

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

POLIMORFISMO DO GENE *TP53* NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL

AUTORA: SIMONE SANTANA CONTU
ORIENTADOR: DANIEL CARVALHO DAMIN
TESE DE DOUTORADO

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

POLIMORFISMO DO GENE *TP53* NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL

AUTORA: SIMONE SANTANA CONTU
ORIENTADOR: DANIEL CARVALHO DAMIN
TESE DE DOUTORADO

2011

C765i **Contu, Simone Santana**

Polimorfismo do gene *TP53* no câncer de canal anal / Simone

Santana Contu ; orientador Daniel Carvalho Damin. – 2011.

71 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Neoplasias do ânus 2. Polimorfismo genético 3. Genes p53l4.

Códon 5. Arginina 6. Prolina I. Damin, Daniel Carvalho II. Título.

NLM: WI 610

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Daniel Carvalho Damin**, pela oportunidade e orientação deste trabalho .

À **Dra. Andreia Pires Souto Damin**, pela disponibilidade e auxílio no processamento e análise molecular.

Ao estatístico **Mathias Bressel**, pela orientação na análise estatística dos dados.

À **Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, por sua eficiência, presteza, atenção e solicitude.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pelo financiamento através do Programa Bolsa de Doutorado.

Ao **Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**, pela logística necessária à execução deste trabalho, particularmente ao **Prof. Dr. Claudio Osmar Pereira Alexandre** e à **Farmacêutica-Bioquímica Grasiela Agnes**, pela orientação, planejamento e realização técnica.

A todas aquelas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus irmãos **Kléber, Ulisses, Andrea e Gabriela**, pela amizade.

À minha mãe, **Eloá**, pelo apoio.

Aos meus queridos filhos, **Ana Paula, Maria Eduarda e Pedro**, motivos de realização e felicidade.

Ao meu esposo **Paulo de Carvalho Contu**, pelo auxílio e amor.

A Deus.

Ao meu pai, Santana (in memoriam)

SUMÁRIO

Lista de Figuras	06
Lista de Tabelas	07
Lista de Abreviaturas e Símbolos	08
INTRODUÇÃO	09
REVISÃO DA LITERATURA	11
Câncer de canal anal	11
Gene <i>TP53</i>	12
Polimorfismo do gene <i>TP53</i>	14
Polimorfismo do gene <i>TP53</i> e câncer	19
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	47
Parecer do comitê de Ética em Pesquisa	47
Artigo publicado em inglês	48
Artigo em português	54

Lista de Figuras

- Figura 1. Estrutura da proteína p53 e a localização do
“domínio rico em prolina” correspondente ao códon 72 **15**
- Figura 2. Fotografia do gel de agarose com os resultados
da PCR e RFLP **27**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características demográficas de pacientes com câncer e controles	29
Tabela 2. Distribuição do polimorfismo no códon 72 do gene <i>TP53</i> em pacientes com câncer e controles	30
Tabela 3. Distribuição do polimorfismo no códon 72 do gene <i>TP53</i> em controles, conforme a idade	31

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANOVA – Análise de variância

Arg – Arginina

CHSCMPA – Complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto

Alegre

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPV – *Human papillomavirus*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IC – Intervalo de Confiança

Kb – quilobases

Kd – quilodaltons

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NIA – Neoplasia intraepitelial anal

OR – *Odds Ratio*

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Pro – Prolina

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

TP53 – *Tumor Protein 53*

INTRODUÇÃO

O câncer de canal anal é uma neoplasia rara e de incidência geográfica variável, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico mais freqüente.

O papilomavírus humano (HPV) foi identificado como o principal agente causador do carcinoma epidermóide de canal anal visto que está relacionado com o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial anal, a lesão precursora do carcinoma invasivo. Os subtipos 16 e 18, com atividade oncogênica documentada, foram detectados em até 90% dos casos de carcinoma epidermóide de canal anal.

As mutações do gene *TP 53* estão presentes em várias neoplasias, sendo uma das alterações genéticas mais estudadas no câncer. Além das mutações, também tem sido investigada a presença de polimorfismos no gene *TP53*, como o que ocorre no códon 72 do exon 4, e que resulta na codificação de arginina (CGC) ou prolina (CCC). Este polimorfismo possui variação na sua freqüência que envolve a etnia da população e o clima da região estudada. Muitos estudos investigaram as associações deste polimorfismo do *TP53* com aumento de risco para tumores malignos associados à infecção pelo HPV, a exemplo do câncer de colo uterino, sugerindo que determinados padrões deste polimorfismo possam aumentar o risco para o desenvolvimento desta neoplasia ginecológica.

Neste contexto, este estudo tem como objetivo determinar a distribuição do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* em uma amostra de pacientes com carcinoma de canal anal e compará-la com a distribuição em um grupo controle sem neoplasia.

REVISÃO DA LITERATURA

Câncer de canal anal

O câncer de canal anal é uma neoplasia rara, correspondendo a 1,9% dos tumores malignos do sistema digestório¹. Tem incidência geográfica global variável, com taxa anual que varia de 0,1 a 2,8 casos por 100.000 homens e de zero a 2,2 casos por 100.000 mulheres². Nos Estados Unidos, o índice de incidência anual é de 1,5 casos por 100.000 habitantes³ e estima-se que 5.260 novos casos sejam diagnosticados e 720 óbitos ocorram em 2010⁴. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, a estimativa de novos casos em 2009 foi de 539 em homens e 1.078 em mulheres e, em 2006, houve 233 óbitos, sendo 71 homens e 162 mulheres⁵. O tipo histológico mais freqüente, correspondendo a aproximadamente 85% dos casos, é o carcinoma epidermóide, sendo a neoplasia intraepitelial anal (NIA) a lesão precursora.

Tanto a NIA quanto o câncer de canal anal invasivo, assim como o câncer invasivo de cérvix, têm sido relacionados etiologicamente à infecção pelo HPV, especialmente aos tipos 16 ou 18, que apresentam atividade oncogênica documentada^{6,7}. Conforme revisão publicada por Hoots e colaboradores, o HPV foi detectado em 71% dos carcinomas anais invasivos, sendo cerca de 72% destes associados com os subtipos 16 ou também 18⁸. Esta prevalência estimada do HPV 16 e 18 é semelhante àquela encontrada em carcinomas invasivos de colo uterino⁹. Além disso, nos últimos 30 anos, a

incidência do carcinoma anal escamoso e da NIA têm aumentado na população em geral, associada principalmente ao gênero feminino, infecção pelo HPV, número de parceiros sexuais, lesões genitais, tabagismo, intercurso anal receptivo, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), história de câncer cervical, vaginal e vulvar e imunossupressão após transplante de órgãos sólidos. Desta forma, considerando os aspectos relacionados com a etiologia, o câncer anal é mais similar às neoplasias malignas genitais do que aos tumores gastrointestinais^{10,11}.

Gene *TP53*

Algumas das alterações genéticas mais estudadas associadas ao câncer estão relacionadas ao gene *TP53*. Localizado no cromossomo 17p13.1, este gene tem tamanho aproximado de 20 quilobases (kb), possui 11 exons e codifica a proteína nuclear p53, com 393 aminoácidos e peso molecular de 53 quilodaltons (kDa), razão da sua denominação¹². Pertence a uma família de genes que inclui outros genes, como o *TP63* e o *TP73*. Em humanos, foi estudado inicialmente na síndrome de Li-Fraumeni, doença genética rara em que ocorre aumento da frequência de diversos tumores em decorrência da herança de uma cópia mutada do gene *TP53*¹³.

Sua função primária está relacionada à preservação do código genético de cada célula, ou seja, à manutenção da mesma sequência de nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA. Quando as células sofrem alterações que representam estresse celular, tais como o dano direto ao DNA, aberrações

cromossômicas, ativação de oncogenes, hipóxia e encurtamento de telômeros, o produto deste gene torna-se ativado. Estes estímulos, muitas vezes associados com o desencadeamento e a progressão do câncer, determinam o acúmulo da proteína p53, que funciona ativando a expressão de genes atuantes em vários pontos do metabolismo celular e mediando efeitos coordenados anti-proliferativos, incluindo efeitos no ponto de checagem na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, no reparo do DNA, na apoptose, na diferenciação e na angiogênese¹⁴.

Por exercer esta função de detecção de alterações no DNA e conseqüente correção ou morte celular, a proteína p53 é considerada como uma guardiã do genoma, e é um importante elemento na prevenção do desenvolvimento de tumores, sendo seu gene codificador classificado como gene supressor tumoral. Mutações que determinem a perda funcional da proteína p53 podem, desta forma, constituírem-se em importantes contribuintes para a instabilidade genômica e cromossomal que ocorre no câncer¹⁵.

De fato, o *TP53* é um dos genes mais comumente mutados em todos os tipos de câncer humano, indicando que existe uma pressão seletiva para perda da atividade deste gene durante o desenvolvimento tumoral. Alterações no gene *TP53* estão presentes em até 80% dos carcinomas anais¹⁶. As mutações pontuais do tipo *missense*, em que ocorre a troca de apenas um nucleotídeo e conseqüente mudança de um aminoácido na cadeia polipeptídica, representam mais de 80% dessas mutações. Costumam ocorrer em etapas específicas da

carcinogênese e geralmente coincidem com o aparecimento de carcinoma in situ no cólon, trato digestório superior, mama e bexiga¹⁷.

Em alguns casos, a alteração do *TP53* coincide com a emergência de tumores biologicamente agressivos e a perda da diferenciação celular, como tumor anaplásico de Wilms, tumor de tireóide, glioma maligno ou anaplásico, melanoma metastático e invasivo, e câncer de próstata. Os exons 5 a 8 são os que sofrem maior número de mutações, já que compreendem regiões altamente conservadas durante a evolução dos vertebrados, sugerindo alto grau de importância funcional¹⁸.

Polimorfismo do gene *TP53*

Os polimorfismos genéticos são variações na seqüência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas uma base. A freqüência de alelos heterozigotos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 1% da população. Algumas dessas alterações ocorrem em seqüências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções, enquanto outras ocorrerão em seqüências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer¹⁸.

A maioria dos polimorfismos do gene *TP53* está localizada nos introns. Em tese, podem afetar a função da proteína p53 através de uma mutabilidade aumentada decorrente da seqüência alterada de DNA e modificação da estabilidade de transcrição ou tradução¹⁸.

Dos vários polimorfismos identificados no gene *TP53*¹⁸, três tem sido extensamente estudados, dentre os quais o polimorfismo no códon 72 do exon 4, que corresponde, na proteína, ao chamado “domínio rico em prolina” necessário para indução de apoptose (Figura 1). Neste domínio, pode ocorrer a presença de citosina (C) ou guanina (G). Essa substituição de bases resulta na codificação de um aminoácido arginina (CGC) ou de um aminoácido prolina (CCC) na cadeia polipeptídica¹⁹.



