

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA FAMÍLIA DE *TP53* E SUA VIA
REGULATÓRIA COM A LONGEVIDADE E A FERTILIDADE**

ALEXANDRE GARD REIMER

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau do Mestre em Genética e Biologia Molecular

ORIENTADORA: PROFª. DRA LAVÍNIA SCHÜLER-FACCINI

PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com o suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do INaGeMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional).

À memória de Dietrich Reimer,
meu querido avô e meu grande exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Lavínia, por ter aceitado me orientar e por sua infinita paciência e disposição em ensinar. Foi um privilégio poder integrar seu grupo de pesquisa e aprender a caminhar no mundo científico com seus ensinamentos. Muito obrigado.

Ao colega Juliano por sua colaboração e sua parceria, indispensáveis para a conclusão desse projeto. Com sua incrível capacidade de, se sentar com um aluno desesperado com seus resultados e seus prazos e, após uma simples conversa, fazer com que esse aluno saísse do laboratório com a certeza que tudo daria certo. Muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Elmo, que sempre colaborou de forma muito prestativa e com sua simpatia habitual

Aos colegas do Laboratório 113 pela colaboração e prontidão em resolver situações críticas para o desenvolvimento prático desse projeto, em especial a Luíza, a Thayne e a Thaís.

Meu agradecimento mais do que especial à minha namorada Lisiane pelo apoio incondicional e irrestrito, às discussões sobre vários aspectos do projeto, às térmicas de café durante as várias horas de leitura de artigos e a escrita do projeto e da presente dissertação, por ser uma pessoa com uma generosidade ímpar e ter a paciência em me acompanhar em mais essa empreitada.

Por fim a Deus no qual sempre tive fé para que a minha certeza nunca se tornasse uma dúvida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Fertilidade e Fecundidade	12
1.2	Envelhecimento e longevidade.....	14
1.3	Família do gene p53	15
1.3.1	<i>TP53</i>	18
1.4	Controle central da via regulatória da proteína p53	20
1.4.1	<i>MDM2</i>	20
1.4.2	<i>MDM4 (MDMX)</i>	22
1.4.3	<i>USP7 (HAUSP)</i>	24
1.5	<i>LIF</i>	26
1.6	Polimorfismos na via de p53 e reprodução	27
1.7	Monte Negro / RO.....	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral.....	32
2.2	Objetivos específicos.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Delineamento do estudo	33
3.2	Amostra	33
3.3	Coleta e processamento do material biológico.....	33
3.4	Análise dos polimorfismos.....	34
3.5	Análises estatísticas.....	35
3.6	Aspectos Éticos	35
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXO I	61
	ANEXO II	62

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Base nitrogenada adenina
ABO	Sistema sanguíneo ABO
ACP1	Sistema sanguíneo ACP1
ATP	Molécula energética Adenosina Tri Fosfato
C	Base nitrogenada citosina
CA2	Sistema sanguíneo CA2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DUBs	Enzimas desubiquitinantes
Fy	Sistema sanguíneo Fy
G	Base nitrogenada guanina
GLO1	Sistema sanguíneo GLO1
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
JAMM	Classe JAMM de enzimas desubiquitinantes
Kell	Sistema sanguíneo Kell
LIF	Gene do Fator Inibidor da Leucemia
lif	Proteína do gene LIF
MCPIPs	Classe MCPIP de enzimas desubiquitinantes
MDM2	Gene Mouse Double Minute 2
mdm2	Proteína do gene MDM2
MDM4	Gene Mouse Double Minute 4
mdm4	Proteína do gene MDM4
miRNAs	Micro RNAs
MJDs	Classe MJD de enzimas desubiquitinantes
MNSs	Sistema sanguíneo MNS
mRNA	RNA mensageiro
OTUs	Classe OTU de enzimas desubiquitinantes
p53	Proteína do gene TP53
p63	Proteína do gene TP63

p73	Proteína do gene TP73
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGM1	Sistema sanguíneo PGM1
PGR	Perda gestacional recorrente
PPM1G	Enzima fosfatase
Rh	Sistema sanguíneo Rh
RNA	Ácido ribonucléico
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Base nitrogenada timina
TP53	Gene p53
TP63	Gene p63
TP73	Gene p73
UCHs	Classe UCH de enzimas desubiquitinantes
USP7	Gene Ubiquitin Specific Peptidase 7
usp7	Proteína do gene USP7
USPs	Classe USP de enzimas desubiquitinantes

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Taxa de fecundidade total, segundo as Grandes Regiões - 1940/2010. Fonte: Censo demográfico IBGE 1940/2010.

Figura 2. Distribuição percentual de taxas específicas de fecundidade, por situação do domicílio, segundo os grupos de idade - Brasil - 2000/2010. Censo demográfico IBGE 1940/2010.

Figura 3. Identidade estrutural da família do gene TP53 (adaptado de Melino *et al*, 2002).

Figura 4. Evolução do gene ancestral (adaptado de Belyi *et al*, 2010).

Figura 5. Visão clássica da ativação e da resposta do gene *TP53* (adaptado de Bieging *et al*, 2014).

Figura 6. Restauração da viabilidade dos embriões em camundongos deficientes em *MDM2* pela deleção de p53 (adaptado de Luna *et al*, 1995).

Figura 7. Estrutura e localização dos domínios de mdm2 e mdm4 (adaptado de Perry, 2010).

Figura 8. Looping auto-regulatório de p53 por *MDM2* e *MDM4* (adaptado de Shangary *et al*, 2009).

Figura 9. A complexa inter-relação entre p53, mdm2, mdm4 e usp7 (adaptado de Vucic *et al*, 2011).

Figura 10. Camundongos A e E tratados com anti-lif. Camundongo I, controle. Setas indicando locais de implantação de blastocistos (adaptado de Kobayashi *et al*, 2014).

Figura 11. Localização do município de Monte Negro.

Figura 12. Diferenciação de indivíduos heterozigotos e homozigotos para os SNPs em estudo (resultados para o polimorfismo c.753+572C>T do gene *MDM4*. A - genótipo CC, B - genótipo CT e C - genótipo TT).

Tabela 1. Dados demográficos, obstétricos e clínicos da amostra estudada.

Tabela 2. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53*.

Tabela 3. Comparação das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* em diferentes populações.

Tabela 4. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com o número de gestações.

Tabela 5. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com a idade de início da menopausa.

Tabela 6. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com a idade de ocorrência da menarca.

Tabela 7. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com o período de menacme.

Tabela 8. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e relato de abortamentos na amostra.

Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e perdas gestacionais recorrentes.

Tabela 10. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e ocorrência de câncer em parentes de primeiro grau.

Tabela 11. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e possível relação com longevidade.

RESUMO

A longevidade e a fertilidade são características alvo de vários estudos na comunidade científica. Além dos efeitos de condições ambientais como alimentação e condições de vida na qual os organismos estão inseridos, existe o potencial genético inerente a cada indivíduo. Esse estudo teve como objetivo ajudar a trilhar o caminho no sentido de elucidar o impacto de alguns polimorfismos de determinados genes na longevidade e na fertilidade de seres humanos. Foi avaliada a frequência dos polimorfismos c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53*, c.325-4742T>G (rs1706395) do gene *TP63*, 4c.-30G>A e 14c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) do gene *TP73*, c.753+572C>T (rs1563828) do gene *MDM4*, c.2719-234G>A (rs1529916) do gene *USP7* e c.*1414A>C (rs929271) do gene *LIF* em um grupo composto por indivíduos da região norte do Brasil. Por meio da técnica TaqMan SNP genotyping assay, e subsequente análise estatística, encontrou-se significância ($P = 0,044$) para a frequência (82,4%) do alelo T do polimorfismo de *LIF* no grupo com o maior número de gestações, apontando para uma influência positiva desse alelo no número de gestações e para a frequência (67,7%) do genótipo GC do polimorfismo de *TP53* ($P = 0,033$) com o início da menopausa antes dos 51 anos de idade, o que pode ser uma manifestação fenotípica do processo de envelhecimento. Notadamente, os polimorfismos do *TP53* e da sua rota de sinalização são importantes para processos relacionados à fertilidade e a longevidade, bem como de outros aspectos fisiológicos e na etiologia de várias patologias. Este trabalho contribui com um melhor esclarecimento quanto ao impacto de alguns polimorfismos especificamente no processo reprodutivo humano e em sua longevidade. Os resultados obtidos apontam para um possível papel desses genes e de seus polimorfismos nos aspectos supracitados ajudando na sua compreensão.

ABSTRACT

The longevity and fertility are targeted characteristics of various studies in the scientific community. In addition to the effects of environmental conditions such as food and living conditions in which the organisms are inserted, there is the genetic potential inherent in each individual. This study aimed to help pave the way towards elucidating the impact of some polymorphisms of certain genes in longevity and fertility of humans. Was evaluated the frequency of the polymorphisms c.215G>C (P72R, rs1042522) of the *TP53* gene, c.325-4742T>G (rs1706395) of the *TP63* gene, 4c.-30G>A and 14c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) of the *TP73* gene, c.753+572C>T (rs1563828) of *MDM4* gene, c.2719-234G>A (rs1529916) of *USP7* gene and c.*1414A>C (rs929271) of *LIF* gene in a group composed by individuals from the northern region of Brazil. By TaqMan SNP genotyping assay technique, and subsequent statistical analysis, significance was found ($P = 0.044$) for the frequency (82.4%) of *LIF* allele polymorphism T in the group with the highest number of pregnancies, pointing to a positive influence of this allele on the number of pregnancies and the frequency (67.7%) of the CG genotype of the polymorphism *TP53* ($P = 0.033$) with the onset of menopause before 51 years old, which may be a phenotypic expression of aging process. Notably, the polymorphisms of *TP53* and its signaling pathway are important for processes related to fertility and longevity, as well as other physiological aspects and etiology of various diseases. This work contributes to a better understanding about the impact of some polymorphisms specifically in the human reproductive process and its longevity. The results point to a possible role of these genes and their polymorphisms in the above aspects in helping your understanding.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fertilidade e Fecundidade

Fertilidade e fecundidade são termos que freqüentemente se confundem, mas possuem diferentes significados. Com a intenção de melhor compreendermos os aspectos relacionados a cada um desses conceitos se faz necessária uma distinção, entre a capacidade de ter filhos e o número de filhos nascidos durante a menacme. O termo fecundidade se refere à capacidade fisiológica de conceber, enquanto fertilidade se refere ao número de nascimentos (National Research Council, 2003).

As taxas de fecundidade no Brasil vêm caindo bastante nas últimas décadas. Na década de 60 a fecundidade total no Brasil era de mais de 6 filhos por mulher, chegando a 1,9 filho por mulher em 2010 com algumas variações regionais relativas a peculiaridades inerentes as grandes regiões brasileiras (Figura 1).

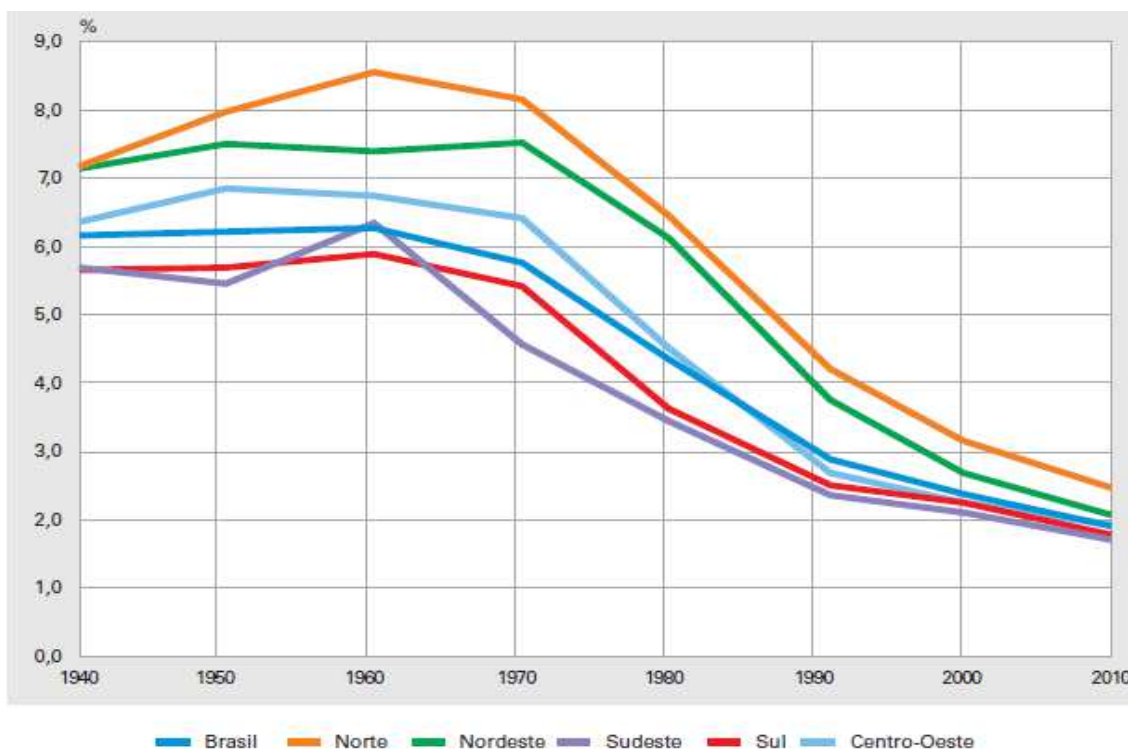


Figura 1. Taxa de fecundidade total, segundo as Grandes Regiões - 1940/2010. Fonte: Censo demográfico IBGE 1940/2010.

As taxas de fertilidade aumentam constantemente durante a primeira década do período reprodutivo, atingindo o pico na terceira década de vida (Figura 2). Durante a quarta década de vida, os níveis de fertilidade começam a declinar. Ao nascimento as mulheres contam com um pool de 500.000 a 1.000.000 de oócitos que vai sendo depletado ao longo de suas vidas (Wilkosz, 2014). A redução do pool de oócitos, o aumento de aneuploidias e as taxas de abortos associados à idade têm implicações importantes na biologia humana e fertilidade. O processo de envelhecimento ovariano e o momento dos eventos reprodutivos são fatores de risco importantes para várias doenças incluindo câncer de mama e ovário, doença cardiovascular, osteoporose e mortalidade em geral (Hartge, 2009).

