246, P=0,3215 resp.
Alenquer	P=0,3534	P=0,3638	P=0,3044		P=0,4142, P=0,4119 resp.

Tabela 9: Resultado do teste Qui-Quadrado na comparação das amostras estudadas e população global em relação ao alelo $TP53^{*72}C$.

Amostra	Belém	M. Alegre	Prainha	Alenquer	Pop. Global
Belém		P=0,7301	P=0,7167	P=0,7639	P=0,7681
M. Alegre	P=0,7301		P=0,7155	P=0,7627	P=0,7675
Prainha	P=0,7167	P=0,7155		P=0,7511	P=0,7556
Alenquer	P=0,7639	P=0,7627	P=0,7511		P=0,7998

6. CONCLUSÃO

No presente estudo observaram-se as seguintes alterações:

- Uma mudança de G → C no códon 72 (éxon 4) que altera o aminoácido Arginina para Prolina;
- Três alterações no íntron 7 (C → T na posição 13.436 do gene, C → T na posição 13.491 e T → G na posição 13.511).
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre as populações de Belém, Monte Alegre, Prainha e Alenquer em relação às alterações nucleotídicas encontradas.
- As frequências das alterações não apresentaram diferenças estatísticas entre as populações estudadas e a população global.
- Na análise das populações investigadas observou-se que o polimorfismo do no códon 72 do éxon 4 do gene TP53 foi freqüente e adicionalmente a freqüência do alelo polimórfico não diferiu significativamente da população global.
- Os resultados do presente estudo apontam para a necessidade de maiores investigações, para que se possa mensurar o verdadeiro fator de risco para o desenvolvimento de câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSBEIH G, AL-HARBI N, AL-BUHAIRI M, AL-HADYAN K AND AL-HAMED M (2007). Association between TP53 codon 72 polymorphism and radiation sensitivity of human fibroblasts. *Radiation Research* 167: 535-540.
- ASSUMPÇÃO P.P. & BURBANO R. R. *Genética do Câncer. Atualização em Câncer Gástrico*. 2005. cap 7; 95-104.
- BECKMAN G, BIRGANDER R, SJALANDER A, SAHA N, HOLMBERG PA, KIVELA A AND BECKMAN L (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266-270.
- CADWELL C & ZAMBETTI GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277:15-35, 2001.
- CAO Z, SONG JH, PARK YK, MAENG EJ, NAM SW, LEE JY, PARK WS (2009). The p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to colorectal cancer in Korean patients. *Neoplasma* 56(2): 114-118.
- COSTA I, (2009). Caracterização do Gene *TP53* em Populações expostas ao Urânio nos municípios de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, estado do Pará, Brasil.
- CRAFT E, ABU-QARE A, FLAHERTY M, GAROFOLO M, RINCAVAGE H AND ABOU-DONIA M (2004) Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. part B, Critical reviews 7(4): 297-317.
- DUMONT P, LEU JI, DELLA PIETRA AC, GEORGE DL AND MURPHY M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics* 33: 357-365.

DURAKOVIC A (2001). On depleted uranium: Gulf War and Balkan syndrome. Croatian Medical Journal 42(2): 130-134.

EFEYAN A & SERRANO M (2007) p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. Cell cycle 6(9): 1006-1010.

FERNÁNDEZ-RUBIO A, LÓPEZ-CIMA MF, GONZÁLEZ-ARRIAGA P, GARCÍA-CASTRO L, PASCUAL T, MARRÓN MG, TARDÓN A (2008) The TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk in a population of Northern Spain. Lung Cancer 61(3): 309-316.

GALLO CVM, MENDONÇA GAS, MORAES E, OLIVIER M AND HAINAUT P (2005). TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. Mutation Research 589: 192-207.

GÜRAN E, TUNCAB Y, MIRZALIOLUB NI. Hereditary TP53 Codon 292 and Somatic P16INK4A Codon 94 Mutations in a Li-Fraumeni Syndrome Family. Cancer Genetics and Cytogenetics 113:145-151, Sep1999.

HAINAUT P & HOLLSTEIN M. P53 and human cancer: the first thousand mutations. Adv Cancer Res 2000; 77: 81-137.

HARRISON JD AND STATHER JW (1996) The assessment of doses and effects from intakes of radioactive particles. J Anat 189: 521-530.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>. Acesso em: 23 out . 2009.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Mapas. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/>. Acesso em: 23 out . 2009.

KHADANG B, FATTAHI MJ, TALEI A, DEHAGHANI AS AND GHADERI A (2007) Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 173(1): 38-42.