Figura 1. Estrutura da proteína p53 e a localização do “domínio rico em prolina” correspondente ao códon 72.

As freqüências dos alelos Arg e Pro no códon 72 possuem variação que envolve a localização geográfica da região estudada. A freqüência do alelo Pro mostra aumento do norte para o sul que varia de 17% na população sueca para 63% na população nigeriana. Também já foi demonstrada associação

significativa entre o alelo Arg e a latitude, sendo mais prevalente em populações que vivem em regiões distantes da linha do Equador. Estas variações encontradas sugerem que o polimorfismo do códon 72 é balanceado e mantido por seleção natural provavelmente determinada por pressão genética relacionada à adaptação às áreas de maior incidência solar²⁰.

Existe também correlação entre o padrão de polimorfismo do códon 72 e a composição étnica de uma determinada população. Indivíduos caucasóides apresentam mais freqüentemente o alelo Arg quando comparados com os orientais^{20,21}. Segundo alguns autores, o polimorfismo do códon 72 poderia ser utilizado como instrumento de caracterização da composição étnica de uma população. Já foram realizados estudos investigando este polimorfismo em diferentes regiões e países, incluindo indivíduos brancos, negros e hispânicos. Em cada uma destas populações verificaram-se padrões distintos e característicos de distribuição alélica²¹.

No Brasil, estudo realizado com 279 indivíduos provenientes das regiões Norte, Centro-Oeste e Sul, constatou padrões distintos de distribuição alélica entre um grupo étnico com indivíduos pertencentes a cinco tribos indígenas distintas em comparação com um segundo grupo formado por indivíduos brancos e negros. O segundo grupo, mais sujeito ao processo de miscigenação, apresentou maior variabilidade alélica do que os indígenas. Os autores constataram que as freqüências alélicas dos euro-brasileiros e dos afro-brasileiros, permaneceram semelhantes às encontradas na Europa e África respectivamente, com maior freqüência do alelo Pro na população de

raça negra (68%)²². Porém, devido à grande diversidade na composição étnica das diferentes regiões do país, os resultados podem não ser representativos da distribuição deste polimorfismo na população brasileira.

Os diferentes alelos gerados pelo polimorfismo do códon 72 resultam em alteração estrutural e funcional na proteína p53²³. A alteração estrutural na proteína foi inicialmente demonstrada pela menor velocidade de migração das variantes Pro do que das variantes Arg durante a eletroforese em gel de poliacramida¹⁹, determinando diferenças nas atividades biológicas da proteína p53.

Thomas e colaboradores, utilizando culturas celulares, demonstraram que a variante Pro promove de forma mais eficiente a expressão de uma variedade de genes que são responsáveis pela interrupção do ciclo celular na fase G1, em especial do gene *p21/WAF*, que tem papel crítico na parada do ciclo na transição G1/S²³. Já Dumont e colaboradores investigaram o potencial apoptótico das variantes Pro e Arg em culturas de células de melanoma e adenocarcinoma, demonstrando que, em linhagens celulares com níveis iguais da proteína p53, a variante Arg tem capacidade pelo menos cinco vezes maior de induzir a apoptose do que a variante Pro. Esta constatação pode estar relacionada à localização da variante Arg nas mitocôndrias e à sua maior capacidade de transferência do núcleo ao citoplasma²⁴. Além disto, as duas variantes possuem diferenças funcionais importantes no que se refere à capacidade de interagir com as proteínas celulares e a sua susceptibilidade à degradação pela proteína viral E6, considerada crítica no processo de

carcinogênese induzida pelo HPV^{23,25}, o que pode explicar a diferença no risco de desenvolvimento de tumores malignos relacionados à infecção por este vírus.

O polimorfismo do códon 72 pode ser analisado por meio de técnicas laboratoriais baseadas na PCR²⁶. O método consiste na amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA a partir de quantidades mínimas de material genético presente em um determinado meio. Uma das técnicas utilizadas no estudo do polimorfismo do códon 72 é denominada de PCR alelo específica. Consiste na utilização de *primers* específicos que amplificam os alelos Arg ou Pro em reações distintas. As seqüências dos *primers* Arg amplificam um fragmento de 141 pares de bases (pb) enquanto as seqüências dos *primers* Pro produzem um fragmento de 177 pb. Foi demonstrado, no entanto, que diferentes condições de PCR, principalmente em relação à temperatura de anelamento e concentração de magnésio nas reações, podem influenciar significativamente os resultados obtidos com o método²⁷.

O polimorfismo do códon 72 pode também ser investigado pela técnica de RFLP, que consiste na realização de PCR com *primers* que amplificam um fragmento de 199 pb, contendo a região polimórfica. Após amplificação dos fragmentos, uma digestão dos amplicons é realizada utilizando enzima de restrição específica (*Bst*UI ou *Ac*clI). Esta enzima identifica a presença do códon CGC (Arg) e cliva o fragmento produzindo dois fragmentos menores (113 bp e 86 pb). Em indivíduos homozigotos CCC (Pro) não irá ocorrer a

digestão enzimática. Desta forma, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de agarose, quando o indivíduo for homocigoto para Arg (CGC/CGC) serão visualizadas duas bandas: uma de 113 bp e uma de 86 bp. Por outro lado, em um indivíduo homocigoto Pro (CCC/CCC) será visualizado apenas um fragmento de 199 pb, já em um indivíduo heterocigoto (CCC/CGC) serão observadas três bandas, uma com 199 pb correspondente a Pro, e duas com 113 pb e 86 pb correspondentes a Arg²⁸.

Diversos estudos demonstraram que os resultados da RFLP são mais reprodutíveis e menos sujeitos a variações metodológicas que a técnica de PCR alelo específica^{29,30}. Por outro lado, a técnica de seqüenciamento direto do DNA é hoje considerada o padrão ouro para análise do polimorfismo do códon 72³⁰. Este método, embora tenha custo mais elevado, permite a determinação exata da seqüência de nucleotídeos contida no fragmento amplificado pela PCR, que é comparada com as seqüências de DNA já publicadas e disponíveis *on-line* no *GenBank* do NCBI³¹.

Polimorfismo do gene *TP53* e câncer

Diversos estudos avaliaram a associação do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* com o aumento do risco para desenvolvimento de determinados tipos de câncer. Apesar de resultados ainda controversos, a maioria dos estudos indica que a variante Arg determina maior suscetibilidade aos tumores malignos ligados à infecção pelo HPV^{32,33,34,35}.

Weston e colaboradores foram os primeiros a avaliar o polimorfismo do códon 72 e o risco de câncer de pulmão, demonstrando aumento no risco para a doença em homozigotos Pro/Pro em comparação aos heterozigotos e homozigotos para Arg³⁶. Subseqüentemente, outros estudos em pacientes com câncer de pulmão demonstraram risco maior dos indivíduos tabagistas e homozigotos para Pro, sugerindo que o polimorfismo do códon 72 possa modular a resposta individual aos agentes carcinogênicos ambientais^{35,37}. Além disso, a presença do alelo Pro em pacientes com câncer de pulmão foi associada a pior prognóstico e má resposta ao tratamento quimioterápico³⁸. Outros autores demonstraram que a homozigose para o alelo Pro pode estar associada a maior risco para o desenvolvimento de cânceres de endométrio, estômago e bexiga³⁹⁻⁴¹.

O alelo Arg, por sua vez, tem sido identificado como fator de risco para os tumores epiteliais induzidos pelo HPV. O primeiro estudo a demonstrar que o polimorfismo do gene *TP53* poderia estar relacionado à carcinogênese viral foi realizado por Storey e colaboradores que verificaram maior suscetibilidade da variante Arg à degradação da proteína E6 do HPV²⁶ e detectaram risco sete vezes maior para o desenvolvimento de carcinoma de colo uterino nas mulheres homozigotas para o alelo Arg em comparação às heterozigotas (Arg/Pro), achados reproduzidos em estudos posteriores^{29,33,34,42}.

Em contrapartida, alguns estudos falharam em demonstrar associação da homozigose do alelo Arg com o aumento de risco da carcinogênese do colo uterino associada à infecção pelo HPV⁴³⁻⁴⁵. Da mesma forma, pesquisas que analisaram tumores na cavidade oral, esôfago, pele e pulmão não detectaram associação significativa entre a presença do HPV e a homozigose do alelo Arg do gene *TP53*⁴⁶⁻⁴⁹.

Nos últimos anos, estudos foram publicados avaliando a correlação do polimorfismo do códon 72 e o risco de câncer em pacientes brasileiros. O primeiro estudo foi conduzido por Makni e colaboradores que concluíram, apesar de variação interlaboratorial, que o genótipo Arg/Arg, aumenta significativamente a suscetibilidade para a carcinogênese cervical associada à infecção pelo HPV²⁷.

Em contraste, Ferreira da Silva e colaboradores demonstraram que mulheres com genótipo Arg/Pro apresentaram risco maior para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais escamosas de alto grau e câncer de cérvix quando comparadas a mulheres com genótipo Pro/Pro⁵⁰. Outros dois estudos analisaram o polimorfismo do códon 72 em pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço não encontrando diferença significativa na distribuição genotípica entre casos e controles^{51,52}. Granja e colaboradores demonstraram um maior risco relativo para o câncer de tireóide em indivíduos homozigotos para Pro, tanto em relação a carcinoma folicular quanto em relação ao carcinoma papilar⁵³.

Até a realização do presente trabalho, não é de conhecimento dos autores a existência de estudos analisando o polimorfismo do codon 72 no câncer de canal anal.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar a distribuição do polimorfismo do códon 72 no exon 4 do gene *TP53* em pacientes com carcinoma epidermóide de canal anal.

Objetivos Específicos

Comparar a distribuição do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* entre as amostras de pacientes com carcinoma epidermóide de canal anal e controles, e estimar o risco para o desenvolvimento do câncer de canal anal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Trata-se de estudo transversal controlado.

População estudada

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de canal anal comprovado por exame anatomopatológico atendidos no Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram excluídos os pacientes com história de neoplasias prévias ou sincrônicas. Como controle, foram estudados pacientes adultos sem história prévia ou atual de neoplasia, doadores do Banco de Sangue do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CHSCMPA), étnica e geograficamente pareados com o grupo de pacientes com câncer de canal anal. Não foram incluídos os casos de indivíduos com história prévia de outras neoplasias ou com história familiar de câncer em parente de primeiro grau. Os dados demográficos e histopatológicos dos pacientes foram obtidos a partir da consulta ambulatorial no Serviço de Coloproctologia do HCPA.

O estudo foi aprovado pelos comitês científicos e de ética em pesquisa do HCPA e CHSCMPA, e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado no momento da inclusão no estudo.

Processamento das amostras para análise molecular

Foram utilizadas amostras de sangue obtidas por punção digital e coletadas no momento da inclusão dos pacientes no estudo. As amostras dos controles foram coletadas por ocasião do consentimento em participar do trabalho e armazenadas em tubos de *vacutainer* com o anticoagulante citrato de sódio.