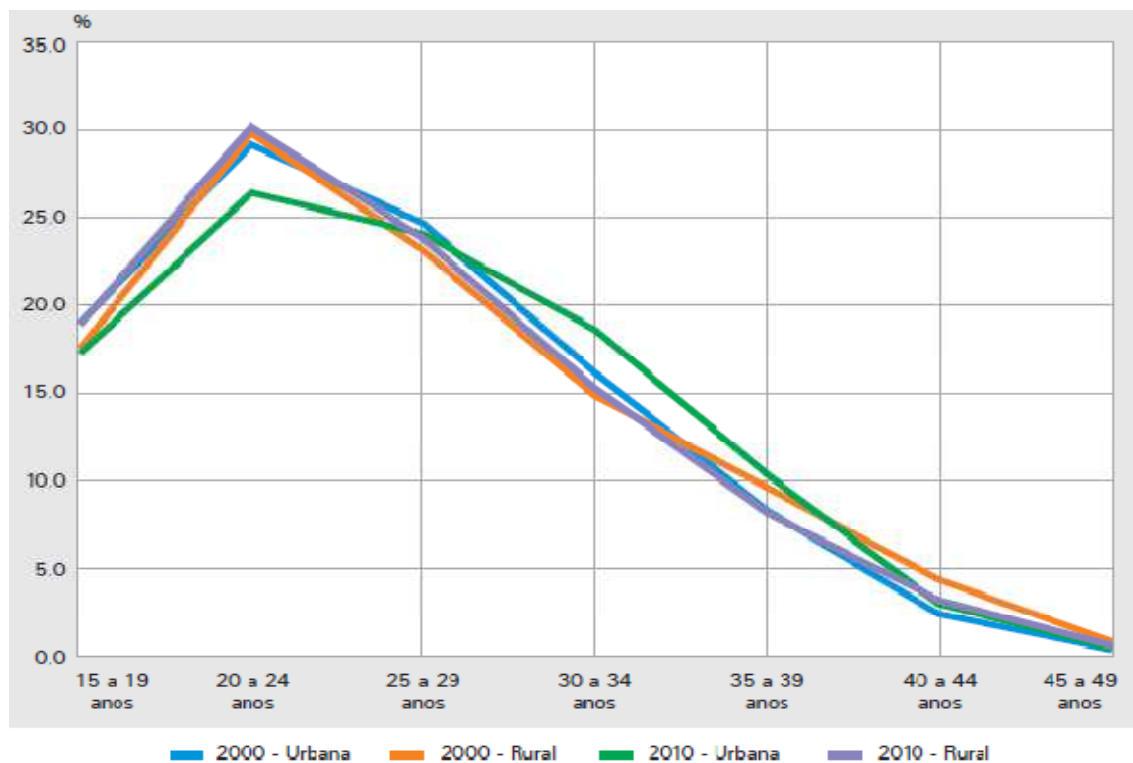


Figura 2. Distribuição percentual de taxas específicas de fecundidade, por situação do domicílio, segundo os grupos de idade - Brasil - 2000/2010. Censo demográfico IBGE 1940/2010.

A gravidez é um processo biológico complexo que requer a sincronia de uma série de eventos que vão desde a união de células gaméticas nas tubas uterinas a fatores que promoverão a interação entre o embrião em desenvolvimento e o endométrio

uterino materno que permitirão, por fim, a implantação desse embrião no tecido uterino e a consolidação da etapa inicial da gravidez. O sucesso da implantação do embrião no endométrio é crucial para que a gravidez ocorra de forma adequada. Do ponto de vista clínico, a implantação do embrião é considerada um sucesso quando o saco gestacional pode ser detectado por meio de um exame de ultra-sonografia (Timeva, 2014).

Em mamíferos, a gravidez começa no momento da implantação do blastocisto ao tecido endometrial que passa por várias mudanças morfológicas e fisiológicas para receber e manter esse embrião em desenvolvimento (Liu, 2015). Durante o processo de implantação do blastocisto ocorre uma intensa troca de sinais entre o embrião e o tecido endometrial materno que, acredita-se, sejam cruciais para que o processo de implantação ocorra com sucesso e seu desenvolvimento subsequente possa ocorrer de maneira adequada (Ventura-Juncá, 2015).

Entretanto, sabe-se pouco a respeito dos genes e variantes envolvidos no desenvolvimento do ovário e estabelecimento da reserva ovariana, bem como da implantação do embrião e a manutenção da gravidez que dependem de fatores como angiogênese, vascularização e apoptose (Toth et al., 2011).

1.2 Envelhecimento e longevidade

A taxa de envelhecimento biológico pode ser entendida como o declínio das capacidades fisiológicas e biológicas com a idade, acompanhado de um aumento na chance de morte, e pelo fato de que uma maior sobrevivência requer investimentos na manutenção de células somáticas, desviando recursos do crescimento e reprodução. Teorias sobre tempo de vida e envelhecimento são baseadas em um trade-off realizado pelo organismo entre o investimento em crescimento somático (como o acúmulo de potencial reprodutivo, por exemplo) e o investimento no esforço reprodutivo (ou seja, a exploração do potencial reprodutivo). Uma consequência dessa hipótese é que, o investimento limitado na manutenção somática pode resultar em danos que se acumulam durante a vida, levando assim ao envelhecimento (Kirkwood, 1997). Além disso, envelhecimento e longevidade dependem de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e culturais.

O acúmulo de danos no DNA causa instabilidade genômica e disfunção celular, o que pode resultar em câncer em um organismo com tecidos renováveis. A ameaça

causada pela instabilidade genômica é protegida, por um lado, por genes *caretaker*, que incluem genes para o reparo do DNA e são considerados genes que garantem a longevidade, e por outro lado, por genes *gatekeeper*, que incluem genes para parada do ciclo celular e morte celular, sendo considerados supressores tumorais (Campisi, 2003). A atividade aumentada dos genes *caretaker* aumenta a estabilidade genômica, reduz o risco ao câncer adiando o envelhecimento.

Porém, a relação entre as funções dos genes *gatekeeper* e o processo de envelhecimento é mais complexo, pois a eliminação de células por apoptose pode diminuir o risco ao câncer, mas ao mesmo tempo acelerar a diminuição das células do tecido relacionada à idade (van Heemst et al., 2005). Em mamíferos, o gene *TP53* é o mais importante gene *gatekeeper* (Vogelstein et al., 2000).

1.3 Família do gene p53

Esta família de genes é composta por três genes: o gene *TP53*, e dois homólogos funcionais e estruturais, *TP63* e *TP73*. Esses três genes possuem uma alta homologia em sítios de ligação ao DNA bem como em sua estrutura protéica (Figura 3), com os genes *TP63* e *TP73* sendo mais próximos entre si do que com *TP53*. A competição para se ligar ao DNA por meio de seu domínio de ligação sugere que *TP53*, *TP63* e *TP73* podem ou cooperar ou competir por alvos transcricionais em comum (Paskulin, 2012).

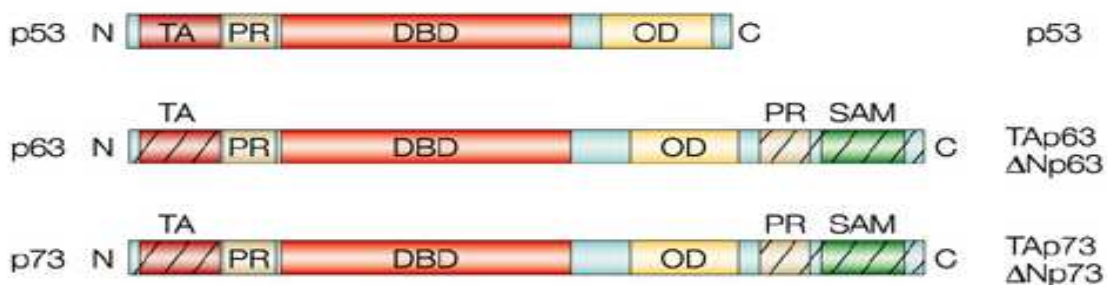


Figura 3. Identidade estrutural da família do gene *TP53* (adaptado de Melino et al, 2002).

Esses três genes possuem um ancestral gênico comum, ou, por assim dizer, um gene ancestral do qual derivam. A origem desse gene ancestral pode ser encontrada

atualmente em coanoflagelados e em anêmonas marinhas. Nesses organismos a estrutura desse gene ancestral se parece mais com um híbrido dos genes *TP63* e *TP73*. A função desse gene ancestral, na anêmona marinha, é proteger as células germinativas de danos ao seu DNA. Esta função persiste em insetos, vermes, moluscos, vertebrados e humanos sendo importante, e positivamente pressionada pela seleção natural, ao longo dos últimos 1 bilhão de anos (Belyi, 2010). Devido a sua conservação a partir de invertebrados até vertebrados, sugere-se que supressão tumoral não seja a função original do gene *TP53* (Feng *et al.*, 2011).

Na linhagem inicial dos vertebrados, caracterizada pelos peixes cartilaginosos, esse gene foi duplicado e um gene muito próximo ao *TP53* emergiu (Figura 4). Atuando em organismos complexos, onde células tronco somáticas eram empregadas na regeneração de tecidos adultos, esse gene passou a desempenhar uma função de supressor tumoral protegendo essas células e suas linhagens subsequentes de mutações que poderiam advir de danos ao DNA ou falhas no processo de replicação. Assim o gene *TP53* assumia funções em células somáticas que o gene ancestral desempenhava nas células germinativas (Belyi, 2010).

Com o surgimento dos peixes ósseos houve uma segunda duplicação do gene ancestral produzindo os genes *TP63* e *TP73* (Figura 4). Conforme os vertebrados iam evoluindo, há evidências de que as funções desses genes foram aumentando e que passaram a atuar como reguladores transcricionais para o desenvolvimento da pele e de outros órgãos (*TP63*) e desempenhando um papel no desenvolvimento de partes dos sistemas imune e nervoso (*TP73*).

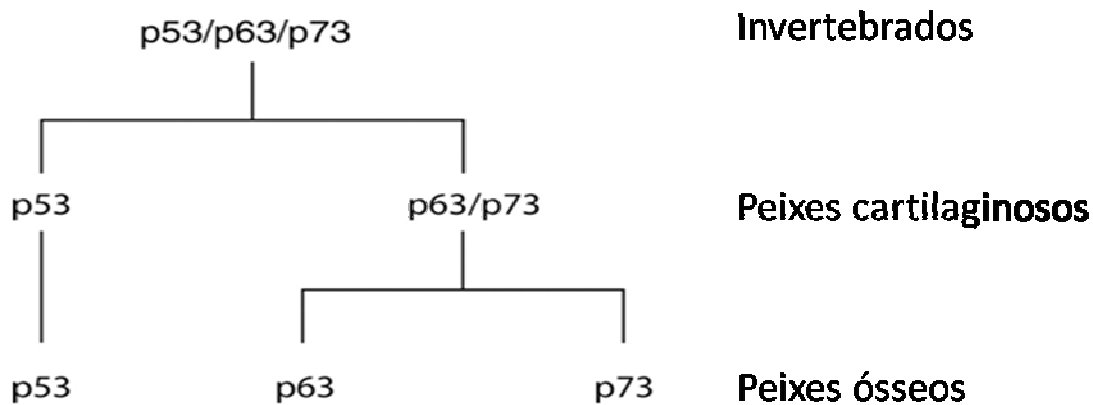


Figura 4. Evolução do gene ancestral (adaptado de Belyi *et al*, 2010).

Existem evidências de que alelos do gene *TP63* estavam sob forte pressão seletiva na época em que os répteis mais avançados (davam a luz a animais vivos ao invés de colocar ovos) começavam a se transformar em mamíferos durante o período cretáceo (145,5 – 65,5 milhões de anos), que os alelos do gene *TP73* foram fortemente selecionados na grande diversificação dos mamíferos durante o período terciário (65,5 – 23 milhões de anos) e que alelos do gene *TP53* estavam sob forte pressão seletiva nos últimos 30.000 a 50.000 anos da evolução humana com o surgimento de populações caucasianas e asiáticas. Percebe-se, então, uma tendência onde forças evolutivas moldaram os genes *TP53*, *TP63* e *TP73* e as funções desses genes moldaram a fidelidade dos descendentes produzidos por esses organismos e as variações que foram então expostas aos efeitos da seleção natural.

Os genes *TP53*, *TP63* e *TP73* são poderosos fatores de transcrição e pequenas variações em seus mecanismos regulatórios podem ter um impacto profundo nos genes que tem sua transcrição regulada por eles o que pode modificar drasticamente o destino de uma célula. Os genes desta família estão relacionados com câncer, desenvolvimento, células tronco, imunidade natural, estresse oxidativo, longevidade, entre outros processos fisiológicos e patológicos. Em função desse amplo espectro de atuação, os membros da família do gene *TP53* são representantes de uma das mais poderosas famílias de genes de nosso genoma (Levine, 2011).

A desregulação na expressão do gene *TP53* também pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário. Estudos indicam que *TP53* desempenha papel chave na proteção de embriões a teratógenos e diversos estresses ambientais. Uma grande

quantia da proteína *TP53* é produzida pela placenta humana em gestações anormais, podendo ser um importante fator de risco para a patogênese de doenças placentárias através da indução da apoptose trofoblástica (Brady, 2010).

Experimentos com camundongos demonstraram o envolvimento dos genes da família *TP53* na reprodução onde a atividade de *TP53* é necessária para a implantação do embrião no útero através da regulação transcricional do Fator Inibidor da Leucemia (Leukaemia inhibitor factor, *LIF*) (Hu, 2009), enquanto *TP63* atua no controle da qualidade e na sobrevivência do pool de oócitos e *TP73* garante que os processos mitóticos ocorram de maneira normal no blastocisto inicial (Levine, 2011).

1.3.1 *TP53*

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53* (Tumor protein p53), foi identificada em 1979 e desde então passou a ser um dos genes mais estudados, tendo seu papel estabelecido como chave na supressão tumoral, também conhecido como “o guardião do genoma”. Localizado no cromossomo 17p13, *TP53* codifica fatores de transcrição que, através da regulação transcricional de um grupo de genes, podem iniciar a apoptose, parada no ciclo celular e senescência, em resposta a sinais de estresse como, por exemplo, danos no DNA (Figura 5). Assim, a proteína p53 tem conhecida importância na prevenção de tumores e na estabilidade genômica de células somáticas (Biegging, 2014).

