

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEPATOLOGIA**

Andréa Gomes Coelho Izaguirre

**Análise do Envolvimento do
polimorfismo T309G no gene MDM2
no Carcinoma Hepatocelular.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2013**

Andréa Gomes Coelho Izaguirre

Análise do Envolvimento do polimorfismo T309G no gene MDM2 no Carcinoma Hepatocelular.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Hepatologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr. Paulo Roberto Ott Fontes

Co-orientador: Dr. Néelson Kretzmann Filho

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Paulo Roberto Ott Fontes pela orientação e oportunidade de aprendizado e pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador, Dr. Néelson Kretzmann Filho por toda atenção, pelo incentivo e pelas críticas e sugestões que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade e incentivo, em especial pela colega Vanessa Baldissera que sempre esteve presente; agradeço toda ajuda e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis quando o nascimento da minha filha.

A secretária da pós-graduação Luciane Spencer por todo auxílio e amizade.

Ao Dr. Tadeu Czerki e ao Dr. Antonio Atalibio Hartmann pelo apoio na obtenção das amostras.

A responsável pelo laboratório de biologia molecular da UFCSPA, Graziela, pelo auxílio prestado na parte técnica.

Em especial, ao meu marido, pelo incentivo, pela compreensão durante minha ausência, pela dedicação, por toda ajuda e por todo amor.

A minha amada filha Isabella, que chegou durante o decorrer deste curso, trazendo amor, luz e felicidade para minha vida.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou a estudar.

E agradeço a Deus por tudo e por mais essa conquista

RESUMO

INTRODUÇÃO O Carcinoma Hepatocelular é a quinta neoplasia mais comum no mundo. A presença do polimorfismo T309G no gene MDM2 (rs2279744) pode ser um fator de risco para o desenvolvimento desse carcinoma. Esse gene é um regulador negativo da proteína p53 e o polimorfismo T309G no gene MDM2 pode bloquear ou diminuir a atividade da p53 podendo aumentar a ocorrência de Carcinoma Hepatocelular. **OBJETIVO:** Avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular de diferentes etiologias, no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. **METODOLOGIA:** Foram analisados 67 pacientes com diagnóstico de Carcinoma Hepatocelular (CHC), no período de 2000 a 2009. O polimorfismo no gene MDM2 foi determinado pela técnica de PCR *Real Time* alelo-específico por meio do ensaio *TaqMan*. **RESULTADOS:** Quanto ao gênero 56 (83,6%) eram do gênero masculino e 11 (16,4%) do gênero feminino; a média de idade era de 60,6 anos ($\pm 8,8$), com idade mínima de 37 e máxima de 85 anos. Quanto à etiologia do Carcinoma Hepatocelular, observou-se que 31 casos (46,3%) estavam relacionados com a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), seguidos pelos casos de infecção pelo vírus da hepatite C + álcool, num total de 24 casos (35,8%), bem como pelo consumo de álcool, evidenciado em 4 casos (6%), e pela presença do vírus da hepatite B (VHB), ocorrente em 4 casos (6%). Outros fatores (VHB+VHC, cirrose +álcool) foram detectados em 4 casos (6%). O transplante hepático foi realizado em 48 casos (71,6%) e a hepatectomia em 19 (28,4%). As frequências dos genótipos foram de 40,3% para TT, 28,4% para TG, e 31,3% para GG. A frequência alélica foi de 54,5% para o alelo T e de 45,5% para o alelo G. **CONCLUSÃO:** A análise do polimorfismo T309G no gene MDM2 em pacientes com CHC não apresentou diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas, não sendo viável determinar nesta série se existe envolvimento do polimorfismo com o Carcinoma Hepatocelular.

Palavras- chave: Carcinoma Hepatocelular. polimorfismo no gene MDM2. Gene P53.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Hepatocellular Carcinoma is the fifth most common type of neoplasia worldwide. The presence of the T309G polymorphism in the MDM2 gene (rs2279744) may be a risk factor for the development of this carcinoma. This gene is a negative regulator of the p53 protein and T309G polymorphism in the MDM2 gene can block or decrease the activity of p53 and may increase the occurrence of Hepatocellular Carcinoma. **OBJECTIVE:** To evaluate the involvement of the SNP T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma of different etiologies, the hospital complex Santa Casa de Porto Alegre. **METHODS:** We studied 67 patients with a diagnosis of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in the period 2000-2009. Polymorphism in the MDM2 gene was determined by the TaqMan-based real-time, allele-specific PCR assay. **RESULTS:** Regarding gender, 56 (83.6%) were male and 11 (16.4%) were female and the average age was 60.6 years (± 8.8), with a minimum age of 37 and maximum of 85 years. Regarding etiology of Hepatocellular Carcinoma, we observed that 31 cases (46.3%) were related to infection by hepatitis C virus (HCV), followed by infections by the hepatitis C virus + alcohol, totaling 24 cases (35.8%), as well as by alcohol consumption, shown in 4 cases (6%), and the presence of hepatitis B virus (HBV), occurring in 4 cases (6%). Other factors (HBV + HCV, cirrhosis + alcohol) were detected in 4 cases (6%). Liver transplantation was performed in 48 cases (71.6%) and hepatectomy in 19 (28.4%). Genotype frequencies were 40.3% for TT, 28.4% for TG, and 31.3% for GG. Allele frequency was 54.5% for the T allele and 45.5% for G allele. **CONCLUSION:** The analysis of T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with HCC showed no significant differences in genotype and allele frequencies, and it was not feasible to determine in this series any involvement of polymorphism with Hepatocellular Carcinoma.