O DNA genômico foi extraído dos linfócitos periféricos através do kit de extração *Ultra Clean DNA Bloodspin Kit* (MoBiolabs, Solana Beach, CA) conforme normas do fabricante. A análise do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* foi realizada através de PCR-RFLP, conforme descrito por Ara e colaboradores²⁸. Os *primers* utilizados foram os seguintes: senso 5'–TTGCCGTCCCAAAGCAATGGATGA-3' e anti-senso 5'–TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'. Cada reação de PCR (50 µl) continha 10 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 200mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 unidade de Platinum®Taq DNA polymerase (INVITROGEN, São Paulo, Brasil), e 100-300 nanogramas de DNA. A mistura foi pré-incubada por 5 minutos a 94°C. As amostras foram amplificadas no termociclador modelo PTC –100™ (MJ Researchs, Watertown,

Massachusetts, USA) utilizando 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1,5 % e visualizados em luz ultravioleta a partir da incorporação de brometo de etídio. Após a confirmação de um fragmento amplificado de tamanho esperado (199 pb), 10µl do produto de PCR foi digerido com 6 unidades da enzima de restrição *Bst*UI (New England Biolabs, ME) a 60°C por pelo menos 4 horas. Os fragmentos de DNA digeridos foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio. Em indivíduos homocigotos para Arg foram visualizados dois fragmentos de 113 e 86 pb. Em indivíduos homocigotos para Pro foi visualizado apenas o fragmento de 199 pb, já que não ocorre clivagem. Em indivíduos heterocigotos foram visualizados 3 fragmentos: 199 (Pro), 113 e 86 pb (Arg) (Figura 2).

Os resultados da PCR-RFLP foram confirmados através de seqüenciamento direto. Foram analisadas 9 amostras escolhidas ao acaso (3 de cada genótipo) no seqüenciador automático (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied BioSystems, Foster City, CA). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing reaction kit* (Applied BioSystems) de acordo com as instruções do fabricante. *Primers* senso foram utilizados em amostras homocigotas e em amostras heterocigotas foram utilizados *primers* senso e anti-senso.

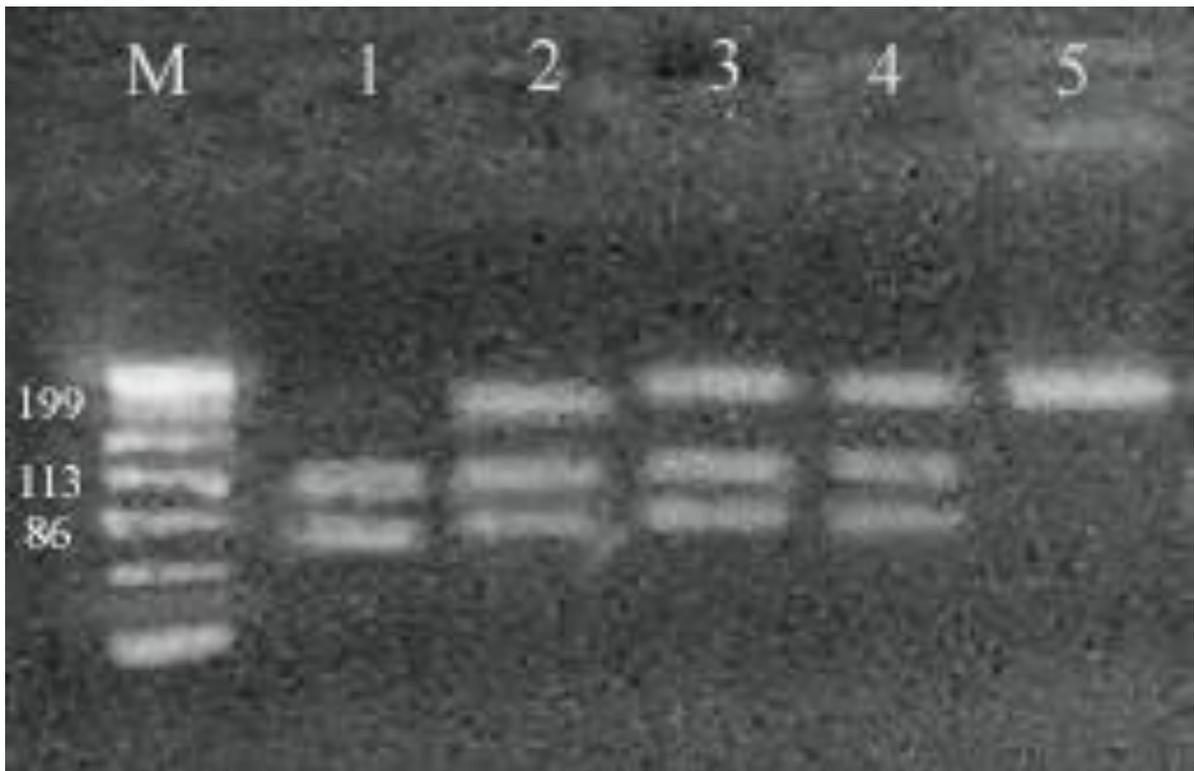


Figura 2. Detecção do polimorfismo do códon 72 por PCR-RFLP. M. 50 pb marcador; coluna 1 Arg/Arg homozigoto (113 bp and 86 bp); colunas 2, 3 e 4 Pro/Arg heterozigoto (199 bp,113 and 86bp); coluna 5 Pro/Pro homozigoto (199 bp).

Análise estatística

Análises univariadas foram utilizadas inicialmente para comparar as variáveis demográficas e a prevalência genotípica de casos e controles. O teste do qui-quadrado foi aplicado para analisar variáveis categóricas e ANOVA foi usada para comparar a idade. A associação entre polimorfismo do gene *TP53* e câncer anal foi determinada através do método de regressão logística para estimar a razão de chances (OR) e intervalo de confiança de 95%. Um valor de

P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows* (versão 12.0.1) (SPSS, Inc, Chigago, IL).

RESULTADOS

Características da amostra

A amostra estudada foi constituída de 135 indivíduos com idade média (dp) de 50,3 (9,8) anos, maioria do gênero feminino e predomínio de brancos em relação a não brancos. O grupo de casos foi constituído por 32 pacientes com carcinoma epidermóide de canal anal com média de idade de 60,3 (intervalo de 30 a 81) anos, sendo a maioria de mulheres brancas. O grupo controle foi constituído por 103 pacientes com idade média de 47,7 anos (intervalo de 40 a 72 anos) e maioria de mulheres brancas. A Tabela 1 apresenta as características demográficas dos grupos de casos e controles.

Tabela 1. Características demográficas de pacientes com câncer e controles

Características	Casos (n%)	Controles (n%)	P
Sexo			
Masculino	7 (22%)	22 (21%)	NS*
Feminino	25 (78%)	81 (79%)	
Raça			
Branca	28 (87%)	96 (93%)	NS*
Não branca	4 (13%)	7 (7%)	
Idade			
média	60,3 (30-81)	47,7 (40-72)	<0,001
Total	32 (100%)	103 (100%)	-

*Não significativo

Polimorfismo do gene *TP53*

A detecção do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* por PCR-RFLP foi possível em todos os casos e controles. O alelo Arg foi partido pelo *Bst*UI, resultando em dois pequenos fragmentos (113 e 86 pb). O alelo Pro não foi clivado pelo *Bst*UI, permanecendo com uma única banda de 199 pb. Os heterozigotos continham três bandas, correspondendo a 199, 113 e 86 pb. Os resultados do PCR foram confirmados por seqüenciamento de DNA.

A distribuição dos genótipos do códon 72 em pacientes e controles não se afastou do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As freqüências genóticas em casos e controles estão apresentadas na Tabela 2, sem associação com risco de câncer de canal anal observada. A freqüência relativa de cada alelo foi 0,60 para Arg e 0,40 para Pro em pacientes com câncer de canal anal, e 0,61 para Arg e 0,39 para Pro em controles normais.

Tabela 2. Distribuição do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* em pacientes com câncer e controles

	Total	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	OR*	IC	P
Câncer	32	10 (31,2%)	19 (59,4%)	3 (9,4%)	1,6	0,6- 4,9	0,325
Controles	103	31 (30,1%)	62 (60,2%)	10 (9,7%)	-	-	-

*Razão de chances (ajustado por idade). Arg/Arg vs. Arg/Pro e Pro/Pro.

Considerando a idade significativamente menor dos pacientes do grupo controle em relação aos pacientes com câncer de canal anal, foi analisado e

comparado o polimorfismo do códon 72 entre os controles saudáveis conforme a idade a fim de verificar a influência da faixa etária na ocorrência do polimorfismo. Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição genotípica entre os 78 controles com menos de 50 anos de idade e os 25 controles com mais de 50 anos de idade (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* em controles, conforme a idade.

Controles	Total	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	P
< 50 anos	25	6 (24,0%)	15 (60,0%)	4 (16,0%)	-
> 50 anos	78	25 (32,1%)	47 (60,3%)	6 (7,7%)	0,407

DISCUSSÃO

A infecção por HPV de elevado risco oncogênico tem sido implicada na patogênese de diferentes neoplasias^{28,54-56}. Vários estudos bioquímicos e genéticos demonstraram que as proteínas E6 e E7 do HPV cooperativamente exercem efeito na transformação e na imortalidade celular interferindo na função das proteínas supressoras tumorais celulares⁵⁷⁻⁵⁹. O polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*, caracterizado pela codificação de dois alelos Arg ou Pro, teve seu efeito investigado na suscetibilidade à degradação mediada pela proteína E6 do HPV, sendo constatado que indivíduos homozigotos para Arg são sete vezes mais suscetíveis à carcinogênese do colo uterino associada ao HPV do que os heterozigotos²⁶ e apresentariam aumento de aproximadamente 20% no risco de câncer do colo uterino⁶⁰. Desde então, o efeito do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* no câncer de cérvix tem sido estudado por diferentes autores.

O câncer anal invasivo, como o câncer cervical invasivo, tem precursores bem documentados, conhecidos como NIA de grau 2 ou 3, na histopatologia, ou lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, na citologia⁸. Considerando que o câncer de canal anal tem sua causa associada à infecção por HPV de elevado risco oncogênico, os autores avaliaram, pela primeira vez, o potencial papel do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* como fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer.

Para minimizar vieses e evitar interpretações equivocadas dos resultados, algumas medidas de segurança foram adotadas. Pacientes e controles foram etnicamente equiparados em uma população procedente da mesma região geográfica e todos os resultados da PCR foram confirmados pelo seqüenciamento de DNA. Foram investigadas as freqüências dos alelos e genótipos no códon 72 do gene *TP53* em 32 pacientes com câncer de canal anal e 103 controles do Brasil meridional. Não foram encontradas diferenças significativas na freqüência relativa dos alelos e na distribuição dos genótipos entre pacientes e controles. Estes resultados estão alinhados com vários estudos que falharam em demonstrar uma relação do polimorfismo do códon 72 do *TP53* com o desenvolvimento de tumores malignos não cervicais associados com HPV, como carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e cavidade oral^{61,62}.