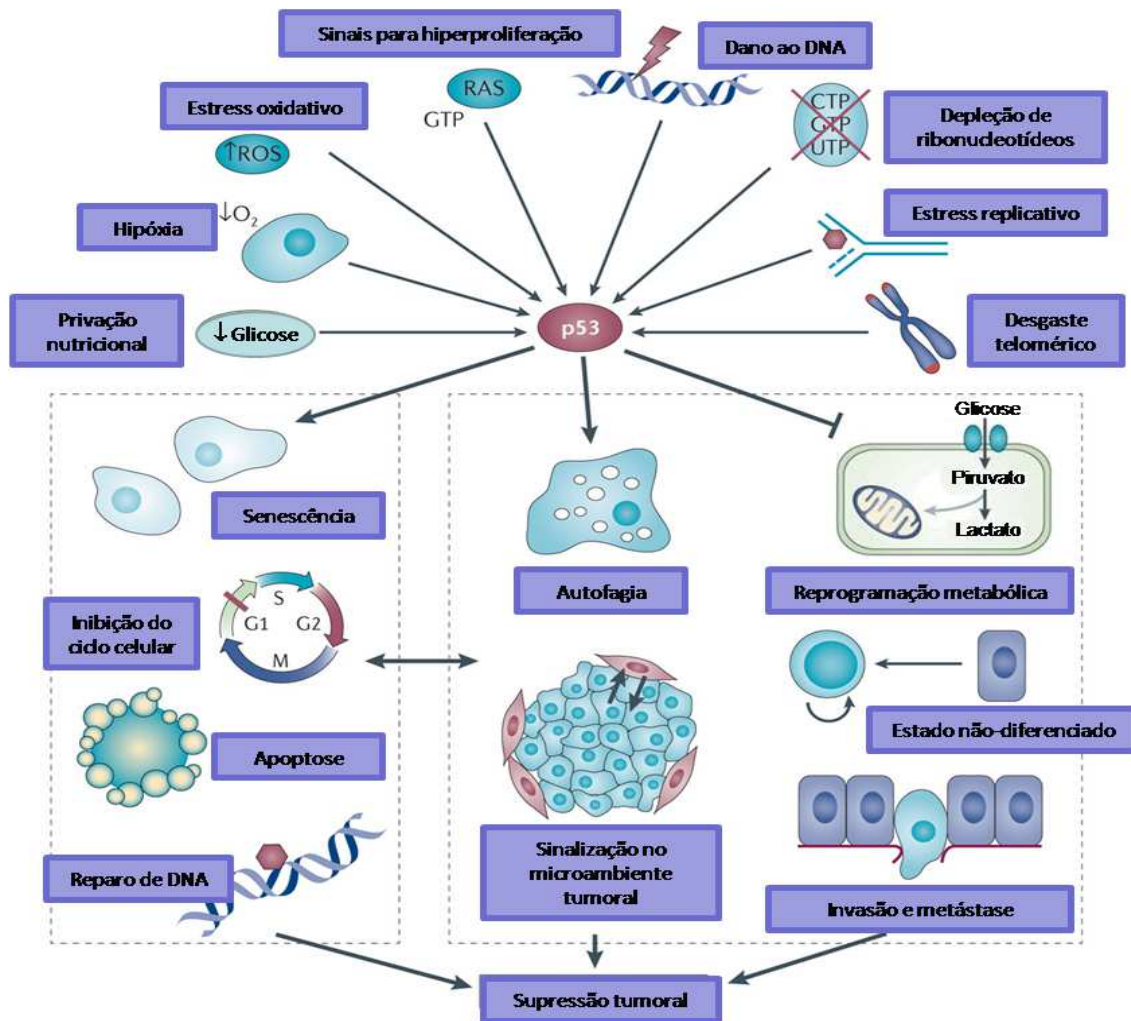


Figura 5. Visão clássica da ativação e da resposta do gene *TP53* (adaptado de Bieging *et al*, 2014).

Porém quanto mais esse gene é estudado mais funções e mecanismos de ação emergem em diferentes níveis e sistemas funcionais (Brady, 2010). Estudos recentes têm mostrado que o gene *TP53*, atuando como fator de transcrição, controla a expressão de genes e miRNAs afetando vários processos celulares incluindo proliferação celular, reparo de DNA, morte celular programada, autofagia, metabolismo e migração celular. Muitos desses processos são críticos em uma variedade de patologias humanas e estendem-se muito além do controle do câncer a situações envolvendo isquemias, doenças neurodegenerativas, renovação de células tronco, envelhecimento e fertilidade (Reed, 2015).

1.4 Controle central da via regulatória da proteína p53

O controle central da via regulatória da proteína p53 é composto, principalmente, por três genes e seus produtos protéicos: *MDM2* (Mouse double minute 2 p53 binding protein homolog), *MDM4* (Mouse double minute 4 p53 binding protein homolog, também conhecido como *MDMX*), e *UPS7* (ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated), também conhecido como *HAUSP* (herpes virus-associated ubiquitin specific protease)) (Brooks e Gu 2006).

1.4.1 *MDM2*

O produto do gene *MDM2*, localizado no cromossomo 12q14.3-q15, a proteína *mdm2* é o principal regulador negativo do gene *TP53*. Inicialmente se acreditava que *mdm2* era a única enzima E3 ubiquitina ligase que tinha como alvo p53, mas estudos posteriores mostraram que mesmo em camundongos que não expressavam *mdm2* p53 ainda era degradada, indicando o envolvimento de outras E3 ligases na regulação da atividade de *TP53* (Ringshausen, 2006).

A proteína *mdm2* atua sobre o produto do gene *TP53* através de um sitio ativo como uma E3 ubiquitina ligase, induzindo a ubiquitinação de resíduos de lisina na sua região carboxi-terminal, direcionando assim a proteína de p53 para degradação via proteossoma ou exportação para o citoplasma da célula (Chao, 2015).

A ubiquitina é uma pequena proteína que marca outras proteínas para degradação pelo complexo proteossomal 26S. O processo de ubiquitinação de uma proteína é um processo extremamente ordenado de três etapas e que depende de três classes de enzimas. A classe E1 que, com gasto de ATP, ativa a molécula de ubiquitina, a classe E2 que transporta essa molécula ativada até o sitio ativo da E3 que vai efetivamente unir a molécula da ubiquitina ao substrato alvo (Figura 6). Esta reação é uma reação quimicamente reversível e existem algumas enzimas que atuam na desubiquitinação de proteínas ubiquitinadas tornando-as biologicamente disponíveis novamente.

A proteína *mdm2* é regulada positivamente por *TP53*, onde o aumento dos níveis de p53 leva a um aumento na transcrição de *MDM2*, aumentando a concentração da proteína *mdm2* que conseqüentemente aumenta a degradação de p53, assim, o produto

do gene *MDM2* mantém o produto do gene *TP53* em níveis baixos caracterizando uma regulação por feedback negativo. Esse feedback negativo mantém a proteína p53 em baixos níveis na ausência de sinais de estresse, permitindo uma proliferação celular normal.

Enquanto níveis altos de mdm2 promovem a poliubiquitação de p53 e sua degradação pela via proteossomal, níveis baixos de mdm2 promovem a monoubiquitinação de p53 o que evita sua ligação ao DNA e promove sua exportação para o citosol, afastando-o de seus alvos transcripcionais. Assim interage com os produtos dos genes da família Bcl como o *Bcl-XL* e o *Bcl-2* para promover a oligomerização de fatores pró-apoptóticos como Bax e Bak na membrana mitocondrial levando a apoptose pela liberação do citocromo c e outros fatores apoptóticos no citoplasma (Reed, 2015; Chao, 2015).

Outro estudo mostra que a perda de *MDM2* em camundongos provoca letalidade nos estágios iniciais da embriogênese, que é totalmente revertida pela deleção de p53, demonstrando o papel central de *MDM2* na manutenção dos níveis e da atividade do produto do gene p53 in vivo (Figura 6) (Luna, 1995; Reed, 2015).

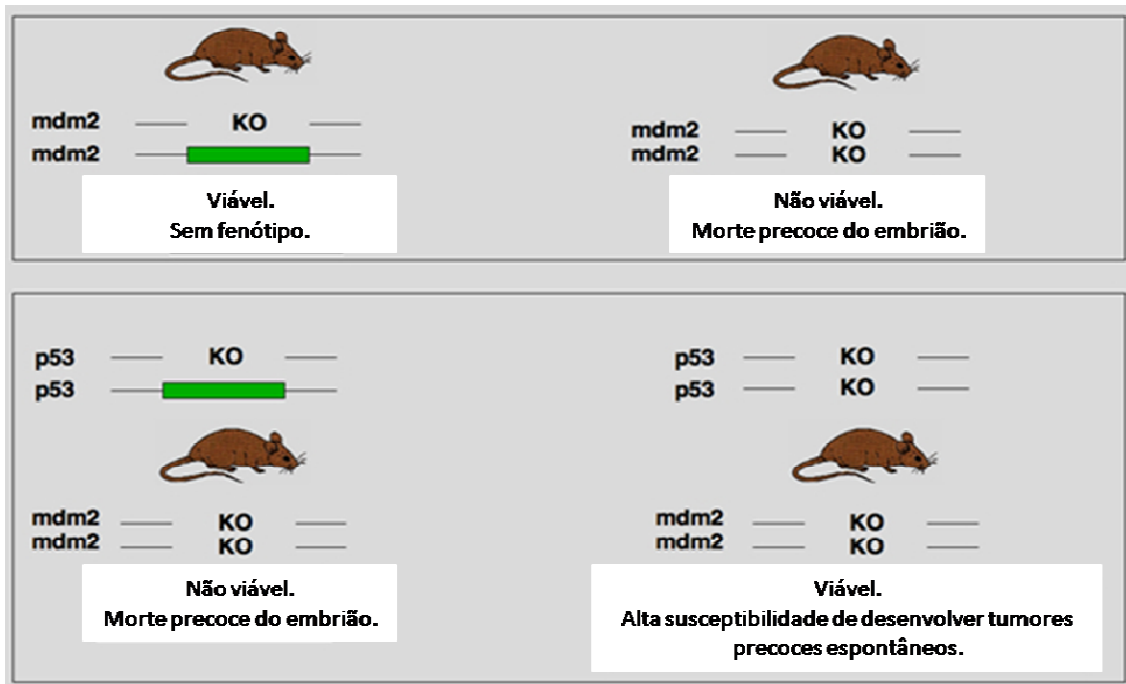


Figura 6. Restauração da viabilidade dos embriões em camundongos deficientes em *MDM2* pela deleção de p53 (adaptado de Luna *et al*, 1995).

1.4.2 *MDM4 (MDMX)*

O gene *MDM4*, homólogo estrutural do gene *MDM2*, está localizado no cromossomo 1q32 e também está envolvido na regulação de p53. A proteína mdm4 embora apresente homologia estrutural com mdm2 (Figura 7), não apresenta a função de E3 ligase que a mdm2 apresenta, sendo assim, não possui um sítio ativo capaz de adicionar moléculas de ubiquitina em p53. A região amino-terminal de ambas as proteínas tem capacidade de se ligar a p53 mas, apenas em mdm2, a região ácida central tem capacidade de se ligar a proteínas ribossomais. Apenas mdm2 possui uma região denominada sinal de localização celular (*nuclear localization signal- NLS*). A região carboxiterminal possui um domínio RING que é necessário para a heterodimerização entre mdm2 e mdm4 o que pode fazer com que mdm4 module a capacidade de mdm2 ubiquitinar p53.

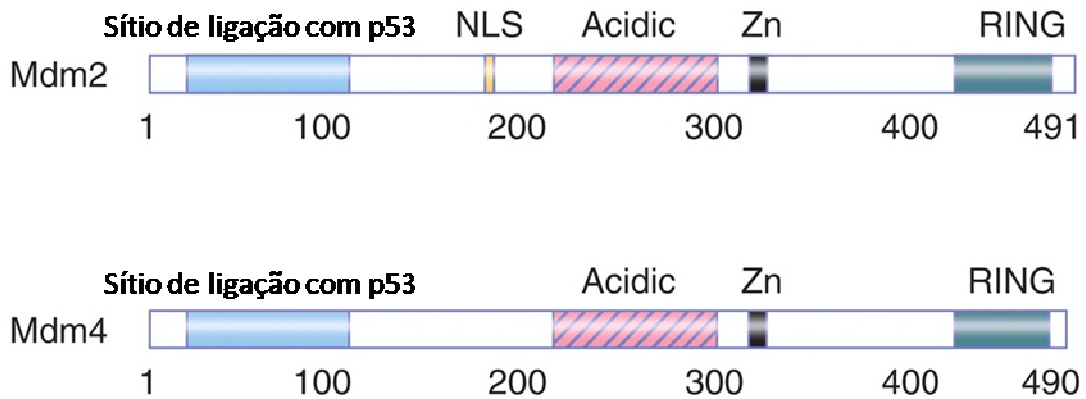


Figura 7. Estrutura e localização dos domínios de mdm2 e mdm4 (adaptado de Perry, 2010).

Para se entender a diferença na função de mdm2 e mdm4 foram desenhados estudos com camundongos que não expressavam, em um caso, p53 e mdm2 e, em outro caso, p53 e mdm4. Após a introdução de uma mutação temperatura-sensível p53 foi então reintroduzido nos camundongos, o que permitiu análises in vivo da função de p53 na ausência seletiva de mdm2 e mdm4 (Perry, 2010).

Na ausência da expressão de *MDM2* foi observada a ação de genes, p53-dependentes, relacionados a apoptose enquanto que na ausência da expressão de *MDM4* foi observada a ação de genes, p53-dependentes, relacionados à parada do ciclo celular (Figura 8). Esses estudos sugerem que mdm2 e mdm4 possuem funções distintas na regulação da expressão de p53, mas apenas o mdm2 tem efeito nos níveis celulares de p53 por possuir um sítio ativo com capacidade de ligar moléculas de ubiquitina à p53, como citado acima (Marine, 2006; Wahl, 2006; Iwakuma, 2007; Barboza, 2008).

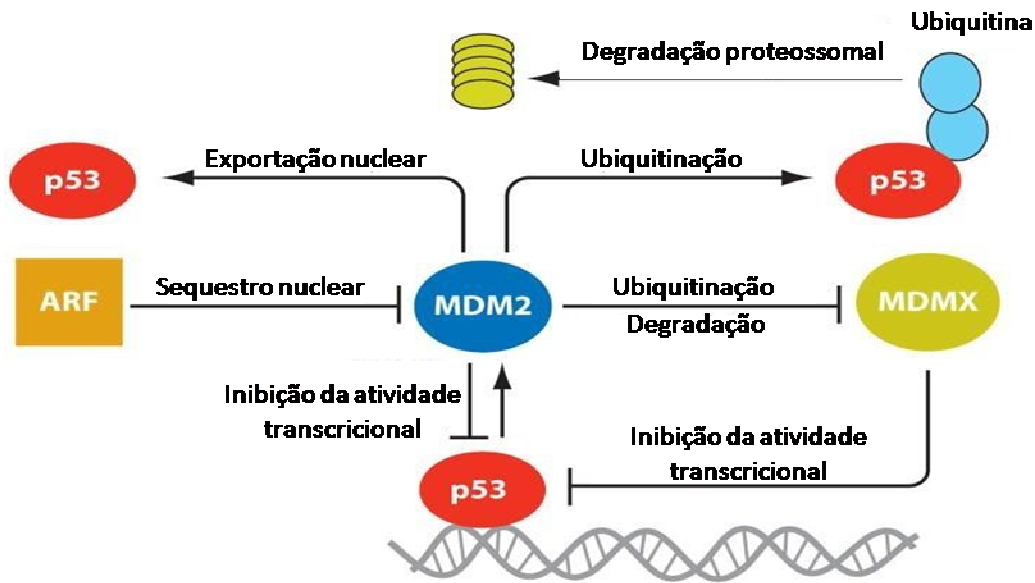


Figura 8. Looping auto-regulatório de p53 por *MDM2* e *MDM4* (adaptado de Shangary *et al*, 2009).