KEYWORDS: Carcinoma Hepatocellular, Polymorphism in MDM2 gene, P53 gene.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
CHC.....	Carcinoma Hepatocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Alelo Polimórfico
GG	Genótipo Polimórfico
MDM2	Gene Murine Double Minute 2
MG.....	Miligrama
ml.....	Microlitro
Ph.....	Potencial hidrogeniônico
RNA.....	Ácido Ribonucleico
RPM.....	Rotações por minuto
SNP.....	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNPs.....	Polimorfismos de nucleotídeo único
T.....	Alelo Selvagem
TG.....	Genótipo Heterozigoto
TT.....	Genótipo Tipo Selvagem
VHB.....	Vírus da hepatite B
VHC.....	Vírus da hepatite C
VHD.....	Vírus da hepatite D
um.....	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Sequência de lesões celulares culminando no desenvolvimento do CHC.....	4
Figura 2- Desenho esquemático dos 393 aminoácidos da proteína p53 mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções.....	7
Tabela 1 (Artigo) - Características do grupo em estudo.....	21
Tabela 2 (Artigo)- Associação da etiologia com o genótipo.....	23

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma Hepatocelular	1
1.2 Patogênese do Carcinoma Hepatocelular	4
1.2.1 Proteína P53.....	6
1.2.2 Gene Murine Double Minute 2 (MDM2)	8
2 JUSTIFICATIVA	10
3 OBJETIVOS	10
3.1 OBJETIVO GERAL	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
5 ARTIGO EM PORTUGUÊS	15
5.1 Introdução	16
5.2 Metodologia	18
5.3 Análise Estatística	20
5.4 Resultados.....	20
5.5 Discussão.....	23
5.6 Conclusão.....	27
5.7 Fonte Financiadora.....	27
5.8 Referências Bibliográficas.....	28

6 CONCLUSÕES	30
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8 ARTIGO EM INGLÊS	32

Catálogo na Publicação

I98a Izaguirre, Andréa Gomes Coelho
Análise do envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 no carcinoma hepatocelular / Andréa Gomes Coelho Izaguirre. – 2013.
46 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Hepatologia, 2013.

“Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ott Fontes ; co-orientador: Dr. Néelson Kretzmann Filho.”

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Polimorfismo genético. 3. Transplante de fígado. 4. Vírus da hepatite. 5. Gene P53. I. Fontes, Paulo Roberto Ott . II. Kretzmann Filho, Néelson. III. Título.

CDD 616.994362
CDU 616.36-006.6

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular é a quinta neoplasia mais comum no mundo, com mais de meio milhão de casos novos, anualmente, e é a causa principal da morte entre os pacientes cirróticos. A incidência de CHC está aumentando nos Estados Unidos e Europa e, dentro de duas décadas, espera-se que vá igualar-se à incidência atual no Japão. A infecção crônica pelo o vírus da hepatite B é o fator de risco predominante para CHC no Sudeste Asiático e na África, e a infecção crônica pelo vírus da hepatite C é o fator de risco predominante para CHC em países ocidentais e Japão, respondendo por 49%, 56% e 75% dos casos nos Estados Unidos, na Europa e Japão, respectivamente¹⁻².

Responsável por aproximadamente 600.000 – 700.000 mortes em todo o mundo, o CHC é cada vez mais prevalente não só no sudeste da Ásia e África, mas também em países ocidentais. Assim, o interesse em estudar o Carcinoma Hepatocelular desenvolveu-se nos últimos anos no Ocidente, onde havia pouco ou nenhum interesse evidente entre 10 a 20 anos atrás³.