A associação entre o polimorfismo no códon 72 e risco de câncer foi relatado em diferentes populações³⁰. Estudos foram conduzidos para avaliar este polimorfismo como fator de risco para diferentes tipos de carcinomas, como gástrico⁶³, pulmonar³⁵ e mama⁴⁹. Até agora, os dados publicados são inconclusivos. Os resultados conflitantes encontrados na literatura podem ser atribuídos a variações nos protocolos entre diferentes laboratórios, ou a seleção inadequada de grupos controle⁶³. Também podem ocorrer devido às características da população analisada, na medida em que há variações consideráveis na distribuição dos genótipos no códon 72 em várias populações. Este polimorfismo parece ser mantido pela seleção natural influenciada por fatores ambientais, como o grau de exposição ao componente UV-B da luz

solar²⁰. O gradiente Arg-Pro Norte-Sul resultante tem sido descrito em diferentes regiões geográficas. Estudos populacionais indicaram que o alelo Arg é mais prevalente em indivíduos com pele clara e menos prevalente em indivíduos com tez mais escura, com evidente e consistente declínio na prevalência do alelo Pro com o aumento da latitude norte^{20,21}.

A população do Brasil meridional, em contraste com populações de outras regiões brasileiras, é composta principalmente por indivíduos caucasianos descendente de imigrantes europeus⁶⁴. Embora a maioria destes imigrantes tenha vindo de Portugal, Alemanha e Itália⁶⁵, a distribuição genotípica encontrada em nossos controles foi notavelmente diferente da distribuição genotípica observada naqueles países^{44,66,67}. Isto pode ser parcialmente explicado pelo processo de miscigenação entre os diversos grupos étnicos ocorrido durante a colonização do Brasil⁶⁸. Cada população específica parece ter distribuição genotípica própria que pode diferir marcadamente das frequências polimórficas encontradas em outras populações, mesmo quando países vizinhos são comparados.

Entretanto, acreditamos que a ausência de associação entre a distribuição do genótipo no códon 72 e o risco de câncer anal observada no presente estudo não pode ser explicada como o resultado das características étnicas de nossa população. Em estudo prévio, também realizado em Porto Alegre, foram estudadas pacientes com câncer de mama e controles sem neoplasia, todas provenientes do sul do Brasil. Foi detectada significativa associação do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* com risco de câncer de

mama⁶⁹. Foram analisadas amostras de sangue coletadas de 118 mulheres com carcinoma primário de mama e de 202 mulheres doadoras de sangue (controles) através de PCR e seqüenciamento de DNA. O genótipo Arg/Arg esteve significativamente associado com aumento no risco de câncer de mama (OR 2,9; IC95% 1,43–3,6; P<0,002) e a freqüência relativa de cada alelo foi de 0,75 para Arg e 0,25 para Pro em pacientes com câncer, e de 0,62 para Arg e 0,38 para Pro em controles (P<0,001). No presente estudo, a freqüência relativa de cada alelo observada no grupo de controles, de 0,61 para Arg e 0,39 para Pro, foi muito similar à observação prévia em controles derivados da mesma população.

Algumas evidências sugerem que as variantes Arg e Pro do polimorfismo outorgam propriedades diversas à proteína p53. O alelo Pro foi considerado menos eficiente na supressão da transformação celular e indução da apoptose^{23,70} e menos sensível à degradação por proteínas virais oncogênicas do que o alelo Arg²⁶. Nesse contexto, seria esperado que a presença do genótipo Arg/Arg favorecesse o desenvolvimento do câncer de canal anal, o qual tem associação documentada com infecção por tipos oncogênicos de HPV.

O presente estudo representa o primeiro trabalho publicado sobre a associação do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* com o carcinoma epidermóide de canal anal. A ausência de associação do polimorfismo com maior risco para câncer de canal anal sugere que existam diferenças moleculares e genéticas entre as duas neoplasias, apesar de haver uma

semelhança entre os carcinomas de colo uterino e anal, uma vez que ambos têm associação com HPV e lesões histopatológicas precursoras.

CONCLUSÃO

Não há diferenças significativas na distribuição dos alelos e na distribuição genotípica do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* entre pacientes com câncer de canal anal invasivo e controles. Os resultados deste estudo não dão suporte à hipótese de que o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* esteja associado com uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer do canal anal.

O papel da predisposição genética à infecção pelo HPV, especialmente pelos subtipos de alto potencial oncogênico, e sua importância na patogênese do câncer anal requer investigação futura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-49.
2. WHOCT. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000.
3. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2005 SEER data submission, posted to the SEER web site 2006.
4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010 Tables & Figures, 2010
<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/most-requested-tables-figures-2010>.
5. Instituto Nacional do Câncer, 2010
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>.
6. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N, Berry JM, Darragh TM. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *Aids* 1998;12:495–503.
7. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997;337:1350–8.

8. Hoots BE, Palefsky JM, Pimentas JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 2009;124:2375–83.
9. Smith JS, Lindsay L, Hoots BE, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621–32.
10. Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM, Schwartz SM, Daling JR. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. *Cancer* 2004 Jul 15;101(2):281-8.
11. Chiao EY, Krown SE, Stier EA, Schrag D. A population-based analysis of temporal trends in the incidence of squamous anal canal cancer in relation to the HIV epidemic. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 1;40(4):451-5.
12. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
13. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990 Nov 30;250(4985):1233-8.
14. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2 – the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002;23:541-547.
15. Kern SE. p53: tumor suppression through control of the cell cycle. *Gastroenterology* 1994 Jun;106(6):1708-11.
16. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.

17. Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer . *Biochimie* 2002;84:83-93.
18. International Agency for Research on Cancer TP53 Mutation Database, 2010 <http://www-p53.iarc.fr>.
19. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987;7:961-3.
20. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994;44:266–70.
21. Sjalander A, Birgander R, Saha A, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphism and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996 Jan-Feb;46(1):41-8.
22. Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Weimer TA. *TP53* polymorphisms and haplotypes in South Ameridians and neo-Brazilians. *Annals of Human Biology* 2001;28:184-194.
23. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999;19:1092-100.
24. Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33:357-365.
25. Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A, et al. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential

- selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* 2001;22:515-7.
26. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393:229–34.
27. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87:528-33.
28. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990 Aug 25;18(16):4961.
29. Zehbe I, Voglino G, Willander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 2001;61:608-11.
30. Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jan;13(1):11-22.
31. Blomeke B, Shields PG. Laboratory methods for the determination of genetic polymorphism in humans. *IARC Sci Publ* 1999;148:133-147.
32. Dokianakis DN, Koumantaki E, Billiri K, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *In J Mol Med* 2000;5:405-9.
33. Yang YC, Chang CL, Chen ML. Effect of p53 polymorphism on the susceptibility of cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2001;51(3):197-201.

34. Pillai MR, Nair MK. Development of a condemned mucosa syndrome and pathogenesis of human papillomavirus-associated upper aerodigestive tract and uterine cervical tumors. *Exp Mol Pathol* 2000;69(3):233-41.
35. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1037-42.
36. Weston A, Perrin LS, Forrester K, Hoover RN, Trump BF, Harris CC, et al. Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1:481-3.
37. Schabath MB, Wu X, Wei Q, Li G, Gu J, Spitz MR. Combined effects of p53 and p73 polymorphism on lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:158-161.
38. Hu Y, McDermott MP, Ahrendt SA. The p53 codon 72 proline allele is associated with p53 gene mutation in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2502-2509.
39. Roh JW, Kim JW, Park NH. P53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:499-505.
40. Sul J, Yu GP, Lu QY. P53 codon 72 polymorphisms: a case-control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Lett* 2006 Jul 18;238(2):210-23.
41. Kuroda Y, Tsukino H, Nakao H, Imai H, Katoh T. p53 codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. *Cancer Lett* 2003;189:77-83.
42. Anderson S, Rylander E, Strand A, Sällström J, Wilander E. The significance of p53 condon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:1153-6.

43. Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, et al. Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis* 1999;20:1733-6.
44. Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, von Knebel Doeberitz M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus associated cervical cancer. *J Mol Med* 1999;77:299–302.
45. Suarez-Rincon AE, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Polymorphism in codon 72 of the p53 gene and cervico-uterine cancer risk in Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 2002;70:344-8.
46. Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:334-9.
47. Peixoto Guimarães D, Lu SH, Snijders P, Wilmotte R, Herrero R, Lenoir G, et al. Absence of association between HPV DNA, TP53 codon 72 polymorphism, and risk of oesophageal cancer in a high-risk area of China. *Cancer Lett* 2001;162:231-5.
48. O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins G, Murphy G, Mabruk M. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J Clin Pathol* 2001;54:539-42.
49. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:389-92.

50. Ferreira da Silva I, Koifman RJ, Quinto Santos Souza C, Ferreira de Almeida Neto O, Koifman S. TP53 genetic polymorphisms and environmental risk factors associated with cervical carcinogenesis in a cohort of Brazilian women with cervical lesions. *J Toxicol Environ Health A*. 2010 Jan;73(13-14):888-900.
51. Drummond SN, De Marco L, Pordeus Ide A, Barbosa AA, Gomez RS. TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:3379-3381.
52. Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PM, de Freitas SE, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150:44-49.
53. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpção LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004;210:151-157.
54. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J Pathol* 1999;189:12-9.
55. Damin AS, Rachid K, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre COP. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:131-7.
56. Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:721-8.
57. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The HPV-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;234:934 -7.

58. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18, E6 protein with p53. *Science* 1990;248:934 –7.
59. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
60. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JS, Park SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;85:301–8.
61. Hoffmann M, Scheunemann D, Fazel A, Görögh T, Kahn T, Gottschlich S. Human papillomavirus and p53 polymorphism in codon 72 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009 Mar;21(3):809-14.
62. Lin YC, Huang HI, Wang LH, Tsai CC, Lung O, Dai CY, et al. Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol* 2008 Aug;44:798-804.
63. Zhang ZW, Laurence NJ, Hollowood A, Newcomb P, Moorghen M, Gupta J, et al. Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:131–5.
64. Censo Demografico 2000. Características da população e domicílio. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2005.
65. Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul. *Braz Am J Hum Biol* 2005;17:496–506.
66. Rezza G, Giuliani M, Garbuglia AR, Serraino D, Cappiello G, Migliore G, et al. Lack of association between p53 Codon-72 polymorphism and squamous

intraepithelial lesions in women with, or at risk for, human immunodeficiency virus and/or human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:565–6.

67. Santos AM, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159:143–7.

68. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian populations. *Am J Hum Biol* 2003;15:824–34.