1.4.3 *USP7 (HAUSP)*

Outro importante regulador da rota de sinalização de p53, o gene *USP7*, localizado no cromossomo 16p13.3, é uma cisteína isopeptidase da família USP e um conhecido regulador do crescimento celular e do processo de apoptose associado com a estabilização de p53 evitando a degradação mediada pela poliubiquitinação promovida por mdm2. Em células eucariontes, um dos mecanismos de modificação pós traducional é o balanceamento do efeito da ubiquitinação e da desubiquitinação.

O processo de ubiquitinação é reversível e existem várias enzimas que possuem essa capacidade (Lim, 2013). Aproximadamente 100 enzimas desubiquitinantes (DUBs - deubiquitinating enzyme) são codificadas pelo genoma humano e podem ser classificadas em seis classes: USPs (ubiquitin-specific proteases), UCHs (ubiquitin C-terminal hydrolases), OTUs (ovarian tumor proteases), MJDs (Machado-Josephindomains) e MCPIPs (monocytechemotactic protein-induced proteases) (Bhattacharya, 2014). USP, UCH, OTU e MJD são conhecidas como proteases cisteínas e a JAMM é conhecida como Zn^{2+} metaloprotease. Tal divisão se dá em função do mecanismo catalítico que cada grupo de enzimas utiliza para realizar a clivagem das moléculas de ubiquitina.

Especificamente, a família da USP tem a capacidade de desfazer ligações covalentes entre a ubiquitina e a molécula alvo ajudando, dessa forma, a regular a estabilização e a localização celular de seu substrato. Estudos demonstraram que tanto mdm2 quanto p53 possuem um motivo P/AXXS em seu domínio c-terminal e que essa sequência de aminoácidos é a responsável pela interação com usp7. Em um estado celular livre de fatores estressores, tanto mdm2 quanto mdm4 aparentemente são os substratos preferenciais de usp7 (Chao, 2015).

O produto do gene *USP7* é fosforilado na serina 18 pela proteína quinase CK2 e essa fosforilação leva a inibição da desubiquitinação de mdm2 mantendo os níveis de p53 regulados (Lim, 2015). Entretanto, na presença de lesão no DNA a ativação dependente de ATM quinase (Ataxia-telangiectasia mutated kinase) da proteína fosfatase PPM1G leva a desfosforilação de usp7 e essa desfosforilação leva a sua degradação proteossomal, que por sua vez diminui a estabilidade de mdm2, levando ao aumento dos níveis de p53 (Khoronenkova, 2012). Além disso, a ATM quinase atua fosforilando mdm2 e mdm4 o que leva a uma diminuição de suas afinidades com usp7 também levando a desestabilização de suas estruturas (Figura 7) (Vucic, 2011; Chao, 2015).

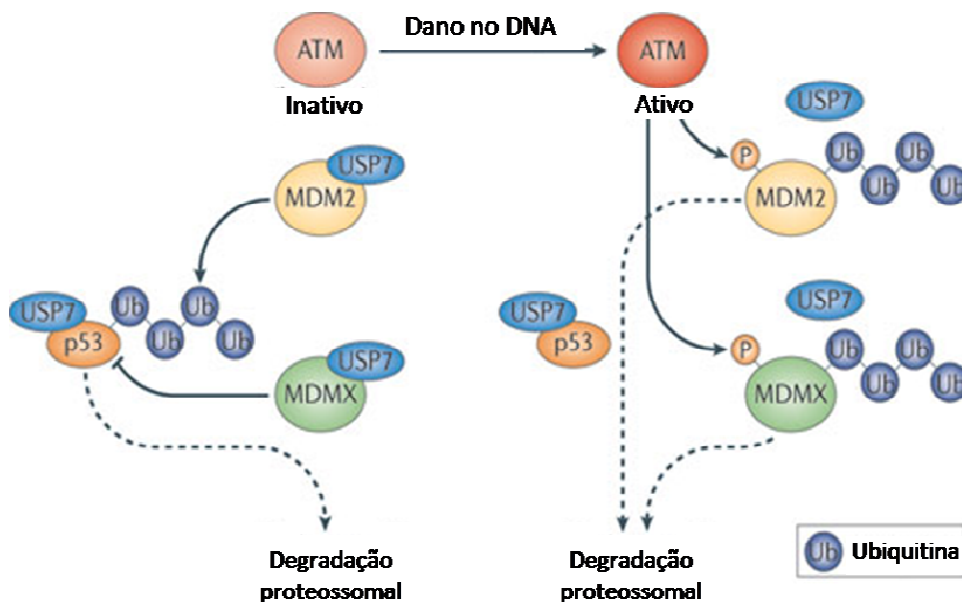


Figura 9. A complexa interrelação entre p53, mdm2, mdm4 e usp7 (adaptado de Vucic *et al*, 2011).

A proteína usp7 tem um papel crucial na regulação do complexo p53-mdm2, mas o mecanismo molecular preciso que controla essa regulação ainda não está completamente elucidado (Lim, 2015).

1.5 *LIF*

Codificada pelo gene *LIF*, localizado no cromossomo 22q12, lif é uma citocina pleiotrópica da superfamília das interleucinas-6 expressa em diversos tecidos e tipos celulares. É primeiramente sintetizada como um precursor de 202 aminoácidos sendo processada por modificações pós traducionais em uma proteína de 20 KDa pela remoção de 22 aminoácidos de sua porção aminoterminal. Seu nome deriva de sua habilidade de induzir a diferenciação de células mielóides e prevenir o crescimento de células leucêmicas (Liu, 2015).

A proteína lif possui um amplo espectro de atividades, logo possui receptores em vários tecidos diferentes incluindo o fígado, ossos, útero, rins e sistema nervoso central. Com relação a seu papel no sistema reprodutivo, uma de suas funções é a decidualização, que ocorre durante o período de implantação do blastocisto. Neste processo, lif é secretada no lúmen do útero e liga-se aos receptores na superfície das células epiteliais, tornando o útero receptivo ao blastocisto. No momento da implantação, níveis altos de expressão do gene *LIF* são observados no tecido endometrial, incluindo glândulas endometriais, em regiões em que a expressão do gene *TP53* está seletivamente aumentada (Liu, 2015).

Em um experimento foram injetados camundongos de diferentes linhagens com anticorpos anti-lif e em todas as linhagens foi verificado uma diminuição no número de blastocistos implantados no tecido endometrial com variações de moderadas a severas (figura 10) (Kobayashi et al, 2014).

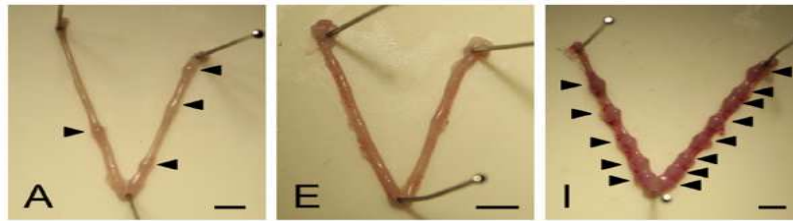


Figura 10. Camundongos A e E tratados com anti-lif. Camundongo I, controle. Setas indicando locais de implantação de blastocistos (adaptado de Kobayashi *et al*, 2014).

A proteína lif também é secretada pelas células trofoblásticas do feto induzindo a proliferação, invasão e diferenciação do trofoblasto. Sugere-se que a função do lif produzido pelas células trofoblásticas seria ativar a via de PI3K/Akt por meio da regulação de poFUT1 (Liu *et al*, 2014).

Os esteróides ovarianos têm um papel muito importante na regulação do processo de implantação regulando a expressão de lif e de seu receptor. Em hamsters, a secreção de lif foi induzida por estrogênio enquanto que a expressão de seu receptor e de gp130, uma proteína recrutada pelo receptor de lif para formar um complexo de alta afinidade com lif, foi induzida pela progesterona (Ding *et al*, 2008). Um estudo *in vitro* usando células endometriais indicou que a administração concomitante de estrogênio e progesterona foi capaz de estimular a expressão de mRNA do receptor de lif (Shuya *et al*, 2011). Gonadotrofinas coriônicas (hCG) também foram relatadas como sendo capazes de estimular a expressão de *LIF* (Licht *et al*, 1998) bem como fluído seminal também foi capaz de estimular a secreção de *LIF* por células endometriais *in vitro* (Gutsche *et al*, 2003).

1.6 Polimorfismos na via de p53 e reprodução

Polimorfismos de base única (single-nucleotide polymorphisms – SNPs) exercem importante função nos genes da família p53 e nos genes da sua rota de sinalização. Mais de 200 SNPs foram identificados para o gene *TP53*. Em humanos, um importante polimorfismo no gene *TP53* é o SNP c.215G>C (R72P, rs1042522), no domínio de ativação da proteína p53, localizado no códon 72.

Esta substituição resulta na alteração do aminoácido de uma arginina (R72) por uma prolina (P72) (Buchman, 1988), tendo importante efeito funcional em função da

natureza quimicamente distinta das cadeias laterais desses dois aminoácidos. O alelo P72 apresenta uma atividade mais fraca na indução de processos apoptóticos e na supressão da transformação celular e tem uma atividade transcricional p53-dependente mais baixa também em relação a genes envolvidos na apoptose e no reparo de DNA quando comparado com o alelo R72 (Feng, 2011).

O alelo P72 de *TP53* tem frequência de aproximadamente 60% em afro-americanos, mas apenas 30-35% em euro-descendentes que vivem nos Estados Unidos (Beckman, 1994). O alelo R72 nunca foi encontrado em primatas não humanos fazendo com que o alelo P72 seja considerado o alelo ancestral (Volodko, 2015).

O alelo P72 foi associado como fator de risco para aborto recorrente idiopático (Pietrowski *et al.*, 2005), aborto espontâneo (Firouzabadi *et al.*, 2009) e falha de implantação recorrente (Kay *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009), indicando que p53 possa desempenhar um importante papel na reprodução. Recentemente, nosso grupo apontou o alelo P72 como fator de risco para gestações gemelares (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012) e aneuplóides (Boquett *et al.*, 2012), onde sua baixa eficiência apoptótica torna mais tolerante a gestação de gêmeos e de fetos com aneuploidia, respectivamente.

A desregulação na expressão de proteínas p53 também pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário. Estudos indicam que p53 desempenha papel chave na proteção de embriões a teratógenos e diversos estresses ambientais. Uma grande quantidade da proteína p53 é produzida pela placenta humana em gestações anormais, podendo ser um importante fator de risco para a patogênese de doenças placentárias através da indução da apoptose trofoblástica (Brady, 2010).

Experimentos com camundongos demonstraram o envolvimento dos genes da família p53 na reprodução (Hu, 2009), onde sua atividade é necessária para a implantação do embrião no útero através da regulação transcricional do Fator Inibidor da Leucemia (Leukaemia inhibitor factor, *LIF*).

Pesquisas em camundongos *knockout* que não expressavam *LIF* demonstraram problemas na reprodução decorrente da completa falta de decidualização e, portanto, falha na implantação, que pôde ser resgatada após a aplicação de *lif* durante o período reprodutivo (Chen *et al.*, 2000). O mesmo ocorreu com camundongos *knockout* para

TP53, resultando em significativa queda dos níveis uterinos de *lif*, apontando *TP53* como um dos principais reguladores de *LIF* (Hu *et al.*, 2007). O SNP P72R de *TP53* também foi estudado em camundongos, onde foi demonstrado que portadores do alelo P72 possuíam níveis de *lif* significativamente mais baixos, confirmando ser um potencial fator de risco para falha de implantação (Feng *et al.*, 2011). A função dos genes da família p53 parecem ser as mesmas na reprodução de camundongos e de humanos (Feng *et al.*, 2011).

Os níveis de *lif* na maioria das mulheres com infertilidade sem etiologia conhecida são significativamente mais baixos (Mikolajczyk *et al.*, 2007). Assim, *LIF* tem sido alvo de diversos estudos que avaliam sua expressão e alterações gênicas em relação a diferentes desfechos clínicos. Giess e colaboradores (1999) encontraram associação positiva entre o efeito de mutações em *LIF* na diminuição da expressão ou liberação de *lif* e infertilidade. O polimorfismo c.*1414A>C (rs929271) tem sido alvo de recentes estudos. Situado na região 3' UTR, resulta em uma substituição de T para G, reduzindo a estabilidade do mRNA e podendo causar a redução da expressão gênica. Recentemente, a variante G foi relacionada com casos de infertilidade ocasionada por falhas de implantação (Kang *et al.*, 2009). Porém, esta importante variante ainda não foi alvo de estudos relacionados à fertilidade. Mesmo que não possua efeito direto sobre o desenvolvimento embrionário, essa proteína pode ser considerada importante não apenas durante o período da implantação, como também para todo o processo da gestação.

Polimorfismos em genes da via de sinalização de *TP53* também apresentaram associação com mulheres inférteis. Estes polimorfismos podem alterar níveis de expressão de *TP53*, podendo assim diminuir os níveis de *lif* transcrito e, conseqüentemente, aumentar as chances de falha da implantação do blastocisto (Kang *et al.*, 2009).

O gene *MDM2* possui um importante polimorfismo funcional, o SNP c.14+309T>G (SNP309, rs2279744) que na região promotora (Bond *et al.*, 2004). O genótipo GG deste SNP aumenta os níveis de expressão de *MDM2* atenuando a função de p53 em resposta a estresse celular e danos no DNA (Kang *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011). Este polimorfismo está associado com um alto risco de abortamento retido (Fang *et al.*, 2011) e também a tumores, o que suporta o potencial efeito de interação entre o

SNP309 de *MDM2* e o polimorfismo P72R de p53 (Wan *et al.*, 2011). A frequência do alelo G é de 10% em afro-americanos e de aproximadamente 43% em euro-americanos (Hu, 2009).

No gene *MDM4*, o polimorfismo c.753+572C>T (rs1563828) no íntron 9, apresenta relação com a reprodução humana. O alelo T deste polimorfismo está associado com a infertilidade em mulheres, sugerindo que *MDM4* possa regular a reprodução em vias dependentes e independentes de *TP53* (Kang *et al.*, 2009). A frequência do alelo C é de apenas 30% em afro-americanos e maior que 67% em euro-descendentes (Hu, 2009).

O polimorfismo c.2719-234G>A (rs1529916) de *USP7* no íntron 25, pode estar envolvido na reprodução humana através da regulação de p53 e da implantação (Kang *et al.*, 2009). A frequência do alelo A em afro-americanos é de 16% e maior que 33% em euro-descendentes (Hu, 2009). Assim, é possível que genes que sofrem seleção na via de *TP53* possam estar relacionados com aspectos importantes da reprodução humana (Kang *et al.*, 2009).

1.7 Monte Negro / RO

Monte Negro é um pequeno município do Estado de Rondônia, oeste da região Amazônica (10 o 15'35" S, 63 ° 18'06" W), localizado a aproximadamente 250 quilômetros ao sul da capital Porto Velho (Figura 11). Possui aproximadamente 14 mil habitantes, sendo sua população predominantemente adulta, originária principalmente do sul e sudeste do país. Sua colonização foi iniciada em meados da década de 70 a partir do incentivo do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária através do Plano de Integração Nacional. A frequência de crianças nascidas no Estado de Rondônia (67%) é muito maior do que o da geração parental (2% dos pais e 7% das mães), o que indica que a geração mais velha migrou em uma idade relativamente jovem, abaixo da idade média reprodutiva. É possível afirmar que a população de Monte Negro foi formada principalmente por jovens imigrantes que se instalaram em Rondônia cerca de 30 anos atrás (Camargo *et al.*, 2002).