KHAYAT AS, GATTI LL, LIMA EM, ASSMPÇÃO PP, MOTTA FJN, HARADA ML, CASARTELLI C, PAYÃO SLM, SMITH MAC, BURBANO RR. Polymorphisms of the TP53 codon 72 and WRN códon 1367 in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clinical Exp. Med.* 5:161-168. 2005.

LEVINE AJ, MOMAND J AND FINLAY CA (1991) The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456.

LOURO ID, LLERENA JR. JC, VIEIRA DE MELO MS, ASHTON-PROLLA P AND CONFORTY-FRÓES N (2002). *Genética molecular do câncer*. 2 ed. MSG produção editorial, São Paulo, pp 25-30.

LU-HESSLMANN J, VAN BEUNINGEN D, MEINEKE V AND FRANKE E (2006). Influences of TP53 expression on cellular radiation response and its relevance to diagnostic biodosimetry for mission environmental monitoring. *Radiation Protection Dosimetry* 122(14): 237-243.

MCKURICK VA. *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*, 11th ed. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 1994.

MCDIARMID MA (2001) Depleted uranium and public health. *British Medical Journal* 322: 123-124.

MELO VP (1999) Avaliação da concentração do ²²²Rn nos ambientes internos e externos em residências do município de Monte Alegre, PA. Mestrado em Ciências, modalidade Biofísica. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Belém, 138p.

MILLER AC, BRAKELY WF, LIVENGOOD D, WHITTAKER T, XU J, EJNIK JW, HAMILTON MM, PARLETTE E, JOHN TS, GERSTENBERG HM AND HSU H (1998). Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uraniumuranyl chloride. *Environmental Health Perspectives* 106(8): 465-471.

MITCHEL REJ (2005) Radiation risk prediction and genetics: the influence of the TP53 gene in vivo. *Dose-Response* 3: 519-532.

NIIDA H & NAKANISHI M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21(1): 3-9.

NUSSBAUM R.L., MCINNES R.R., WILLARD H.F. Thompson & Thompson. *Genética Médica*. 6° edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

PERRONE F, MARIANI L, PASTORE E, ORSENIGO M, SUARDI S, MARCOMINI B, DARIVA L, LICITRA L, CARBONE A, PIEROTTI MA AND PILOTTI S (2007) p53 codon 72 polymorphisms in human papillomavirus-negative and human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Cancer* 109(12): 2461-2465.

PINTO GR, YOSHIOKA FK, SILVA RL, CLARA CA, SANTOS MJ, ALMEIDA JR, BURBANO RR, REY JA AND CASARTELLI C (2008) Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genetics and Molecular Research* 7(1): 207-216.

SAMBROOK J, FRITSCH EF AND MANIATIS T (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor 9.38–9.40.

SNUSTAD DP & SIMMONS MJ (2001) *Fundamentos de genética*. 2 ed. Guanabara Koogan, São Paulo, 756 pp.

SOUSA H, SANTOS AM, CATARINO R, PINTO D, VASCONCELOS A, LOPES C, BREDA E AND MEDEIROS R (2006) Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *European Journal of Cancer Prevention* 15(4): 362-366.

VACQUIER B (2009) Radon-associated lung cancer risk among French uranium miner: modifying factors of the exposure-risk relationship. *Radiation and Environmental Biophysics* 48: 1-9.

VARLEY JM. Germline TP53 Mutations and Li-Fraumeni Syndrome, *Human Mutation* 21:313-320. 2003.

VIEIRA JO, DA SILVA ID, HIGO PE, NOGUEIRA-DE-SOUZA NC AND GEBRIM LH (2008) Study of p53 codon 72 polymorphism in patients with breast cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology* 29(4): 364-367.

ZAMBETT GP (2007). The p53 mutation “gradient effect” and its clinical implications. *Journal of Cellular Physiology* 213: 370-373.

ZHOU Y, LI N, ZHUANG W, LIU GJ, WU TX, YAO X, DU L, WEI ML AND WU XT (2007) P53 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *International Journal of Cancer* 1211: 1481-1486.

ANEXO 1:

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°002/2007-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS E CARCINOGENÉTICOS DO URÂNIO COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE DE RESIDENTES DOS MUNICÍPIOS DE PRAINHA, MONTE ALEGRE E ALENQUER.
3. **Pesquisador Responsável:** Rommel Mario Rodriguez Burbano.
4. **Instituição / Unidade:**CCB/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 02/01/2007.
6. **Data do Parecer:** 09/01/2007.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 09 de janeiro de 2007.

Prof° Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.