69. Damin AP, Frazzon AP, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C, et al. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2006;30:523–9.

70. Pim D, Banks L. p53 polymorphism variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004;108:196–9.

ANEXOS

Parecer do comitê de Ética em Pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 06-146

Versão do Projeto: 02/06/2006

Versão do TCLE: 18/08/2006

Pesquisadores:

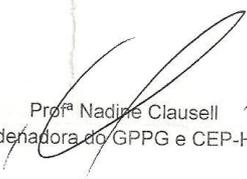
DANIEL DE CARVALHO DAMIN

SIMONE SANTANA CONTU

Título: INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE TP53 NO CÂNCER DE ÂNUS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 18 de agosto de 2006.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ARTIGO PUBLICADO EM INGLÊS

Lack of correlation between *p53* codon 72 polymorphism and anal cancer risk

Simone S Contu, Grasiela Agnes, Andrea P Damin, Paulo C Contu, Mário A Rosito, Claudio O Alexandre, Daniel C Damin

Simone S Contu, Paulo C Contu, Mário A Rosito, Daniel C Damin, Department of Surgery, Division of Coloproctology, Clinicas Hospital of Porto Alegre and Federal University of Rio Grande do Sul, 90.035-930 Porto Alegre, Brazil

Grasiela Agnes, Andrea P Damin, Claudio O Alexandre, Daniel C Damin, Laboratory of Molecular Biology and Department of Pathology, Federal University of Health Science of Porto Alegre, 90.035-930 Porto Alegre, Brazil

Author contributions: Contu SS supervised the collection of research material and patient data and prepared the manuscript; Agnes G performed laboratory analysis of the biological material; Damin AP designed the research and performed laboratory analysis; Contu PC collected the biological material and wrote the manuscript; Rosito MA recruited patients and prepared clinical data; Alexandre CO coordinated the laboratory activities and analyzed the laboratory results; Damin DC designed the research, coordinated collection of clinical data and biological material and wrote the manuscript.

Supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), No. 142678/2007-4, Brazilian Government

Correspondence to: Dr. Daniel C Damin, Division of Coloproctology, Clinicas Hospital of Porto Alegre and Federal University of Rio Grande do Sul, 90.035-930 Porto Alegre, Brazil. damin@terra.com.br

Telephone: +55-51-33598232 Fax: +55-51-33598001

Received: June 5, 2009 Revised: August 27, 2009

Accepted: September 3, 2009

Published online: September 28, 2009

Abstract

AIM: To investigate the potential role of *p53* codon 72 polymorphism as a risk factor for development of anal cancer.

METHODS: Thirty-two patients with invasive anal carcinoma and 103 healthy blood donors were included in the study. *p53* codon 72 polymorphism was analyzed in blood samples through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing.

RESULTS: The relative frequency of each allele was 0.60 for Arg and 0.40 for Pro in patients with anal cancer, and 0.61 for Arg and 0.39 for Pro in normal controls. No significant differences in distribution of the codon 72 genotypes between patients and controls were found.

CONCLUSION: These results do not support a role for the *p53* codon 72 polymorphism in anal carcinogenesis.

© 2009 The WJG Press and Baishideng. All rights reserved.

Peer reviewers: Atsushi Mizoguchi, Assistant Professor, Experimental Pathology, Massachusetts General Hospital, Simches 8234, 185 Cambridge Street, Boston, MA 02114, United States; Fritz von Weizsacker, Professor, Department of Medicine, Schlosspark Klinik, Humboldt University, Berlin 14059, Germany

Key words: Anus neoplasms; Arginine; Genetic polymorphism; Polymerase chain reaction; Proline; Tumor suppressor protein *p53*

Contu SS, Agnes G, Damin AP, Contu PC, Rosito MA, Alexandre CO, Damin DC. Lack of correlation between *p53* codon 72 polymorphism and anal cancer risk. *World J Gastroenterol* 2009; 15(36): 4566-4570 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/4566.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.4566>

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma (SCC) of the anus is a relatively uncommon malignancy, affecting approximately 4600 patients per year in the United States^[1]. Globally, annual incidence rates of invasive anal cancer range from 0.1 to 2.8 cases per 100 000 among men and 0.0-2.2 cases per 100 000 among women^[2]. In particular, anal cancer rates among men who have sex with men are notably higher^[3]. Invasive anal cancer, like invasive cervical cancer, has been causally linked to high-risk human papillomavirus (HPV) infection^[4,5]. According to a recent review, HPV is detected in 71% of invasive anal cancers, with approximately 72% of the HPV-positive cases being associated with HPV 16 and/or 18 infection^[6]. This estimate of HPV 16 and 18 prevalence is similar to that found in invasive cervical cancer^[7].

Although many risk factors for the development of anal cancer have been identified, such as the practice of receptive anal intercourse and immunodeficiency, the molecular mechanisms related to anal carcinogenesis remain unclear. Mutations in the *p53* gene are the most common genetic alterations in human cancer and they can be found in up to 80% of anal carcinomas^[8]. In addition to gene mutations, some polymorphisms in the *p53* gene have been suggested to play a role in different malignancies^[9-11]. Recent studies have focused on a common single-base-pair polymorphism at codon

72, which results in a Pro (CCC) or Arg (CGC) residue at this position. The two polymorphic variants have been shown to have not only structural differences, as reflected by distinct electrophoresis patterns of migration, but also different biological properties^[12-14]. The Arg variant has been demonstrated to be more susceptible to degradation by the HPV E6 protein than the Pro variant, with individuals who are homozygous for Arg having a higher risk of being affected by HPV-associated malignant tumors^[15].

In this article, we present the results of what is believed to be the first study to investigate the potential association of *p53* codon 72 polymorphism with invasive carcinoma of the anal canal.

MATERIALS AND METHODS

Cases and controls

Thirty-two patients with histologically confirmed primary SCC of the anal canal (mean age 60.3 years, range 30-81 years) were enrolled prospectively in the study. As a non-malignant control group, we studied 103 consecutive healthy blood donors with no previous history of cancer (mean age 47.7 years, range 40-72 years). Demographic characteristics of cases and controls are shown in Table 1. After pretreatment assessment, including a complete medical history and physical examination, colonoscopic examination, computed tomography of the abdomen and pelvis, and chest radiography, the patient's AJCC (American Joint Committee on Cancer) tumor stage was determined^[16]. The distribution was as follows: 6.2% stage I ($n = 2$), 53.1% stage II ($n = 17$), 34.3% stage III ($n = 11$) and 6.2% stage IV ($n = 2$).

The study was approved by the Ethics and Scientific Committee of the Santa Casa Hospital Complex and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed consent was obtained from all patients and controls before being enrolled in the study.

DNA extraction and genotyping

p53 codon 72 polymorphism was studied in blood samples collected by venous puncture. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using Ultra Clean DNA Bloodstain Kit (MoBioLabs, Solana Beach, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of codon 72, modified from the technique described by Ara *et al.*^[17], was used to identify *p53* genotypes. The forward primer used was 5'-TTGCCGTCCCAAAGCAATGGATGA-3', and the reverse primer was 5'-TCTGGGAAGGGACA GAAGATGAC-3'. Each PCR reaction mixture (50 μ L) contained 10 pmol each primer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 mmol/L each dNTP, 1 U Platinum[®]Taq DNA polymerase (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil), and 100-300 ng genomic DNA. Reaction mixtures were preincubated for 5 min at 94°C. PCR conditions were 94°C for 1 min and 55°C for 1 min, followed by 72°C for 1 min for 35 cycles. The final extension was at 72°C for 10 min.

Table 1 Demographic characteristics of cancer patients and controls n (%)

Characteristics	Cases	Controls	P
Gender			
Male	7 (22)	22 (21)	NS
Female	25 (78)	81 (79)	
Race			
White	28 (87)	96 (93)	NS
Non-white	4 (13)	7 (7)	
Age (yr); mean (range)	60.3 (30-81)	47.7 (40-72)	< 0.001
Total	32 (100)	103 (100)	

NS: Not significant.

After confirmation of an amplified fragment of the expected size (199 bp) on an agarose gel, 10 μ L PCR product was digested with 6 U restriction enzyme *Bst*UI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) at 60°C for at least 4 h. DNA fragments were electrophoresed through a 2.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. RFLP results were confirmed by sequencing the PCR fragments from nine randomly selected samples (three of each genotype) using an automated sequencing system (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were performed using the BigDye[®] Terminator V3.1 cycle sequencing reaction kit (Applied BioSystems) according to the manufacturer's instructions. Forward and reverse primers were utilized as sequencing primers.

Statistical analysis

Univariate statistics were used first to compare cases and controls for demographic variables and genotype prevalence. The χ^2 test was used to analyze categorical variables and ANOVA was used to compare the continuous variable age. The association between the *p53* polymorphism and anal cancer was determined using the logistic regression method to assess ORs and 95% CI. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Detection of *p53* codon 72 polymorphism by PCR-RFLP was performed in all cases and controls. The Arg allele was cleaved by *Bst*UI, which yielded two small fragments (113 and 86 bp). The Pro allele was not cleaved by *Bst*UI, which had a single 199-bp band. Heterozygotes contained three bands, which corresponded to 199, 113 and 86 bp. The PCR results were confirmed by DNA sequencing.

The distribution of the codon 72 genotypes in patients and controls did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype frequencies in cases and controls are presented in Table 2, with no association with anal cancer risk being observed. The relative frequency of each allele was 0.60 for Arg and 0.40 for Pro in patients with anal cancer, and 0.61 for Arg and 0.39 for Pro in normal controls.

We also analyzed the codon 72 polymorphism of the healthy controls according to their age. The genotype

Table 2 Distribution of p53 codon 72 polymorphism in cancer patients and controls n (%)

	Total	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	OR ¹	CI	P
Anal cancer	32	10 (31.2)	19 (59.4)	3 (9.4)	1.6	0.6-4.9	0.325
Controls	103	31 (30.1)	62 (60.2)	10 (9.7)			

¹Adjusted for age. Arg/Arg vs Arg/Pro and Pro/Pro.

distribution in the 78 controls under 50 years old was as follows: 25 Arg/Arg (32.1%), 6 Pro/Pro (7.7%), and 47 Arg/Pro (60.3%). The distribution in the 25 controls over 50 years old was: 6 Arg/Arg (24.0%), 4 Pro/Pro (16.0%), and 15 Arg/Pro (60.0%). No significant difference in the genotype distribution was found between these two age groups ($P = 0.407$).

DISCUSSION

High-risk HPV infection has been implicated in the pathogenesis of different malignancies^[17-21]. Several biochemical and genetic studies have shown that HPV E6 and E7 proteins exert a cooperative effect on cellular transformation and immortality by interfering with the function of cellular tumor suppressor proteins^[22-24].