Figura 11. Localização do município de Monte Negro.

Devido à grande miscigenação observada nesta população, Ferreira e colaboradores (2002) realizam um estudo utilizando 11 polimorfismos de genes de sistemas sanguíneos (ABO, Rh, MNSs, Kell, Fy, haptoglobina, hemoglobina, ACP1, PGM1, GLO1, e CA2) em uma amostra de 924 habitantes da cidade de Monte Negro, com o objetivo de descrever a composição étnica desta população. Neste estudo foi observada uma contribuição de 25% de etnia africana, 12% de etnia ameríndia e 63% de etnia européia (Ferreira *et al.*, 2002).

Nesse município, o fenômeno da “transição epidemiológica” assemelha-se ao restante do país, onde coexistem doenças crônicas não-transmissíveis e doenças transmissíveis, ambas desempenhando importante papel no perfil epidemiológico local (Camargo *et al.*, 2002). O fato do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo estar instalado há 15 anos no município e ser referência na área de saúde, associado a sua pequena população, facilita a realização da pesquisa pretendida neste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Apesar da reconhecida importância dos fatores genéticos envolvidos nos processos de reprodução humana, a influência destes fatores na taxa de fertilidade ainda não é bem compreendida. Assim, este estudo tem como objetivo geral investigar a relação entre polimorfismos nos genes da via regulatória de p53 e fertilidade na espécie humana, bem como sua possível relação com a longevidade e ocorrência de câncer.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a frequência dos polimorfismos c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53*, c.325-4742T>G (rs1706395) do gene *TP63*, 4c.-30G>A e 14c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) do gene *TP73*, c.753+572C>T (rs1563828) do gene *MDM4*, c.2719-234G>A (rs1529916) do gene *USP7* e c.*1414A>C (rs929271) do gene *LIF* em um grupo composto por indivíduos na região Norte do Brasil.

Em indivíduos do sexo feminino, avaliar a possível associação entre os polimorfismos da via do gene *TP53* citados acima e fatores importantes para fertilidade como: idade de menarca, idade de menopausa, menacme, número de gestações, número de abortos e número de filhos vivos.

Em indivíduos do sexo masculino e feminino, avaliar a possível relação dos polimorfismos da via do gene *TP53* citados acima e a apresentação de neoplasias por parte dos indivíduos analisados e de seus parentes de primeiro grau.

Em indivíduos do sexo masculino e feminino, avaliar a possível relação dos polimorfismos da via do gene *TP53* citados acima e a longevidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

O estudo será do tipo transversal.

3.2 Amostra

A amostra foi coletada no ambulatório do ICB5/USP localizado na cidade de Monte Negro, Rondônia, em parceria com o projeto Chronus (Rondonian Study Group of Ageing – RSGA) que desenvolve pesquisas sobre o impacto de doenças infecto-parasitárias e outros fatores no processo de envelhecimento da população de Monte Negro. No ambulatório, junto da anamnese foi aplicado um questionário clínico e socioeconômico aos indivíduos amostrados (ANEXO 1), além de um questionário com dados sobre a história reprodutiva de cada indivíduo (ANEXO 2).

Nossa amostra foi constituída por indivíduos longevos, pessoas com idade de 60 anos ou mais. Foram usados os seguintes critérios para composição da amostra. Como critérios de inclusão: indivíduos residentes no município de Monte Negro, Rondônia; com idade acima de 59 anos, em atendimento na Unidade Básica de Saúde deste município, e que concordem em participar da pesquisa e como critério de exclusão: indivíduos menores de 60 anos, ou com incapacidade de compreender e dar o consentimento voluntário de participação na pesquisa e indivíduos residentes em outros municípios.

3.3 Coleta e processamento do material biológico

Foram coletados 5ml de sangue, por meio de punção venosa periférica na região da fossa antecubital, acondicionados em tubos de coleta com EDTA. Após identificação e armazenamento, as amostras foram despachadas para Porto Alegre, onde foi feito o restante do processamento da amostra. Foi realizada a extração de DNA com o kit Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante. Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas em equipamento PicoDrop e diluídas a uma concentração de 20 ng/μL para posterior realização do procedimento de determinação genotípica.

3.4 Análise dos polimorfismos

A determinação genotípica dos polimorfismos c.215G>C (P72R) do gene *TP53*, c.753+572C>T (rs1563828) do gene *MDM4*, c.2719-234G>A (rs1529916) do gene *USP7* e c.*1414A>C (rs929271) do gene *LIF* foi feita através da técnica de PCR em tempo real (real-time PCR) utilizando primers e sondas específicas previamente desenhadas contidos no Custom Taq Man Genotyping Assay (Applied Biosystems) para os seguintes ensaios: C___2403545_10 (gene *TP53*), C___9493064_10 (gene *MDM4*), C___9688119_1_ (gene *USP7*) e C___7545904_10 (gene *LIF*).

A técnica TaqMan SNP genotyping assay foi utilizada para a discriminação alélica dos SNPs previamente selecionados. A reação de PCR em tempo real dos polimorfismos foi conduzida em uma placa de 96 poços contendo em cada reação: 10ng de DNA genômico, o tampão TaqMan Genotyping Master Mix 2x (Applied Biosystems), os primers e sondas específicos para cada polimorfismo (40x) e água em quantidade suficiente para 8 μ l. As placas foram então colocadas em um termociclador para PCR em tempo real (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems) e aquecidas por 10min a 95°C, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15s e 63°C por 1min. Os resultados de todas as reações foram analisados no software System Sequence Detection v.1.4 (Applied Biosystems) para determinação genotípica (Figura 12).

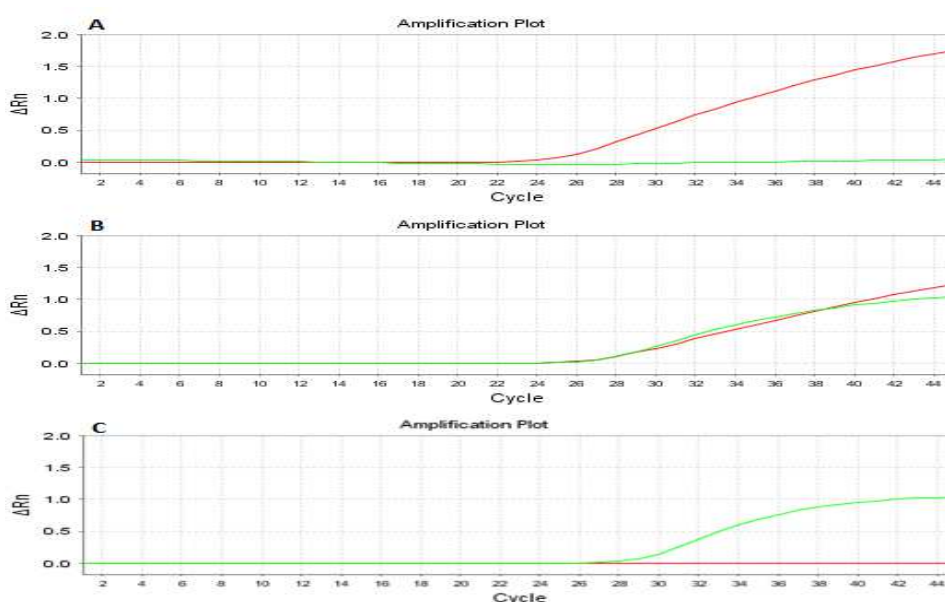


Figura 11. Diferenciação de indivíduos heterozigotos e homozigotos para os SNPs em estudo (resultados para o polimorfismo c.753+572C>T do gene *MDM4*. A - genótipo CC, B - genótipo CT e C - genótipo TT).

3.5 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS versão 20.0. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos. Para testar uma possível associação dos polimorfismos da via de p53 com fatores como idade da menarca, idade da menopausa, número de gestações, número de abortos e número de filhos vivos foram utilizados modelos de regressão logística. O teste do Qui-quadrado também será utilizado para testar a frequência de p53 e a presença de doenças crônicas não-transmissíveis. Nos casos de câncer, modelos de regressão logística serão utilizados para avaliar a frequência dos polimorfismos com o tipo e idade de aparecimento da doença.

3.6 Aspectos Éticos

O presente estudo é parte integrante do projeto Chronus, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa sob o processo de número 02742612.7.0000.5467. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo preencheram o Termo Consentimento Livre e Esclarecido, onde estão expostos os objetivos e análises realizadas no projeto. Nós nos responsabilizaremos pela comunicação dos resultados obtidos nas pesquisas para os participantes que apresentarem tal interesse.

4 RESULTADOS

Nossa amostra foi constituída por 91 indivíduos (50 mulheres e 41 homens) com idade superior a 59 anos de idade. Na tabela 1 são apresentados os dados demográficos, obstétricos e clínicos dessa amostra.

A idade média na coleta foi de 69,9 anos para as mulheres, com a idade variando de 62 a 86 anos, e 71,5 para os homens, com a idade variando de 61 a 86 anos. Quanto à idade de menarca, a média foi de 13,7 anos, variando de 9 a 18 anos, e para a menopausa a média foi de 48,3 anos, variando de 36 a 59 anos, refletindo em um período médio de menacme de 34,9 anos, variando de 25 a 47 anos. A média de gestações e partos a termo foi de 8,3, variando de 0 a 20 gestações, e 7,1, variando de 0 a 19, respectivamente. Com relação à incidência de câncer em parentes de primeiro grau os dados encontrados foram semelhantes tanto para homens quanto para mulheres, mas com relação a consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo, os homens apresentaram valores mais elevados, principalmente com relação ao consumo de bebidas alcoólicas que foi de aproximadamente 3 vezes maior.

Tabela 1. Dados demográficos, obstétricos e clínicos da amostra estudada.

Característica	Mulheres (n = 50)	Homens (n = 41)
Idade na coleta [média (DP)]	69,9 (6,1) anos	71,5 (6,1) anos
Idade menarca [média (DP)]	13,7 (1,9) anos	-
Idade menopausa [média (DP)]	48,3 (6,1) anos	-
Menacme [média (DP)]	34,9 (5,8) anos	-
Número de gestações [média (DP)]	8,3 (4,6)	-
Partos [média (DP)]	7,1 (4,2)	-
Abortos [n indivíduos (n total)]	29,0 (61,0)	-
Abortos [média (DP)]	1,2 (1,4)	-
Filhos vivos [média (DP)]	5,9 (3,6)	5,8 (3,2)
Consanguinidade [n (%)]	3,0 (6,0)	-
Câncer em parentes de primeiro grau [n (%)]	11,0 (22,0)	11,0 (26,8)
Tabagismo [n (%)]	10,0 (20,0)	11,0 (26,8)
Etilismo [n (%)]	4,0 (8,0)	11,0 (26,8)
Cor de pele		
Branca [n (%)]	17,0 (34,0)	13,0 (33,3)
Parda [n (%)]	24,0 (48,0)	19,0 (48,7)
Preta [n (%)]	9,0 (18,0)	7,0 (19,9)

As frequências alélicas e genotípicas para os SNPs estudados estão apresentados na tabela 2. Todos os polimorfismos se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg,

exceto o SNP c.325-4742T>G (rs1706395) do gene *TP63* que rejeitou o Equilíbrio de Hardy-Weinberg quando analisada a amostra total e os homens separadamente.

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53*.

Gene	Genótipo / Alelo	Total		Mulheres		Homens		P*
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	36,0	(39,6)	18,0	(36,0)	18,0	(43,9)	
	GC	45,0	(49,5)	27,0	(54,0)	18,0	(43,9)	
	CC	10,0	(11,0)	5,0	(10,0)	5,0	(12,2)	0,632
	G	117,0	(64,3)	63,0	(63,0)	54,0	(65,9)	
	C	65,0	(35,7)	37,0	(37,0)	28,0	(34,1)	0,807
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	42,0	(46,2)	22,0	(44,0)	20,0	(48,8)	
	GT	38,0	(41,8)	22,0	(44,0)	16,0	(39,0)	
	GG	11,0	(12,1)	6,0	(12,0)	5,0	(12,2)	0,884
	T	122,0	(67,0)	66,0	(66,0)	56,0	(68,3)	
	G	60,0	(33,0)	34,0	(34,0)	26,0	(31,7)	0,866
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	27,0	(29,7)	16,0	(32,0)	11,0	(26,8)	
	TC	43,0	(47,3)	23,0	(46,0)	20,0	(48,8)	
	TT	21,0	(23,1)	11,0	(22,0)	10,0	(24,4)	0,863
	C	97,0	(53,3)	55,0	(54,0)	42,0	(51,2)	
	T	85,0	(46,7)	45,0	(45,0)	40,0	(48,8)	0,719
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	48,0	(52,7)	26,0	(52,0)	22,0	(53,7)	
	GA	37,0	(40,7)	22,0	(44,0)	15,0	(36,6)	
	AA	6,0	(6,6)	2,0	(4,0)	4,0	(9,8)	0,485
	G	133,0	(73,1)	74,0	(74,0)	59,0	(72,0)	
	A	49,0	(26,9)	26,0	(26,0)	23,0	(28,0)	0,887
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	51,0	(56,0)	30,0	(60,0)	21,0	(51,2)	
	GT	40,0	(44,0)	20,0	(40,0)	20,0	(48,8)	
	GG	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,530
	T	142,0	(78,0)	80,0	(80,0)	62,0	(75,6)	
	G	40,0	(22,0)	20,0	(20,0)	20,0	(24,4)	0,595
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	40,0	(44,0)	20,0	(40,0)	20,0	(48,8)	
	GA / CT	46,0	(50,5)	26,0	(52,0)	20,0	(48,8)	
	AA / TT	5,0	(5,5)	4,0	(8,0)	1,0	(2,4)	0,425
	G / C	126,0	(62,9)	66,0	(66,0)	60,0	(73,2)	
	A / T	56,0	(30,8)	34,0	(34,0)	22,0	(26,8)	0,378

*Qui-quadrado

Todos os polimorfismos analisados apresentaram frequências semelhantes tanto quando comparamos mulheres com homens quando comparamos ambos com a frequência total. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre gêneros para os polimorfismos estudados.

Foi feita também uma comparação entre as frequências alélicas e genóticas da população estudada, por meio de nossa amostra, com os dados para a população européia e para a população africana registradas no 1000 Genomes Project Consortium (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010) cujos valores estão apresentados na tabela 3. Os dados mostram uma semelhança significativa entre as frequências dos polimorfismos na população estudada com as frequências para a população européia, salvo em três situações pontuais em que a diferença se mostrou estatisticamente significativa; as frequências genóticas do polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53* ($P < 0,0001$), as frequências genóticas do polimorfismo c.325-4742T>G (rs1706395) do gene *TP63* ($P = 0,025$) e as frequências genóticas do polimorfismo 4c.-30G>A e 14c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) do gene *TP73* ($P = 0,017$).

Quando comparada a frequência alélica e genótica da amostra com os dados de frequência para a população africana encontrou-se uma diferença significativa na maioria das comparações salvo duas situações em que não houve diferença significativa; entre as frequências genóticas do polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53* ($P = 0,664$) e as frequências alélicas do c.2719-234G>A (rs1529916) do gene *USP7* ($P = 0,074$).

Tabela 3. Comparação das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* em diferentes populações.

Gene	Genótipo / Alelo	Amostra	Europeus*	P**	Africanos*	P**
		%	%		%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	39,6	7,4		45,2	
	GC	49,5	42,3		43,3	
	CC	11,0	50,3	<0,0001	11,5	0,664
	G	64,3	71,5		33,1	
	C	35,7	28,5	0,360	66,9	<0,0001
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	46,2	46,1		96,4	
	GT	41,8	40,2		3,5	
	GG	12,1	13,7	0,974	0,2	<0,0001
	T	67,0	66,2		98,1	
	G	33,0	33,8	0,989	1,9	<0,0001
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	29,7	46,7		3,9	
	TC	47,3	42,3		30,0	
	TT	23,1	10,9	0,009	66,1	<0,0001
	C	53,3	68,0		19,0	
	T	46,7	32,0	0,052	81,0	<0,0001
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	52,7	47,1		70,8	
	GA	40,7	43,5		27,5	
	AA	6,6	9,3	0,620	1,7	0,013
	G	73,1	69,0		85,0	
	A	26,9	31,0	0,560	15,0	0,074
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	56,0	53,3		81,0	
	GT	44,0	39,4		18,0	
	GG	0,0	7,3	0,025	1,0	0,003
	T	78,0	73,0		90,0	
	G	22,0	27,0	0,511	10,0	0,034
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	44,0	64,2		78,4	
	GA / CT	50,5	32,4		20,0	
	AA / TT	5,5	3,4	0,017	1,7	<0,0001
	G / C	62,9	80,0		88,0	
	A / T	30,8	20,0	0,068	12,0	0,001

*The 1000 Genomes Project Consortium - phase 3 -, 2015; **Qui-quadrado

A amostra foi dividida em 3 grupos de acordo com o número de gestações, conforme demonstrado na tabela 4, e os grupos foram comparados entre si. O polimorfismo c.*1414A>C (rs929271) do gene *LIF* apresentou diferença estatisticamente significativa quanto à frequência alélica entre os 3 grupos ($P = 0,044$), onde o alelo T foi o mais frequente no grupo com maior número de gestações. Os

demais SNPs não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quando analisados separadamente.

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com o número de gestações.

Gene	Genótipo / Alelo	Total (n = 50)		Gestações						P*
		n	(%)	0-4 (n = 10)		5-9 (n = 23)		≥10 (n = 17)		
				n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	18,0	(36,0)	3,0	(30,0)	7,0	(30,4)	8,0	(47,1)	0,781
	GC	27,0	(54,0)	6,0	(60,0)	14,0	(60,9)	7,0	(41,2)	
	CC	5,0	(10,0)	1,0	(10,0)	2,0	(8,7)	2,0	(11,8)	
	G	63,0	(63,0)	12,0	(60,0)	28,0	(60,9)	23,0	(67,6)	
<i>LIF</i> (rs929271)	C	37,0	(37,0)	8,0	(40,0)	18,0	(39,1)	11,0	(32,4)	0,786
	TT	22,0	(44,0)	4,0	(40,0)	7,0	(30,4)	11,0	(64,7)	
	GT	22,0	(44,0)	4,0	(40,0)	12,0	(52,2)	6,0	(35,3)	
	GG	6,0	(12,0)	2,0	(20,0)	4,0	(17,4)	0,0	(0,0)	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	T	66,0	(66,0)	12,0	(60,0)	26,0	(56,5)	28,0	(82,4)	0,167
	G	34,0	(34,0)	8,0	(40,0)	20,0	(43,5)	6,0	(17,6)	
	CC	16,0	(32,0)	4,0	(40,0)	7,0	(30,4)	5,0	(29,4)	
	TC	23,0	(46,0)	3,0	(30,0)	11,0	(47,8)	9,0	(52,9)	
<i>USP7</i> (rs1529916)	TT	11,0	(22,0)	3,0	(30,0)	5,0	(21,7)	3,0	(17,6)	0,837
	C	55,0	(45,0)	11,0	(55,0)	25,0	(54,3)	19,0	(55,9)	
	T	45,0	(45,0)	9,0	(45,0)	21,0	(45,7)	15,0	(44,1)	
	GG	26,0	(52,0)	4,0	(40,0)	12,0	(52,2)	10,0	(58,8)	
<i>TP63</i> (rs1706395)	GA	22,0	(44,0)	5,0	(50,0)	10,0	(43,5)	7,0	(41,2)	0,712
	AA	2,0	(4,0)	1,0	(10,0)	1,0	(4,3)	0,0	(0,0)	
	G	74,0	(74,0)	13,0	(65,0)	34,0	(73,9)	27,0	(79,4)	
	A	26,0	(26,0)	7,0	(35,0)	12,0	(26,1)	7,0	(20,6)	
<i>TP73</i> (rs2273953)	TT	30,0	(60,0)	4,0	(40,0)	13,0	(56,5)	13,0	(76,5)	0,157
	GT	20,0	(40,0)	6,0	(60,0)	10,0	(43,5)	4,0	(23,5)	
	GG	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	
	T	80,0	(80,0)	14,0	(70,0)	36,0	(78,3)	30,0	(88,2)	
<i>TP73</i> (rs1801173)	G	20,0	(20,0)	6,0	(30,0)	10,0	(21,7)	4,0	(11,8)	0,249
	GG / CC	20,0	(40,0)	2,0	(20,0)	13,0	(56,5)	5,0	(29,4)	
	GA / CT	26,0	(52,0)	7,0	(70,0)	9,0	(39,1)	10,0	(58,8)	
	AA / TT	4,0	(8,0)	1,0	(10,0)	1,0	(4,3)	2,0	(11,8)	
<i>TP73</i> (rs1801173)	G / C	66,0	(66,0)	11,0	(55,0)	35,0	(76,1)	20,0	(58,8)	0,139
	A / T	34,0	(34,0)	9,0	(45,0)	11,0	(23,9)	14,0	(41,2)	

*Qui-quadrado

Com relação à idade de início da menopausa, a amostra foi dividida em 2 grupos (conforme demonstrado na tabela 5), e a frequência dos genótipos do SNP P72R de *TP53* foi estatisticamente diferente entre os dois grupos, onde o genótipo GC

(heterozigoto) foi mais frequente no grupo com início de menopausa anterior ou igual há 51 anos ($P = 0,033$). Os demais polimorfismos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quando analisados separadamente. A amostra foi analisada para a idade de ocorrência da menarca e também dividida em dois grupos (≤ 12 anos e > 12 anos) e os polimorfismos estudados não diferiram estatisticamente entre os dois grupos (tabela 6). Da mesma forma, a amostra foi analisada quanto à duração do período de menacme (tabela 7) e quanto ao número de ocorrências de abortos (tabela 8) e, em ambos os casos, a frequência dos polimorfismos não apresentou diferença entre os grupos testados.

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com a idade de início da menopausa.

Gene	Genótipo / Alelo	≤ 51 anos		> 51 anos		p*
		N	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	9,0	29,0	8,0	50,0	0,033
	GC	21,0	67,7	5,0	31,3	
	CC	1,0	3,2	3,0	18,8	
	G	39,0	62,9	21,0	65,6	
	C	23,0	37,1	11,0	34,4	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	15,0	48,4	5,0	31,3	0,196
	GT	11,0	35,5	10,0	62,5	
	GG	5,0	16,1	1,0	6,3	
	T	41,0	66,1	20,0	62,5	
	G	21,0	33,9	12,0	37,5	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	12,0	38,7	2,0	12,5	0,147
	TC	14,0	45,2	9,0	56,3	
	TT	5,0	16,1	5,0	31,3	
	C	38,0	61,3	13,0	40,6	
	T	24,0	38,7	19,0	59,4	
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	17,0	54,8	8,0	50,0	0,131
	GA	14,0	45,2	6,0	37,5	
	AA	0,0	0,0	2,0	12,5	
	G	48,0	77,4	22,0	68,8	
	A	14,0	22,6	10,0	31,3	
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	19,0	61,3	9,0	56,3	0,984
	GT	12,0	38,7	7,0	43,8	
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0	
	T	50,0	80,7	25,0	78,1	
	G	12,0	19,4	7,0	21,9	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	13,0	41,9	6,0	37,5	0,775
	GA / CT	16,0	51,6	8,0	50,0	
	AA / TT	2,0	6,5	2,0	12,5	
	G / C	42,0	67,7	20,0	62,5	
	A / T	20,0	32,3	12,0	37,5	

*Qui-quadrado

Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com a idade de ocorrência da menarca.

Gene	Genótipo / Alelo	≤ 12 anos		> 12 anos		p*	
		n	%	n	%		
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	4,0	36,4	12,0	40,0	0,378	
	GC	7,0	63,6	14,0	46,7		
	CC	0,0	0,0	4,0	13,3		
	<i>LIF</i> (rs929271)	G	15,0	68,2	38,0	63,3	0,883
		C	7,0	31,8	22,0	36,7	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	TT	4,0	36,4	14,0	46,7	0,203	
	GT	4,0	36,4	14,0	46,7		
	GG	3,0	27,3	2,0	6,7	0,296	
	T	12,0	54,6	42,0	70,0		
<i>USP7</i> (rs1529916)	G	10,0	45,5	18,0	30,0	0,883	
	CC	3,0	27,3	9,0	30,0		
	TC	5,0	45,6	15,0	50,0	0,878	
	TT	3,0	27,3	6,0	20,0		
<i>TP63</i> (rs1706395)	C	11,0	50,0	33,0	55,0	0,611	
	T	11,0	50,0	27,0	45,0		
	GG	5,0	45,5	15,0	50,0	0,855	
	GA	6,0	54,6	13,0	43,3		
	AA	0,0	0,0	2,0	6,7		
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	G	16,0	72,7	43,0	71,7	0,502	
	A	6,0	27,3	17,0	28,3		
	TT	5,0	45,5	19,0	63,3	0,563	
	GT	6,0	54,6	11,0	36,7		
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0		
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	T	16,0	72,7	49,0	81,7	0,948	
	G	6,0	27,3	11,0	18,3		
	GG / CC	5,0	45,5	13,0	43,3	0,798	
	GA / CT	5,0	45,5	15,0	50,0		
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	AA / TT	1,0	9,1	2,0	6,7	0,798	
	G / C	15,0	68,2	41,0	68,3		
	A / T	7,0	31,8	19,0	31,7		

*Qui-quadrado

Tabela 7. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e sua relação com o período de menacme.

Gene	Genótipo / Alelo	<ou = a 39		> 39		p*
		N	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	12,0	35,3	4,0	57,1	0,420
	GC	19,0	55,9	2,0	28,6	
	CC	3,0	8,8	1,0	14,3	
	G	43,0	63,2	10,0	71,4	0,781
	C	25,0	36,8	4,0	28,6	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	16,0	47,1	2,0	28,6	0,230
	GT	13,0	38,2	5,0	71,4	
	GG	5,0	14,7	0,0	0,0	
	T	45,0	66,2	9,0	64,3	0,862
	G	23,0	33,8	5,0	35,7	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	11,0	32,4	1,0	14,3	0,626
	TC	16,0	47,1	4,0	57,1	
	TT	7,0	20,6	2,0	28,6	
	C	38,0	55,9	6,0	42,9	0,551
	T	30,0	44,1	8,0	57,1	
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	17,0	50,0	3,0	42,9	0,710
	GA	15,0	44,1	4,0	57,1	
	AA	2,0	5,9	0,0	0,0	
	G	49,0	72,1	10,0	71,4	0,780
	A	19,0	27,9	4,0	28,6	
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	19,0	55,9	5,0	71,4	0,735
	GT	15,0	44,1	2,0	28,6	
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0	
	T	53,0	77,9	12,0	85,7	0,770
	G	15,0	22,1	2,0	14,3	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	15,0	44,1	3,0	42,9	0,052
	GA / CT	18,0	52,9	2,0	28,6	
	AA / TT	1,0	2,9	2,0	28,6	
	G / C	48,0	70,6	8,0	57,1	0,503
	A / T	20,0	29,4	6,0	42,9	

*Qui-quadrado

Tabela 8. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e relato de abortamentos na amostra.

Gene	Genótipo / Alelo	Não*		Sim**		p***
		n	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	5,0	23,8	13,0	44,8	
	GC	12,0	57,1	15,0	51,7	
	CC	4,0	19,1	1,0	3,5	0,104
	G	22,0	52,4	41,0	70,7	
<i>LIF</i> (rs929271)	C	20,0	47,6	17,0	29,3	0,096
	TT	7,0	33,3	15,0	51,7	
	GT	12,0	57,1	10,0	34,5	
	GG	2,0	9,5	4,0	13,8	0,280
<i>MDM4</i> (rs1563828)	T	26,0	61,9	40,0	69,0	
	G	16,0	38,1	18,0	31,0	0,601
	CC	5,0	23,8	11,0	37,9	
	TC	11,0	52,4	12,0	41,4	
<i>USP7</i> (rs1529916)	TT	5,0	23,8	6,0	20,7	0,567
	C	21,0	50,0	34,0	58,6	
	T	21,0	50,0	24,0	41,4	0,514
	GG	10,0	47,6	16,0	55,2	
<i>TP63</i> (rs1706395)	GA	10,0	47,6	12,0	41,4	
	AA	1,0	4,8	1,0	3,5	0,863
	G	30,0	71,4	44,0	75,9	
	A	12,0	28,6	14,0	24,1	0,788
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	TT	12,0	57,1	18,0	62,1	
	GT	9,0	42,9	11,0	37,9	
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,953
	T	33,0	78,6	47,0	81,0	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	G	9,0	21,4	11,0	19,0	0,959
	GG / CC	6,0	28,6	14,0	48,3	
	GA / CT	12,0	57,1	14,0	48,3	
	AA / TT	3,0	14,3	1,0	3,5	0,207
<i>TP73</i> (rs1801173)	G / C	24,0	57,1	42,0	72,4	
	A / T	18,0	42,7	16,0	27,6	0,168

* Não = Sem relatos de abortamento; ** Sim = Relatos de abortamento;

*** Qui-quadrado

Procurando compreender melhor o papel da via de *TP53* e seus polimorfismos na reprodução, comparamos as frequências encontradas na nossa população em estudo composta por mulheres férteis, com mulheres que apresentam perdas gestacionais recorrentes (PGR) idiopáticas, na população brasileira, estudadas por nosso grupo (Fraga et al., 2014 e Fraga et al., 2014). A frequência alélica e genotípica dos SNPs

testados no gene *TP73* foram estatisticamente diferentes entre as populações comparadas (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e perdas gestacionais recorrentes.