A common polymorphism has been known in codon 72 of the p53 gene, with two alleles encoding either Arg (p53Arg) or Pro (p53Pro)^[13,14]. Storey *et al.*^[15] have investigated the effect of this polymorphism on the susceptibility to E6-mediated degradation and found that individuals homozygous for Arg are seven times more susceptible to HPV-associated cervical carcinogenesis than heterozygotes are. Since then, the effect of codon-72 polymorphism of p53 on cervical cancer has been studied, with contradictory results being reported. Overall, as demonstrated in a recent meta-analysis, compared with the heterozygous genotype (Pro/Arg), the homozygous genotype (Arg/Arg) of codon-72 of p53 is associated with an approximately 20% increased risk of cervical cancer^[25].

Invasive anal cancer, like invasive cervical cancer, has well-documented precursors, known as anal intraepithelial neoplasia 2-3 (histology) or high-grade squamous intraepithelial lesions (cytology)^[6]. Anal cancer also has been causally linked to high-risk HPV infection, therefore, we decided to evaluate, perhaps for the first time, the potential role of codon 72 polymorphism as a risk factor for development of this type cancer.

In order to minimize sources of bias and avoid misinterpretation of the results, standard safeguards were adopted. Patients and controls were matched ethnically and derived from a population living in the same geographic region (Southern Brazil), and were enrolled consecutively in a single institution. All PCR results were confirmed by DNA sequencing.

We investigated the allele and genotype frequencies at p53 codon 72 in 32 patients with anal cancer and 103 healthy individuals from southern Brazil. No significant differences in the relative allele frequency and in the distribution of genotypes were found between patients

and controls. These results are in line with several studies that failed to demonstrate a correlation of the p53 codon 72 polymorphism with development of non-cervical HPV-associated epithelial malignant tumors, such as head and neck and oral SCCs^[26,27].

The association between codon 72 polymorphism and risk of cancer has been reported in different populations^[28]. Studies have been conducted to evaluate this polymorphism as a risk factor for different types of cancer, such as gastric^[29], lung^[9] and breast carcinomas^[11]. So far, the published data have been inconclusive. The conflicting results found in the literature might be attributed to variations in protocols among different laboratories, or to poor selection of control groups^[29]. They also might have been caused by the inherent characteristics of the population being analyzed, as there are considerable variations in the distribution of the codon 72 genotypes in various populations. This polymorphism seems to be maintained by natural selection influenced by environmental factors, such as the degree of exposure to the UV-B component of sunlight^[30]. The resulting North-South Arg/Pro gradient has been reported in different geographical regions. Population-based studies have indicated that the Arg allele is most prevalent in individuals with light complexion and least prevalent in those with darker complexion, with a clear and consistent decline in the prevalence of the Pro allele, with increasing northern latitude^[30-32].

The population from Southern Brazil, in contrast with other regions of the country, is composed mainly of Caucasian individuals who are descended from European immigrants^[33]. Although most of these immigrants came from Portugal, Germany and Italy^[34], the genotype distribution found in our healthy controls was notably different from the genotype distribution observed in those countries^[35-37]. This can be explained partially by the process of miscegenation among different ethnic groups (Caucasians, Amerindians and Afro-Brazilians) that took place during Brazilian colonization^[38]. Each specific population seems to have its own characteristic genotype distribution that can differ markedly from the polymorphic frequencies found in other populations, even when neighboring countries are compared.

We believe, however, that the lack of correlation between the codon 72 genotype distribution and anal cancer risk observed in our study cannot be interpreted solely as a result of population ethnicity. In a previous study of cancer patients and normal individuals from Southern Brazil, we were able to detect a significant

association of p53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk^[39]. We analyzed blood samples collected from 118 women with primary breast carcinoma and from 202 female blood donors (healthy controls) through PCR-RFLP and DNA sequencing. The Arg/Arg genotype was significantly associated with an increased risk for breast cancer (OR 2.9; 95% CI: 1.43-3.6; $P < 0.002$). The relative frequency of each allele was 0.75 for Arg and 0.25 for Pro in patients with cancer, and 0.62 for Arg and 0.38 for Pro in normal controls ($P < 0.001$). In the present study, the relative frequency of each allele observed within the control group (0.61 for Arg and 0.39 for Pro) was therefore very similar to our previous observation in normal controls derived from the same population.

In summary, we did not detect significant differences in the allele distribution at codon 72 of p53 between patients with invasive anal cancer and healthy controls. Our results do not support the hypothesis that p53 codon 72 polymorphism is associated with anal cancer susceptibility. The role of the genetic susceptibility to high-risk HPV infection and anal cancer, however, merits further investigation.

COMMENTS

Background

A common Arg/Pro polymorphism at codon 72 of the p53 gene has been studied as a risk factor for human papilloma virus (HPV)-associated malignancies. Although anal cancer has been associated repeatedly with high-risk HPV infection, this polymorphism has not been investigated in this type of cancer up until now.

Research frontiers

Although several risk factors for the development of anal cancer have been determined, the molecular mechanisms involved in anal carcinogenesis remain unclear. In this context, the identification of new factors involved in progression of the anal carcinoma represents a critical step towards development of new anticancer strategies in this malignancy.

Innovations and breakthroughs

This is believed to be the first study to investigate p53 codon 72 polymorphism in patients with anal cancer. The authors did not detect differences in the allele distribution at codon 72 of p53 between patients with invasive anal cancer and healthy controls. In contrast to previous observations with cervical cancer, this polymorphism does not seem to be associated with anal cancer susceptibility. The results, however, are in line with several studies that failed to demonstrate a correlation of the p53 codon 72 polymorphism with development of non-cervical HPV-associated epithelial malignant tumors, such as head and neck and oral squamous cell carcinomas.

Applications

In the process of identifying genetic causes of cancer, it is important to determine precisely which elements of a biological pathway are responsible for affecting tumor suppression or development. Then, treatments and preventive measures can be directed to those individuals who would benefit most. Previous studies have identified p53 codon 72 polymorphism as a potential contributing factor in HPV-associated carcinogenesis. This study found that p53 codon 72 polymorphism is not a likely risk factor for anal cancer, and future research should focus on other parts of the p53 gene pathway to understand its role in development of this type of cancer.

Terminology

Mutations in the p53 gene are the most common genetic alterations in human cancer. In addition to gene mutations, some polymorphisms in the p53 gene have been suggested to play a role in different malignancies. A polymorphism is known in codon 72 of the p53 gene, which results in a Pro or Arg residue at this position. These two polymorphic variants have been shown to have different biological properties, including differences in cancer susceptibility.

Peer review

Contu *et al* Have described the lack of a functional role of a specific p53 polymorphism in the pathogenesis of anal cancer. The major point of this paper and the spectrum of methods used are rather confined, but the point is clear and the paper is well written. Although this paper presents negative data, I feel that the attempt to perform genetic analysis on a relatively uncommon malignancy (anal cancer) may be viewed favorably clinically.

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; **57**: 43-66
- WHOCT. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000: 144-155
- Daling JR, Weiss NS, Hislop TG, Maden C, Coates RJ, Sherman KJ, Ashley RL, Beagrie M, Ryan JA, Corey L. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med* 1987; **317**: 973-977
- Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N, Berry JM, Darragh TM. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS* 1998; **12**: 495-503
- Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, Goldman S, Svensson C, Adami HO, Melbye M. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997; **337**: 1350-1358
- Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 2009; **124**: 2375-2383
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; **121**: 621-632
- Behrendt GC, Hansmann ML. Carcinomas of the anal canal and anal margin differ in their expression of cadherin, cytokeratins and p53. *Virchows Arch* 2001; **439**: 782-786
- Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 1037-1042
- Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 2002; **179**: 175-183
- Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; **3**: 389-392
- Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 4650-4656
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; **33**: 357-365
- Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004; **108**: 196-199
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; **393**: 229-234
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002: 125-130
- Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 4961
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; **189**: 12-19

- 19 **Damin AP**, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004; **84**: 131-137
- 20 **Syrjänen KJ**. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002; **55**: 721-728
- 21 **Damin DC**, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007; **33**: 569-574
- 22 **Dyson N**, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **243**: 934-937
- 23 **Werness BA**, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; **248**: 76-79
- 24 **zur Hausen H**. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 342-350
- 25 **Jee SH**, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; **85**: 301-308
- 26 **Hoffmann M**, Scheunemann D, Fazel A, Görög T, Kahn T, Gottschlich S. Human papillomavirus and p53 polymorphism in codon 72 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009; **21**: 809-814
- 27 **Lin YC**, Huang HL, Wang LH, Tsai CC, Lung O, Dai CY, Yu ML, Ho CK, Chen CH. Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol* 2008; **44**: 798-804
- 28 **Koushik A**, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**: 11-22
- 29 **Zhang ZW**, Laurence NJ, Hollowood A, Newcomb P, Moorghen M, Gupta J, Feakins R, Farthing MJ, Alderson D, Holly J. Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 131-135
- 30 **Beckman G**, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; **44**: 266-270
- 31 **Sjalander A**, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996; **46**: 41-48
- 32 **Sjalander A**, Birgander R, Kivelä A, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum Hered* 1995; **45**: 144-149
- 33 **Alves-Silva J**, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 444-461
- 34 **Marrero AR**, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA, Bortolini MC. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 2005; **17**: 496-506
- 35 **Klaes R**, Ridder R, Schaefer U, Benner A, von Knebel Doeberitz M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. *J Mol Med* 1999; **77**: 299-302
- 36 **Rezza G**, Giuliani M, Garbuglia AR, Serraino D, Cappiello G, Migliore G, Branca M, Benedetto A, Ippolito G. Lack of association between p53 codon-72 polymorphism and squamous intraepithelial lesions in women with, or at risk for, human immunodeficiency virus and/or human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; **10**: 565-566
- 37 **Santos AM**, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, Matos A, Lopes C, Medeiros R. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **159**: 143-147
- 38 **Callegari-Jacques SM**, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SC, Ferreira ME, Hutz MH. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 2003; **15**: 824-834
- 39 **Damin AP**, Frazzon AP, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C, Alexandre CO. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2006; **30**: 523-529

S- Editor Tian L L- Editor Kerr C E- Editor Zheng XM

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Ausência de correlação entre o polimorfismo do p53 códon 72 e risco de câncer anal

Simone Santana Contu_a, Paulo de Carvalho Contu_{ab}, Andreia Pires Souto Damin_c e Daniel Carvalho Damin_{ab}

_aPrograma de Pós-Graduação em Cirurgia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, CEP 90.035-930 Brasil.

_bServiço de Coloproctologia, Departamento de Cirurgia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Ramiro Barcelos, 2350 – sl 600, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, CEP 90.035-930 Brasil.

_cLaboratório de Biologia Molecular e Departamento de Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil. Rua Sarmiento Leite 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brasil.