Gene	Genótipo / Alelo	MN*		PGR**		p***
		n	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	18,0	36,0	57,0	47,5	0,206
	GC	27,0	54,0	47,0	39,2	
	CC	5,0	10,0	16,0	13,3	
	G	63,0	63,0	161,0	67,1	
	C	37,0	37,0	79,0	32,9	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	22,0	44,0	64,0	53,3	0,549
	GT	22,0	44,0	45,0	37,5	
	GG	6,0	12,0	11,0	12,5	
	T	66,0	66,0	173,0	68,7	
	G	34,0	34,0	67,0	31,3	
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	30,0	60,0	98,0	64,1	0,175
	GT	20,0	40,0	47,0	30,7	
	GG	0,0	0,0	8,0	5,2	
	T	80,0	80,0	243,0	79,4	
	G	20,0	20,0	63,0	20,6	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	20,0	40,0	99,0	64,7	0,008
	GA / CT	26,0	52,0	47,0	30,7	
	AA / TT	4,0	8,0	7,0	4,6	
	G / C	66,0	66,0	245,0	80,1	
	A / T	34,0	34,0	61,0	19,9	

* População de Monte Negro (este estudo);

** Perdas Gestacionais Recorrentes, população brasileira;

*** Qui-quadrado

Tratando-se de avaliar a possível relação dos polimorfismos da via do gene *TP53* e a apresentação de neoplasias por parte dos indivíduos analisados e de seus parentes de primeiro grau não se encontrou nenhuma associação significativa com nenhum dos polimorfismos estudados para ambos os casos (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e ocorrência de câncer em parentes de primeiro grau.

Gene	Genótipo / Alelo	Não*		Sim**		p***
		n	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	29,0	43,3	7,0	29,2	
	GC	31,0	46,3	14,0	58,3	
	CC	7,0	10,5	3,0	12,5	0,478
	G	89,0	66,4	28,0	58,3	
<i>LIF</i> (rs929271)	C	45,0	33,6	20,0	41,7	0,408
	TT	30,0	44,8	12,0	50,0	
	GT	29,0	43,3	9,0	37,5	
	GG	8,0	11,9	3,0	12,5	0,882
<i>MDM4</i> (rs1563828)	T	89,0	66,4	33,0	68,8	
	G	45,0	33,6	15,0	31,3	0,907
	CC	18,0	26,9	9,0	37,5	
	TC	31,0	46,3	12,0	50,0	
<i>USP7</i> (rs1529916)	TT	18,0	26,9	3,0	12,5	0,316
	C	67,0	50,0	30,0	62,5	
	T	67,0	50,0	18,0	37,5	0,186
	GG	39,0	58,2	9,0	37,5	
<i>TP63</i> (rs1706395)	GA	25,0	37,3	12,0	50,0	
	AA	3,0	4,5	3,0	12,5	0,145
	G	103,0	76,9	30,0	62,5	
	A	31,0	23,1	18,0	37,5	0,082
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	TT	36,0	53,7	15,0	62,5	
	GT	31,0	46,3	9,0	37,5	
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,615
	T	103,0	76,9	39,0	81,3	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	G	31,0	23,1	9,0	18,8	0,669
	GG / CC	30,0	44,8	10,0	41,7	
	GA / CT	34,0	50,8	12,0	50,0	
	AA / TT	3,0	4,5	2,0	8,3	0,771
<i>TP73</i> (rs1801173)	G / C	94,0	70,2	32,0	66,7	
	A / T	40,0	29,9	16,0	33,3	0,790

* Não = sem relatos de câncer; ** Sim = relatos de câncer; *** Qui-quadrado

Finalmente, avaliamos também os polimorfismos da via de *TP53* quanto a uma possível relação com a longevidade (Tabela 11). O genótipo GG do gene *TP53* apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P = 0,020$). Os demais polimorfismos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quando analisados separadamente.

Tabela 11. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes da via regulatória do gene *TP53* e possível relação com longevidade.

Gene	Genótipo / Alelo	≤ 71 anos		> 71 anos		p*
		n	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	18,0	36,0	18,0	43,9	0,020
	GC	30,0	60,0	15,0	36,6	
	CC	2,0	4,0	2,0	4,9	
	G	66,0	66,0	51,0	62,2	
	C	34,0	34,0	32,0	39,0	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	23,0	46,0	19,0	46,3	0,628
	GT	20,0	40,0	18,0	43,9	
	GG	7,0	14,0	4,0	9,8	
	T	66,0	66,0	56,0	68,3	
	G	34,0	34,0	26,0	31,7	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	15,0	30,0	12,0	29,3	0,964
	TC	24,0	48,0	19,0	46,3	
	TT	11,0	22,0	10,0	24,4	
	C	54,0	54,0	43,0	52,4	
	T	46,0	46,0	39,0	47,1	
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	22,0	44,0	26,0	63,4	0,132
	GA	25,0	50,0	12,0	29,3	
	AA	3,0	6,0	3,0	7,3	
	G	69,0	69,0	64,0	78,1	
	A	31,0	31,0	18,0	21,9	
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	25,0	50,0	26,0	63,4	0,229
	GT	25,0	50,0	15,0	36,6	
	GG	0,0	0,0	0,0	0,0	
	T	75,0	75,0	67,0	81,7	
	G	25,0	25,0	15,0	18,2	
<i>TP73</i> (rs22739530 e rs1801173)	GG / CC	18,0	36,0	22,0	53,7	0,135
	GA / CT	30,0	60,0	16,0	39,0	
	AA / TT	2,0	4,0	3,0	7,3	
	G / C	66,0	66,0	60,0	73,1	
	A / T	34,0	34,0	22,0	26,8	

*Qui-quadrado

Recentes estudos têm sugerido uma relação entre o gene *TP53* e alguns genes de sua rota de sinalização com a fertilidade humana, em especial o gene *LIF* que teria como uma de suas funções promover condições para a implantação do blastocisto no endométrio uterino (Wenwei Hu, 2009; Toth *et al*, 2011; Shuya *et al*, 2011; Feng *et al*, 2011; Hu *et al*, 2011; Levine *et al*, 2011; Lemons *et al*, 2012; Mariee *et al*, 2012; Corbo *et al*, 2012; Paskulin *et al*, 2012; Suman *et al*, 2013; Krishnan *et al*, 2013; Salleh *et al*, 2014; Liu *et al*, 2014; Franasiak *et al*, 2014; Gong *et al*, 2015; Winship *et al*, 2015; Liu *et al*, 2015; Nicola *et al*, 2015) e ser um dos fatores responsáveis pela implantação extra-uterina do embrião, condição conhecida como gravidez ectópica (Krishnan *et al*, 2013).

Baseado nas evidências de que genes da rota de sinalização de *TP53* participam da regulação materna da reprodução, nossa hipótese de trabalho é de que polimorfismos funcionais nesta via possam desempenhar papel ligado à fertilidade e longevidade. Assim, neste estudo, avaliamos a relação entre polimorfismos da via de *TP53* e fatores relacionados à fertilidade em uma população de mulheres longevas, que já haviam encerrado seu período reprodutivo (encerrado seu período de menacme), oriunda do município de Monte Negro, interior do estado de Rondônia.

Esta população foi escolhida levando em consideração, ser uma área rural na Amazônia legal brasileira, com pouca prática de medidas contraceptivas, e planejamento familiar (Ferreira *et al.*, 2002). Teoriza-se que os dados obtidos quanto ao seu histórico obstétrico advenham, quase que em sua totalidade, de efeito biológico, o que nos permite inferências quanto ao efeito dos polimorfismos em estudo nas características analisadas.

A amostra foi classificada através de auto-declaração de cor de pele, conforme as categorias adotadas pelo IBGE. Esta classificação no presente estudo está de acordo com estudos anteriores realizados nesta população (Ferreira *et al*, 2002). Contudo, vários estudos têm mostrado que a classificação baseada na auto-declaração não é muito fidedigna no que tange a estrutura étnica da população devido à grande dissociação existente entre a cor auto declarada por um indivíduo e sua ancestralidade genômica (Parra *et al*, 2003; Pimenta *et al*, 2006; Suarez-Kurtz *et al*, 2007; Santos *et al*, 2009;

Lins *et al*, 2011; Pena *et al*, 2011). Mesmo que os indivíduos da amostra estudada tenham se declarado, em sua maioria, pardos ou pretos as frequências alélicas encontradas se mostraram semelhantes às da população européia registradas no 1000 Genomes Project Consortium (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). Esta semelhança se justifica pelo fato deste município ter sido colonizado por indivíduos provenientes, em sua maioria, das regiões Sul e Sudeste do Brasil, compostas majoritariamente de euro-descendentes (Camargo *et al*, 2002).

O número de gestações apresentou um valor significativo apenas para o polimorfismo c.*1414A>C (rs929271) do gene *LIF* quando analisada a frequência alélica ($P = 0,044$) com o alelo T sendo o mais freqüente no grupo com maior número de gestações (82,4%). Sendo assim, nossos dados também apontam para a direção de uma influência positiva do alelo T no processo de implantação dos embriões no endométrio materno uma vez que ele se mostrou significativamente mais freqüente no grupo com maior número de gestações. O impacto desse polimorfismo na ação de *LIF* ainda não foi totalmente elucidado. Supõem-se que seu efeito esteja relacionado com alterações nos níveis de expressão de *LIF* em função de sua localização na região 3' UTR desse gene, região transcrita e não traduzida, que contém elementos responsáveis pela modulação da expressão através da regulação da clivagem, estabilidade, poliadenilação, tradução, localização e interação com outros tipos de RNAs (Barrett, 2012). Tais inferências se baseiam apenas nas funções relacionadas à sua localização uma vez que não existem, até o momento, estudos relacionando esse polimorfismo com variações nos níveis de mRNA e em sua atividade (Oliveira *et al*, 2016). O *LIF* é um importante fator para o sucesso da implantação em humanos. O gene *LIF* é expresso continuamente no endométrio mas apresenta um pico transitório de expressão durante a gravidez, esse pico coincide com a janela de implantação por volta do 12 dia após a fertilização em humanos (Paskulin *et al*, 2013).

Kang e colaboradores (2009) relacionaram o alelo G com infertilidade. Eles observaram que a frequência do alelo G estava aumentada em mulheres com problemas de infertilidade, com menos de 35 anos, mas não em mulheres com mais de 35 anos pacientes de uma clínica de fertilização in vitro, sugerindo que o impacto desse polimorfismo possa ser influenciado pela idade. Os demais polimorfismos estudados não mostraram significância estatística quanto a sua relação com processos envolvendo aumento na fertilidade dos indivíduos amostrados.

Avaliamos uma possível relação entre a idade de início da menopausa e os polimorfismos estudados. A amostra foi separada em dois grupos usando a idade de 51 anos como ponto de corte (Pedro et al, 2009). Foi encontrada significância estatística quanto aos genótipos do polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53* ($P = 0,033$) com o genótipo heterozigoto (GC) mais freqüente (67,7%) em mulheres com início da menopausa antes dos 51 anos de idade. Não há na literatura nenhuma relação deste polimorfismo com a data de início da menopausa. Sharpless e colaboradores citam o surgimento da menopausa mais cedo como uma manifestação de um fenótipo de envelhecimento, estando então essa característica mais fortemente associada com o envelhecimento como um todo do organismo do que a um efeito específico deste polimorfismo sobre a manutenção do pool de oócitos (Sharpless *et al*, 2002). Os demais polimorfismos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quando analisados separadamente.

A amostra foi analisada também para a idade de ocorrência da menarca e dividida em dois grupos: um composto por mulheres que relataram a ocorrência da menarca com idade inferior ou igual a 12 anos de idade e outro com mulheres que relataram a ocorrência da menarca com idade superior a 12 anos.

Apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa, observou-se tendência de maior ocorrência de abortos com o alelo G no polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53*. Outros estudos indicam que o alelo G é mais eficiente em interromper processos de diferenciação celular e em induzir apoptose (Thomas *et al*, 1999; Dumont *et al*, 2003; Pietro *et al*, 2013; Volodko *et al*, 2015). Resultado semelhante foi obtido por nosso grupo de pesquisa analisando as altas taxas de nascimento de gêmeos no município de Cândido Godói (Tagliani-Ribeiro *et al*, 2012) onde os dados apontaram para uma forte relação entre o nascimento de gêmeos e uma baixa atividade apoptótica do alelo C do polimorfismo P72R de *TP53*. Ou seja, com uma atividade apoptótica menos efetiva, pequenas alterações poderiam não ativar uma resposta efetiva de eliminação do embrião e o número de nascimentos tenderia a ser maior. Em contra partida, com uma atividade apoptótica mais efetiva por parte do alelo G tenderia a ocorrer uma ativação mais sensível e, por conseguinte, uma redução no número de gestações com partos a termo.

Os dados que obtivemos sobre ocorrência de câncer em parentes de primeiro grau dos indivíduos amostrados não mostraram significância estatística com relação aos polimorfismos estudados. No entanto, houve uma tendência do polimorfismo c.2719-234G>A (rs1529916) do gene *USP7* estar associado com a com a incidência de câncer em parentes de primeiro grau, tanto para o alelo A quanto para o genótipo AA. Sun e colaboradores (2010) observaram que o alelo A confere um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de próstata de uma maneira recessiva (Sun *et al*, 2010).

Outro aspecto avaliado foi a relação dos polimorfismos estudados com a longevidade dos indivíduos amostrados. A amostra foi dividida em dois grupos quanto a sua faixa etária usando como ponto de corte a expectativa média de vida para o estado de Rondônia, 71 anos, conforme dados obtidos do censo de 2010 do IBGE. Os dados encontrados quanto à relação do genótipo GG do polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) do gene *TP53* mostram um aumento na frequência desse genótipo em indivíduos com mais de 71 anos de idade e uma alta frequência de indivíduos heterozigotos (GC) em indivíduos com menos de 71 anos de idade. Na literatura encontramos que os indivíduos portadores do alelo C tendem a viver mais em comparação com portadores do alelo G (Rebbani *et al*, 2015).

Em 2005 van Heemst e colaboradores publicaram um estudo feito com 1.226 indivíduos com mais de 85 anos e onde mostram que indivíduos portadores do alelo C, embora mais propensos ao desenvolvimento de câncer em, função de uma atividade apoptótica menos efetiva, viveram significativamente por mais tempo do que os portadores do alelo G (van Heemst *et al*, 2005). Em 2008, Bojesen e colaboradores examinando 9.219 indivíduos com idades entre 20 e 95 anos concluíram que entre indivíduos homozigotos CC a expectativa de vida aumentava quando comparados com indivíduos homozigotos GG ($P = 0.002$) e, segundo o autor, isso seria em função não apenas de um risco diminuído de morrer por câncer, mas por um aumento nas taxas de sobrevivência a outras doenças, aumentando a robustez dos indivíduos portadores do genótipo CC (Bojesen *et al*, 2008). Uma vez que o envelhecimento é entendido como um acúmulo, ao longo dos anos, de danos moleculares e celulares, um elemento chave no entendimento dos processos de envelhecimento seria o entendimento dos muitos efeitos do *TP53*.

Os demais polimorfismos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quando analisados separadamente. É importante observar que os indivíduos incluídos no grupo com idade inferior a 71 anos ainda estão vivos (em sua maioria) e, portanto, poderão no futuro fazer parte do grupo que superou a expectativa de vida média para a região, podendo alterar as frequências alélicas hoje observadas nestes grupos.

Notadamente, os polimorfismos do TP53 e de sua rota de sinalização são importantes para processos relacionados à fertilidade e a longevidade, bem como de outros aspectos fisiológicos e na etiologia de várias patologias. Este trabalho contribui com um melhor esclarecimento quanto ao impacto de alguns polimorfismos especificamente no processo reprodutivo humano e em sua longevidade. Os resultados obtidos reforçam o possível papel desses genes e de seus polimorfismos na regulação da fertilidade e longevidade em humanos direcionando futuros estudos na área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barboza JA, Iwakuma T, Terzian T, El-Naggar AK, Lozano G (2008) Mdm2 and Mdm4 loss regulates distinct p53 activities. *Mol Cancer Res* 6: 947–954.

Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 69, 3613–3634.

Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A e Bechman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44(5):266-270.

Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A e Levine AJ (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001198.

Bhattacharya S, Ghosh MK (2014) Cell Death and Deubiquitinases: Perspectives in Cancer. *Biomed Res Int* 2014;2014:435197.

Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 14, 359–370.

Bojesen SE, Nordestgaard BG (2008) The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle* 2008; 7:158-63.

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, et al. (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591–602.

Boquett JA, Brandalize APC, Fraga LR, Schuler-Faccini L (2012) Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21? *Disease Markers* 34(1), p. 41-49.

Brady CA, Attardi LD (2010) p53 at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 2527-2532.

Brooks CL e Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21:307-315.

Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP e Georgiev GP (1988) A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 70:245–252.

Camargo LMA, Engracia V, Pagotto RC, Basano SA, Silva LHP, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H (2002) A Rural Community in a Brazilian Western Amazonian Region: Some Demographic and Epidemiological Patterns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2:193-196.

- Campisi J (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 5:339–349.
- Censo demográfico IBGE 1940/2010.
- Chao CCK (2015) Mechanisms of p53 degradation. *Clinica Chimica Acta* 438 139–147
- Chen JR, Jr-Gang C, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L e Stewart CL (2000) Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus for Implantation But Is Not Essential for Subsequent Embryogenesis. *Endocrinology* 141:4365-4372.
- Corbo RM, Gambina G, Scacchi R (2012) How Contemporary Human Reproductive Behaviors Influence the Role of Fertility-Related Genes: The Example of the P53 Gene. *PLoS ONE* 7(4): e35431. doi:10.1371/journal.pone.0035431.
- Ding T, Song H, Wang X, Khatua A, Paria BC (2008) Leukemia inhibitory factor ligand-receptor signaling is important for uterine receptivity and implantation in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Reproduction* 135(1):41-53.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33, 357-65.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D e Qu X (2011) The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion. *Hum Reprod* 26:1252-1258.
- Feng Z, Lin M, Wu R (2011) The regulation of aging and longevity: a new and complex role of p53. *Genes Cancer*. 2011; 2: 443–452.
- Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ et al. (2011) Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 25(7):2245-2255.
- Ferreira RG, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LM, Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H (2002) Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. *Hum Biol* 74:607-14.
- Firouzabadi RD, Ghasemi N, Rozbahani MA e Tabibnejad N (2009) Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 49:216-219.
- Franasiak JM, Holoch KJ, Yuan L, Schammel DP, Young SL, Lessey BA (2014) Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus $\alpha\beta 3$ testing in women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 101(6): 1724–1731.
- Giess R, Tanasescu I, Steck T e Sendtner M (1999) Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Molecular Human Reproduction* 5:581–586.

- Gong X, Lou J, Lu Q, Huang H, Jin Z (2015) Bu Shen Huo Xue decoction restores endometrial leukemia-inhibitory factor but not Angiopoietin-2 expression, and improves uterine receptivity in the controlled ovarian stimulation rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9: 751-757.
- Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB (2009) P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2:494-498.
- Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T (2003) Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 9:785-791.
- Hartge P (2009) Genetics of reproductive lifespan. *Nat Genet* 41:637–638.
- Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G e Levine AJ (2007) A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells. *Cancer Res* 67:2757-2765.
- Hu, W. (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;00:a001073.
- Hu W, Zheng T, Wang J (2011) Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes Cancer* 4:420-430.
- Iwakuma T, Lozano G (2007) Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. *Oncogene* 2;26(15):2177-84.
- Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24):9761-9766.
- Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB (2006) p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 4:492-496.
- Khoronenkova SV, Dianov GL (2012) Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage. *Cell Cycle* 1; 11(13): 2409–2410.
- Kirkwood TB (1997) The origins of human ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1765-1772.
- Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi A, Inoue N, Ohmori Y, Hondo E (2014) The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. *Immunobiology*, Volume 219, Issue 7, Pages 512-521.
- Krishnan T, Winship A, Sonderegger S, Menkhorst E, Horne AW, Brown J, Zhang JG, Nicola NA, Tong S, Dimitriadis E (2013) The role of leukemia inhibitory factor in tubal ectopic pregnancy. *Placenta* 34 (2013) 1014e1019.

Lemos AR, Naz RK (2012) Birth Control Vaccine Targeting Leukemia Inhibitory Factor. *Mol Reprod Dev* 79(2): 97–106. doi:10.1002/mrd.22002.

Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW e Melino G (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:259-65.

Licht P, Losch A, Dittrich R, Neuwinger J, Siebzehnrubl E, Wildt L (1998) Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. *Hum Reprod Update* 4, 532-538.

Lim KH, Ramakrishna S, Baek KH (2013) Molecular mechanisms and functions of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes. *Cytokine Growth Factor Rev* 24, 427–431.

Lim KH, Park JJ, Gu BH, Kim JO, Park SG, Baek KH (2015) HAUSP-nucleolin interaction is regulated by p53-Mdm2 complex in response to DNA damage response. *Nature* 5:12793 DOI: 10.1038/srep12793.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, et al (2011) Genetic Heterogeneity of Self-Reported Ancestry Groups in an Admixed Brazilian Population. *J Epidemiol*, doi:102188/jeaJE20100164.

Liu S, Wang J, Qin HM, Yan XM, Yang XS, Liu C, Yan Q (2014) LIF upregulates poFUT1 expression and promotes trophoblast cell migration and invasion at the fetal–maternal interface. *Cell Death and Disease* (2014) 5, e1396.

Liu J-L, Wang T-S (2015) Systematic analysis of the molecular mechanism underlying decidualization using a text mining approach. *PLoS ONE* 10(7): e0134585. Doi:10.1371/journal.

Luna RMD, Wagner DS, Lozano G (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378:203-206.

Marine J-C, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F e Lozano G (2006) Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* 13:927–934.

Mariee N, Li TC, Laird SM (2012) Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells. *Human Reproduction*, Vol.27, No.7 pp. 1946–1954.

Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J (2007) The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women - a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 1:65-74.

National Research Council (2003) Offspring: Human Fertility Behavior in Biodemographic Perspective. Washington, DC: The National Academies Press.

Nicola NA, Babon JJ (2015) Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26 (2015) 533–544

Oliveira JB, Vagnini LD, Petersen CG, Renzi A, Oliveira-Pelegrin GR, Mauri AL, Ricci J, Massaro FC, Dieamant F, Cavagna M, Baruffi RLR, Franco JG (2016) Association between leukaemia inhibitory factor gene polymorphism and pregnancy outcomes after assisted reproduction techniques. *Reproductive BioMedicine Online* 32, 66–78.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, et al (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 177–182.

Paskulin DD, Cunha-Filho JS, Souza CA, Bortolini MC, Hainaut P, Ashton-Prolla P (2012) TP53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death Dis* 3, e392.

Paskulin DD, Cunha-Filho JS, Paskulin LD, Souza CAB, Ashton-Prolla P (2013) ESR1 rs9340799 Is Associated with Endometriosis-Related Infertility and In Vitro Fertilization Failure. *Disease Markers* 35 Issue 6, Pages 907–913.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6: e17063.

Perry ME (2010) The Regulation of the p53-mediated Stress Response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1): a000968.

Pietro FD, Dato S, Carpi FM, Corneveaux JJ, Serfaustini S, Maoloni S, Mignini F, Huentelman MJ, Passarino G, Napolioni V (2013) TP53*P72 Allele Influences Negatively Female Life Expectancy in a Population of Central Italy: Cross-Sectional Study and Genetic-Demographic Approach Analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013 May;68(5):539–545.

Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC e Tempfer C (2005) Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumor suppressor gene. *Hum Reprod* 4:848–851.

Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, et al (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62: 190–195.

Reed SM, Quelle DE (2015) p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* 7, 30-69; doi:10.3390/cancers7010030.

Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI (2006) Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* 10(6):501-14.

- Salleh N, Giribabu N (2014) Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception. *The Scientific World Journal* Article ID 201514, 10. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/201514>
- Santos RV, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC, et al (2009) Color, race, and genomic ancestry in Brazil: dialogues between anthropology and genetics. *Curr Anthropol* 50: 787–819.
- Shangary S, Wang S (2009) Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:223-41.
- Sharpless NE, De Pinho RA (2002) p53: good cop/bad cop. *Cell* 110(1):9-12.
- Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J, Li P, Lane N, Dimitriadis E (2011) Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endometrial Stromal Cell Decidualization in Humans and Mice. *PLoS ONE* 6(9): e25288. doi:10.1371/journal.pone.0025288.
- Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues L, Pena SD (2007) Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 17: 765–771.
- Suman P, Malhotra SS, Gupta SK (2013) LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *JAK-STAT* 2:e25155; <http://dx.doi.org/10.4161/jkst.25155>.
- Sun T, Lee GSM, Oh WK, Pomerantz M, Yang M, Xie W, Freedman ML, Kantoff PW (2010) Single-nucleotide Polymorphisms in p53 Pathway and Aggressiveness of Prostate Cancer in a Caucasian Population. *Clin Cancer Res* 1; 16(21): 5244–5251.
- Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJ, Schuler-Faccini L, Matte U (2012) High twinning rate in Candido Godoi: a new role for p53 in human fertility. *Hum Reprod* 27:2866-2871.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061–1073.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L e Matlashewski G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092–1100.
- Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S (2014) Recurrent Implantation Failure: The Role of the Endometrium. *J Reprod Infertil* 15(4):173-183.
- Toth B, Würfel W, Germeyer A, Hirv K, Makrigiannakis A, Strowitzki T (2011) Disorders of implantation – are there diagnostic and therapeutic options? *Journal of Reproductive Immunology* 90 117– 123.

van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJ, Brandt BW, et al (2005) Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol* 40:11-5.

Ventura-Juncá P, Irrarázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ (2015) In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biol Res* 48:68.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 6810:307–310.

Volodko N, Salla M, Eksteen B, Fedorak RN, Huynh HQ, Baksh S (2015) TP53 codon 72 Arg/Arg polymorphism is associated with a higher risk for inflammatory bowel disease development. *World J Gastroenterol* 28; 21(36): 10358-10366

Vucic D, Dixit VM, Wertz IE (2011) Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 439-452.

Wahl GM (2006) Mouse bites dogma: how mouse models are changing our views of how P53 is regulated in vivo. *Cell Death Differ* 13, 973-983.

Hu W (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *CSH Perspectives in Biology* 1: 209-220.

Wilkosz P, Greggains GD, Tanbo TG, Fedorcsak P (2014) Female Reproductive Decline Is Determined by Remaining Ovarian Reserve and Age. *PLoS One* 9(10): e108343. Published online 2014 Oct 13. doi: 10.1371/journal.pone.0108343.

Winship A, Correia J, Zhang JG, Nicola NA, Dimitriadis E (2015) Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Inhibition during Mid-Gestation Impairs Trophoblast Invasion and Spiral Artery Remodelling during Pregnancy in Mice. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0129110.

ANEXO I

RSGA – CHRONUS

IDENTIFICAÇÃO: Quadra: _____ Casa: _____

REGISTRO	ÚNICO	ICB5/USP:
_____	_____	_____

Nome:							
Sexo: M F I		Idade anos:		Natural de: UF:		Etnia: P N B A I	
Residente em MN desde:							
Situação conjugal: Solteiro Viúvo Companheiro (a)							
Situação econômica Trabalha Fora S N Trabalha em Casa S N Incapaz S N Aposentado S N		Etilista Quant. _____ Tempo: _____		História Pregressa MH: () S () N () NSI _____ TB: () S () N () NSI _____ VHB: () S () N () NSI _____ LTA: () S () N () NSI _____ Malária: () S () N () NSI () Vivax () Falciparum Quantas vezes: _____			
Renda Familiar: R\$ _____		Tabagista Quant. _____ Tempo: _____		Atualmente apresenta alguma das patologias acima: S N Qual?			
Qual Atividade CNAE?		Mascar Tabaco Quant. _____ Tempo: _____					
Contato Frequente com agrotóxico? Mensal Semestral Anual Eventual							
DM 1 DM 2 HAS DISLIPIDEMIA HBV HCV HIV CÂNCER GERAL CÂNCER DE PELE AVE OSTEOPOROSE IRC IAM ICC CIRROSE CHAGAS GASTRITE/ÚLCERA CATARATA USO DE LENTES CEGUEIRA CADEIRANTE MULETAS DEPRESSÃO PRÓTESE DENTÁRIA PARCIAL PRÓTESE DENTÁRIA TOTAL PARCIAL OUTRAS							
EXAMES							
Glicemia	TSH	Colesterol	LDL	HDL	TG	IMC	Circ. Abdo.
Clearance Renal		Proteinúria (EAS)		Relação P/C Urina		PSA:	
PAm		ITB		RXT			
ECG:							
Densitometria Óssea: normal osteopenia osteoporose							
Uso de Medicamentos:							

Responsável: _____

Data: _____

ANEXO II

FERTILIDADE E LONGEVIDADE – TP53

RG ICB5/USP: _____ Data: _____

Sexo: () M () F

Se F - Ano Menarca: _____ Data Menopausa: _____

Se F - História Obstétrica: G _____ P _____ A _____ Filhos Vivos _____

Ano Nascimento Último Filho: _____

Algum parente em primeiro grau com doença genética? SE positivo, descreva.

() CÂNCER (tipo), parente afetado _____

() DEFEITO DE NASCENÇA _____

() OUTRO PROBLEMA _____

Usou algum método anticoncepcional? Se sim, durante quantos anos, aproximadamente e qual método?

1. HEREDOGRAMA (com ano de nascimento dos filhos das perdas gestacionais)

FILHO	NV/NM/Ab	Ano nascimento	Algum problema? (descreva)	Faleceu? Ano?
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				

NV= nativo NM= Natimorto Ab=Aborto

Todos os filhos do mesmo pai? () Sim () Não (anotar quais filhos de cada pai).

Consangüinidade entre os pais? () Sim () Não.

Responsável Preenchimento: _____