Resumo

Objetivo: investigar o potencial papel do polimorfismo do p53 códon 72 como fator de risco para o desenvolvimento do câncer anal. Materiais e métodos: trinta e dois pacientes com carcinoma anal invasivo e 103 doadores de sangue

saudáveis foram incluídos no estudo. O polimorfismo do p53 códon 72 foi analisado em amostras de sangue através da reação em cadeia da polimerase e seqüenciamento de DNA. Resultados: a freqüência relativa de cada alelo foi 0,60 para Arg e 0,40 para Pro em pacientes com câncer anal, e 0,61 para Arg e 0,39 para Pro em controles normais. Não foram encontradas diferenças na distribuição dos genótipos no códon 72 entre pacientes e controles. Conclusões: estes resultados não dão suporte a um papel relevante do polimorfismo do p53 códon 72 na carcinogênese anal.

Palavras chave: p53, Polimorfismo, Códon 72, Câncer anal, Arginina/prolina, Reação em cadeia da polimerase.

Introdução

O carcinoma epidermóide do ânus é uma neoplasia maligna relativamente incomum, afetando aproximadamente 4.600 pacientes por ano nos Estados Unidos ^[1]. Globalmente, as taxas de incidência anuais de câncer anal invasivo variam entre 0,1 a 2,8 casos por 100.000 habitantes entre homens e zero a 2,2 por 100.000 habitantes entre as mulheres ^[2]. Particularmente, as taxas de câncer anal entre homens que praticam sexo com outros homens são notavelmente maiores ^[3].

O câncer anal invasivo, como o câncer cervical invasivo, tem sua etiologia atribuída às infecções por papilomavirus humano (HPV) de alto risco ^[4,5]. De acordo com recente revisão, o HPV foi detectado em 71% dos cânceres anais invasivos, com aproximadamente 72% de casos Positivo

associados com infecções por HPV 16 ou 18^[6]. Estas estimativas de prevalência do HPV 16 e 18 são similares àquelas encontradas em casos de câncer cervical invasivo^[7].

Embora muitos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer anal foram identificados, como a prática de intercurso anal receptivo e imunodeficiência, os mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese anal permanecem obscuros. Mutações no gene p53 são as alterações genéticas mais comuns em câncer humano e podem ser encontradas em até 80% dos carcinomas anais^[8]. Além das mutações genéticas, tem-se sugerido que alguns polimorfismos do gene p53 estejam implicados em diferentes neoplasias^[9-11]. Recentemente, os estudos concentraram-se em um polimorfismo no códon 72, resultando em uma prolina (Pro) residual (CCC) ou uma arginina (Arg) residual (CGC) nesta posição. As duas variantes polimórficas têm demonstrado diferenças estruturais, refletidas pelos padrões distintos de migração na eletroforese, e diferentes propriedades^[12-14]. A variante Arg demonstrou ser mais suscetível à degradação pela proteína HPV E6 do que a variante Pro, com indivíduos homocigotos para Arg apresentando maior risco acometimento por tumores malignos associados ao HPV^[15]. Neste artigo, nós apresentamos os resultados do primeiro estudo investigativo da associação potencial do polimorfismo do p53 códon 72 com carcinoma invasivo do canal anal.

Materiais e métodos

Casos e controles.

Trinta e dois pacientes com carcinoma epidermóide primário do canal anal histologicamente confirmado (média de idade de 60,3 anos, variação entre 30 e 81) foram inscritos no estudo. Como grupo controle não maligno, estudamos 103 doadores de sangue saudáveis sem história prévia de câncer (média de idade de 47,7 anos, variação entre 40 e 72). Características demográficas dos casos e controles estão apresentadas na Tabela 1. Após avaliação pré-tratamento, incluindo história médica completa e exame físico, colonoscopia, tomografia computadorizada de abdômen e pelve e radiografia de tórax, o estágio tumoral AJCC do paciente foi determinado ^[16]. A distribuição foi a seguinte: 6,2% estágio I (n = 2), 53,1% estágio II (n = 17), 34,3% estágio III (n = 11) e 6,2% estágio IV (n = 2).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes e controles antes de sua inscrição no estudo.

Extração de DNA e genotipagem

O polimorfismo do p53 códon 72 foi estudado em amostras de sangue coletadas por punção venosa. O DNA genômico foi extraído dos linfócitos periféricos utilizando Ultra Clean DNA Bloodspin Kit (MoBiolabs, Solana Beach,

CA), de acordo com as instruções do fabricante. A análise do códon 72 por PCR-RFLP, modificada da técnica descrita por Ara e colaboradores ^[17], foi usada para identificar os genótipos do p53. O primer dianteiro utilizado foi 5'-TTGCCGTCCCAAAGCAATGGATGA- 3' enquanto que o primer reverso utilizado foi 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'. Cada reação PCR (50 ml) continha 10 pmol de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de trifosfato desoxinucleotídeo, 1 unidade de Platinum[®]Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e 100–300 ng de DNA genômico. A mistura foi pré-incubada por 5 min a 94° C. Os parâmetros da PCR foram 94° C por 1 min e 55° C por 1 min, seguidos de 72° C por 1 min por 35 ciclos. A extensão final foi a 72° C por 10 min. Após a confirmação de um fragmento amplificado do tamanho esperado (199 pares de bases) em gel de agarose, 10 µl do produto da PCR foi digerido com seis unidades da enzima de restrição BstUI (New England Biolabs, ME) a 60° C por pelo menos 4 h. os fragmentos de DNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e marcados com brometo de etídio. Os resultados da RFLP foram confirmados pelo seqüenciamento dos fragmentos da PCR de nove amostras selecionadas randomicamente (três de cada genótipo) utilizando um sistema de seqüenciamento automático (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied BioSystems, Foster City, CA). Reações seqüenciais foram realizadas com o kit de reação em seqüenciamento de ciclo BigDye[®] Terminator V3.1 (Applied BioSystems) conforme as instruções do fabricante. Os primers dianteiro e reverso foram utilizados como primers seqüenciais.

Análise estatística

Análise univariada foi utilizada primeiro para comparar casos e controles para variáveis demográficas e prevalência do genótipo. O teste do χ^2 foi usado para analisar variáveis categóricas e ANOVA foi usada para comparar a variável contínua idade. A associação entre polimorfismo do p53 e câncer anal foi determinada pelo método de regressão logística para determinar a razão de chances (ORs) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

A detecção do polimorfismo do p53 códon 72 por PCR-RFLP foi possível em todos os casos e controles. O alelo Arg foi partido pelo BstUI, resultando em dois pequenos fragmentos (113 e 86 pares de bases). O alelo Pro não foi clivado pelo BstUI, permanecendo com uma única banda de 199 pares de bases. Os heterozigotos continham três bandas, correspondendo a 199, 113 e 86 pares de bases. Os resultados do PCR foram confirmados por seqüenciamento de DNA.

A distribuição dos genótipos do códon 72 em pacientes e controles não se afastou do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As freqüências genóticas em casos e controles estão apresentadas na Tabela 2, sem associação com risco de câncer anal observada. A freqüência relativa de cada alelo foi 0,60 para Arg

e 0,40 para Pro em pacientes com câncer anal, e 0,61 para Arg e 0,39 para Pro em controles normais.

Nós também analisamos o polimorfismo do códon 72 de controles saudáveis conforme a idade. A distribuição genotípica nos 78 controles com menos de 50 anos de idade foi o seguinte: 25 Arg/Arg (32,1%), 6 Pro/Pro (7,7%), e 47 Arg/Pro (60,3%). A distribuição nos 25 controles com mais de 50 anos de idade foi: 6 Arg/Arg (24,0%), 4 Pro/Pro (16,0%), e 15 Arg/Pro (60,0%). Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição genotípica entre estes dois grupos ($P = 0,407$).

Discussão

Infecção por HPV de alto risco tem sido implicada na patogênese de diferentes neoplasias ^[17-20]. Vários estudos bioquímicos e genéticos demonstraram que as proteínas E6 e E7 do HPV cooperativamente exercem um efeito na transformação celular e imortalidade interferindo na função das proteínas supressoras tumorais celulares ^[22-24].

Um polimorfismo comum foi reconhecido no códon 72 do gene p53, com dois alelos codificando arginina (p53Arg) ou prolina (p53Pro) ^[13,14]. Corey e colaboradores ^[15] investigaram o efeito deste polimorfismo na suscetibilidade à degradação mediada pela proteína E6 e constatou que indivíduos homocigotos para Arg são sete vezes mais suscetíveis à carcinogênese cervical associada ao HPV do que os heterocigotos. Desde então, o efeito do polimorfismo do

códon 72 do p53 no câncer de cérvix tem sido estudado por diferentes autores, com resultados contraditórios relatados. Além disso, como demonstrado em recente metanálise, comparado com o genótipo heterozigoto (Pro/Arg), o genótipo homozigoto (Arg/Arg) do códon 72 do p53 está associado com um aumento de aproximadamente 20% no risco de câncer de cérvix ^[25].

O câncer anal invasivo, como o câncer cervical invasivo, tem precursores bem documentados, conhecidos como neoplasia intraepitelial anal (NIA) 2–3 (histologia) ou lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) (citologia) ^[6]. Tendo em vista que o câncer anal tem sua causa associada a infecção por HPV de alto risco, nós decidimos avaliar, pela primeira vez, o potencial papel do polimorfismos do códon 72 como um fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer.

Para minimizar vieses e evitar interpretações equivocadas dos resultados, medidas de segurança foram adotadas. Pacientes e controles foram etnicamente equiparados e de uma população procedente da mesma região geográfica (Brasil meridional), sendo consecutivamente inscritos em uma única instituição. Todos os resultados da PCR foram confirmados pelo seqüenciamento de DNA.

Nós investigamos as freqüências dos alelos e genótipos do códon 72 do p53 em 32 pacientes com câncer anal e 103 indivíduos saudáveis do Brasil meridional. Não foram encontradas diferenças significativas na freqüência relativa dos alelos e na distribuição dos genótipos entre pacientes e controles.

Estes resultados estão alinhados com vários estudos que falharam em demonstrar uma correlação do polimorfismo do códon 72 do p 53 com desenvolvimento de tumores malignos não cervicais associados com HPV, como carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e cavidade oral [26,27].

A associação entre o polimorfismo do códon 72 e risco de câncer foi relatado em diferentes populações [28]. Estudos foram conduzidos para avaliar este polimorfismo como um fator de risco para diferentes tipos de carcinomas, como gástrico [29], pulmonar [9] e mama [11]. Até agora, os dados publicados são inconclusivos. Os resultados conflitantes encontrados na literatura podem ser atribuídos a variações nos protocolos entre diferentes laboratórios, ou a seleção inadequada de grupos controle [29]. Também podem ocorrer devido às características da população analisada, na medida em que há variações consideráveis na distribuição dos genótipos no códon 72 em várias populações. Este polimorfismo parece ser mantido pela seleção natural influenciada por fatores ambientais, como o grau de exposição ao componente UV-B da luz solar [30]. O gradiente Arg-Pro Norte-Sul resultante tem sido descrito em diferentes regiões geográficas. Estudos populacionais indicaram que o alelo Arg é mais prevalente em indivíduos com pele clara e menos prevalente em indivíduos com tez mais escura, com um claro e consistente declínio na prevalência do alelo Pro com o aumento da latitude norte [30-32].

A população do Brasil meridional, em contraste com populações de outras regiões do Brasil, é composta principalmente por indivíduos caucasianos descendente de imigrantes europeus [33]. Embora a maioria destes imigrantes

tenha vindo de Portugal, Alemanha e Itália ^[34], a distribuição genotípica encontrada em nossos controles saudáveis foi notavelmente diferente da distribuição genotípica observada naqueles países ^[35-37]. Isto pode ser parcialmente explicado pelo processo de miscigenação entre diferentes grupos étnicos (caucasianos, indígenas e afro-brasileiros) ocorrida durante a colonização do Brasil ^[38]. Cada população específica parece ter sua própria distribuição genotípica que pode diferir marcadamente das frequências polimórficas encontradas em outras populações, mesmo quando países vizinhos são comparados.

Nós acreditamos, entretanto, que a ausência de correlação entre a distribuição do genótipo no códon 72 e o risco de câncer anal observado em nosso estudo não pode ser interpretado somente como um resultado de etnia populacional. Em um estudo prévio, também analisando pacientes com câncer e indivíduos normais do sul do Brasil, nós detectamos uma significativa associação do polimorfismo no códon 72 do gene p53 com risco de câncer de mama ^[39]. Nós analisamos amostras de sangue coletadas de 118 mulheres com carcinoma primário de mama e de 202 mulheres doadoras de sangue (controles saudáveis) através da reação em cadeia da polimerase e seqüenciamento de DNA. O genótipo Arg/Arg foi significativamente associado com um aumento no risco de câncer de mama (OR 2,9; IC95% 1,43–3,6; $P < 0,002$). A frequência relativa de cada alelo foi 0,75 para Arg e 0,25 para Pro em pacientes com câncer, e 0,62 para Arg e 0,38 para Pro em controles normais ($P < 0,001$). No presente estudo, a frequência relativa de cada alelo observada

no grupo (0,61 para Arg e 0,39 para Pro) foi similar à nossa observação prévia em controles normais derivados da mesma população.

Em resumo, nós não detectamos diferenças significativas na distribuição dos alelos no códon 72 do p53 entre pacientes com câncer anal invasivo e controles saudáveis. Nossos resultados não dão suporte à hipótese de que o polimorfismo no códon 72 do p53 está associado com suscetibilidade ao câncer anal. O papel da suscetibilidade genética a infecção por HPV de alto risco e câncer anal, entretanto, merece maiores investigações.

Agradecimentos

Este trabalho foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências

1. **Jemal A**, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J and Thun MJ: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57: 43–66, 2007 [PMID: 17237035 DOI: 10.3322/canjclin.57.1.43].
2. WHOCT. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000.
3. **Daling JR**, Weiss NS, Hislop TG, Maden C, Coates RJ, Sherman KJ, Ashley RL, Beagrie M, Ryan JA and Corey L. Sexual practices, sexually

transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med* 317: 973–977, 1987 [PMID: 2821396].

4. **Palefsky JM**, Holly EA, Ralston ML, Jay N, Berry JM and Darragh TM: High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *Aids* 12: 495–503, 1998 [PMID: 9543448 DOI: 10.1097/00002030-199805000-00011].
5. **Frisch M**, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, Goldman S, Svensson C, Adami HO and Melbye M: Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 337:1350–1358, 1997 [PMID: 9358129 DOI: 10.1056/NEJM199711063371904].
6. **Hoots BE**, Palefsky JM, Pimentas JM and Smith JS: Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 124: 2375–2383, 2009 [PMID: 19189402 DOI: 10.1002/ijc.24215].
7. **Smith JS**, Lindsay L, Hoots BE, Keys J, Franceschi S, Winer R and Clifford GM: Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121:621–632, 2007 [PMID: 17405118 DOI: 10.1002/ijc.22527].
8. **Behrendt GC** and Hansmann ML: Carcinomas of the anal canal and anal margin differ in their expression of cadherin, cytokeratins and p53. *Virchows Arch* 439:782-786, 2001 [PMID: 11787851].
9. **Fan R**, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK and Christiani DC: The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1037–1042, 2000 [PMID: 11045785].

- 10. Soultzis N**, Sourvinos G, Dokianakis DN and Spandidos DA: p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 179: 175–183, 2002 [PMID: 11888672 DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00867-9].
- 11. Papadakis EN**, Dokianakis DN and Spandidos DA: P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 3: 389–392, 2000 [PMID: 11032762 DOI: 10.1006/mcbr.2000.0241].
- 12. Harris N**, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N and Rotter V: Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 6: 4650–4656, 1986 [PMID: 3025664].
- 13. Dumont P**, Leu JI, Della Pietra III AC, George DL and Murphy M: The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33: 357–365, 2003 [PMID: 12567188 DOI: 10.1038/ng1093].
- 14. Pim D** and Banks L: p53 polymorphism variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108: 196–199, 2004 [PMID: 14639602 DOI: 10.1002/ijc.11548].
- 15. Storey A**, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G and Banks L: Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; **393**: 229–234 [PMID: 9607760 DOI: 10.1038/30400].
- 16. Greene FL**, Page DL, Fleming ID, Morrow M. *AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual*. 6th ed., Springer-Verlag, New York, 2002.

- 17. Ara S**, Lee PS, Hansen MF and Sya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 4691 [PMID: 1975675 DOI: 10.1093/nar/18.16.4961].
- 18. Walboomers JM**, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Muñoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J Pathol* 1999; **189**: 12–19 [PMID: 10451482 DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1%3C12::AID-PATH431%3E3.0.CO;2-F].
- 19. Damin AS**, Rachid K, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre COP: Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004; **84**: 131–137 [PMID: 14999143 DOI: 10.1023/B:BREA.0000018411.89667.0d].
- 20. Syrjanen KJ**: HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002 **55**: 721–728 [PMID: 12354793 DOI: 10.1136/jcp.55.10.721].
- 21. Damin DC**, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD and Alexandre CO: Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007; **33**: 569-574 [PMID: 17321098 DOI: 10.1016/j.ejso.2007.01.014].
- 22. Dyson N**, Howley PM, Munger K and Harlow E: The HPV-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **234**: 934 – 937 [PMID: 2537532 DOI: 10.1126/science.2537532].
- 23. Werness BA**, Levine AJ and Howley PM: Association of human papillomavirus type 16 and 18, E6 protein with p53. *Science* 1990; **248**: 934 –937 [PMID: 2157286 DOI: 10.1126/science.2157286].

- 24. zur Hausen H:** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 342-350 [PMID: 12044010 DOI: 10.1038/nrc798].
- 25. Jee SH,** Won SY, Yun JE, Lee, JS and Park SS: Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; **85**: 301–308 [PMID: 15145278 DOI: 10.1016/j.ijgo.2003.08.017].
- 26. Hoffmann M,** Scheunemann D, Fazel A, Görögh T, Kahn T, Gottschlich S: Human papillomavirus and p53 polymorphism in codon 72 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009; **21**: 809-814 [PMID: 19212643].
- 27. Lin YC,** Huang HI, Wang LH, Tsai CC, Lung O, Dai CY, Yu ML, Ho CK and Chen CH: Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol* 2008; **44**: 798-804 [PMID: 18234542 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2007.10.006].
- 28. Koushik A,** Platt RW and Franco EL: p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**:11–22 [PMID: 14744727 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-083-3].
- 29. Zhang ZW,** Laurence NJ, Hollowood A, Newcomb P, Moorghen M, Gupta J, Feakins R, Farthing MJ, Alderson D, Holly J: Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 131–135 [PMID: 14734461 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0853-3].
- 30. Beckman G,** Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A and Beckman L: Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; **44**: 266–270 [PMID: 7927355 DOI: [http: 10.1159/000154228](http://10.1159/000154228)].

- 31. Sjalander A**, Birgander R, Saha A, Beckman L and Beckman G: p53 polymorphism and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996; **46**: 41–48 [PMID: 8825462 DOI: 10.1159/000154324].
- 32. Sjalander A**, Birgander R, Kivela A and Beckman G: p53 polymorphism and haplotypes in different ethnic groups. *Hum Hered* 1995; **45**: 114–119 [PMID: 7615299].
- 33. Censo Demografico 2000**: Características da população e domicílio. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2005.
- 34. Marrero AR**, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA and Bortolini MC: Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul. *Braz Am J Hum Biol* 2005; **17**:496–506 [PMID: 15981186 DOI: 10.1002/ajhb.20404].
- 35. Klaes R**, Ridder R, Schaefer U, Benner A and von Knebel Doeberitz M: No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus associated cervical cancer. *J Mol Med* 1999; **77**: 299–302 [PMID: 10023783 DOI: [http: 10.1007/s001090050353](http://10.1007/s001090050353)].
- 36. Rezza G**, Giuliani M, Garbuglia AR, Serraino D, Cappiello G, Migliore G, Branca M, Benedetto A, Ippolito G: Lack of association between p53 Codon-72 polymorphism and squamous intraepithelial lesions in women with, or at risk for, human immunodeficiency virus and/or human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2001; **Prev 10**: 565–566 [PMID: 11352871].

- 37. Santos AM**, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, Matos A, Lopes C and Medeiros R: TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **159**: 143–147 [PMID: 15899386 DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2004.10.005].
- 38. Callegari-Jacques SM**, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG and Ferreira ME: Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian populations. *Am J Hum Biol* 2003; **15**: 824–834 [PMID: 14595874 DOI: 10.1002/ajhb.10217].
- 39. Damin AP**, Frazzon AP, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C and Alexandre CO: Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2006; **30**: 523–529 [PMID: 17113725 DOI: 10.1016/j.cdp.2006.09.007].

Tabelas

Tabela 1. Características demográficas de pacientes com câncer e controles

Características	Casos (n%)	Controles (n%)	P
Sexo			
Masculino	7 (22%)	22 (21%)	NS*
Feminino	25 (78%)	81 (79%)	
Raça			
Branca	28 (87%)	96 (93%)	NS*
Não branca	4 (13%)	7 (7%)	
Idade			
média	60,3 (30-81)	47,7 (40-72)	< 0,001
Total	32 (100%)	103 (100%)	-

*Não significativo

Tabela 2. Distribuição do polimorfismo no códon do TP53 em pacientes com câncer e controles

	Total	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	OR*	IC	P
Câncer	32	10 (31,2%)	19 (59,4%)	3 (9,4%)	1,6	0,6- 4,9	0,325
Controles	103	31 (30,1%)	62 (60,2%)	10 (9,7%)	-	-	-

*Razão de chances (ajustado por idade). Arg/Arg vs. Arg/Pro e Pro/Pro.