No Brasil, o Carcinoma Hepatocelular não está incluído entre os dez tipos mais comuns de câncer, provavelmente por causa da subnotificação. Estimativas mostram que existem de 2 a 3 mil diagnósticos da doença a cada ano, com uma incidência nacional de 1:100.000 habitantes / ano. A incidência desta neoplasia é maior no norte, nordeste e sudeste do que no sul do país. A maior frequência ocorre nos estados do Amazonas, Bahia e Espírito Santo. Em São Paulo, a incidência é um pouco maior do que a média do país, afetando cerca de 2:100.000 habitantes / ano. Em termos

de mortalidade, o CHC é a sétima causa de morte e é responsável, anualmente, por 4% das mortes por câncer no Brasil ⁴.

O câncer de fígado afeta todos os segmentos da população mundial, embora diferenças significativas na incidência no CHC em vários países reflitam as diferenças regionais na prevalência de fatores etiológicos específicos. O mais proeminente fator associado ao CHC inclui hepatite crônica B e C, consumo de álcool e aflatoxina B1. Outros fatores etiológicos foram igualmente propostos como determinantes do CHC, embora com menor frequência. Além disso, também o gênero de um indivíduo pode influenciar o risco e o prognóstico do CHC, já que as estatísticas apontam que esse câncer tem números quatro vezes maiores nos homens do que nas mulheres⁵.

No Brasil, até 90% dos CHCs estão associados com a cirrose. Os principais fatores de risco são as infecções crônicas pelo vírus da hepatite C (VHC) e da hepatite B (VHB), o abuso crônico de álcool e a hemocromatose hereditária. Historicamente, o diagnóstico de CHC foi quase sempre feito em estágios avançados e as opções terapêuticas não demonstraram resultados satisfatórios⁶.

Em um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, no ano de 2010, foram analisados 1405 casos diagnosticados entre os anos de 2004 e 2009. Nesse estudo, observou-se que, no Brasil, a cirrose estava presente em 98% dos casos, ocorrendo em pacientes com a média de idade de 59 anos, dos quais 78% eram do gênero masculino⁷. Assim, a cirrose hepática, independentemente da etiologia, vem demonstrando ser um fator que predispõe ao CHC⁸.

As características do VHC que estão associadas à carcinogênese são fibrose hepática e a idade de 60 anos ou mais. Em alguns casos de cirrose, a carcinogênese está

associada à esteatose hepática não alcoólica, à cirrose biliar primária, à hepatite auto-imune e, especialmente, à cirrose hepática viral⁹.

A infecção pelo VHC está associada ao CHC de forma ainda não completamente elucidada. Acredita-se que o VHC, um vírus com replicação restrita ao citoplasma, induz a transformação oncogênica, por isso vem desafiando os modelos biológicos convencionais de oncogênese viral. Após muitos anos de infecção crônica pelo VHC, o dano hepático crônico seguido por regeneração, cirrose e desenvolvimento do CHC tem sido a principal hipótese do surgimento do CHC¹⁰.

O vírus da hepatite B (VHB) atinge 400 milhões de pessoas no mundo e é responsável por 320.000 mortes por ano. Aproximadamente, 30-50% das mortes em decorrência do VHB estão relacionados com o CHC¹¹. O mecanismo exato pelo qual o VHB pode levar ao CHC ainda não está totalmente elucidado, embora já se saiba que o VHB não é um oncovírus e que a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro parece ser importante para a persistência viral¹².

A intoxicação com a Aflatoxina (aflatoxicose) ocorre com a ingestão de produtos e subprodutos contaminados (principalmente amendoim, milho, castanhas, feijão e sementes oleaginosas). As aflatoxinas são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus paraceticus*. Essas toxinas, em especial a aflatoxina B1 (AFB1), são extremamente tóxicas, apresentando um elevado potencial cancerígeno¹³.

A maioria dos casos de CHC tem um prognóstico reservado. Este quadro depende principalmente de três fatores: a falta de um marcador que permita um diagnóstico precoce do CHC; a hepatopatia subjacente e o insucesso dos tratamentos quimioterápicos disponíveis. O desenvolvimento de metástases e a recidiva tumoral são as causas mais prevalentes de morte nos pacientes com CHC¹⁴.

1.2 PATOGÊNESE MOLECULAR DO CHC

As alterações nas bases do DNA, assim como nos mecanismos de reparo, e nos genes envolvidos na instabilidade de microssatélites (IMS) também foram encontradas no CHC, especialmente associados ao VHC. Dessa forma, as alterações genéticas envolvidas em algumas das múltiplas etapas da carcinogênese vêm sendo crescentemente estudadas nos últimos anos¹⁵.

Os tumores malignos são agregados de células, todas descendentes de uma célula inicial aberrante. As células neoplásicas se diferem tipicamente de suas vizinhas normais por um conjunto de características fenotípicas, tais como a rápida taxa de divisão, a habilidade de invadir novos locais celulares, a alta taxa metabólica e a forma anormal¹⁶.

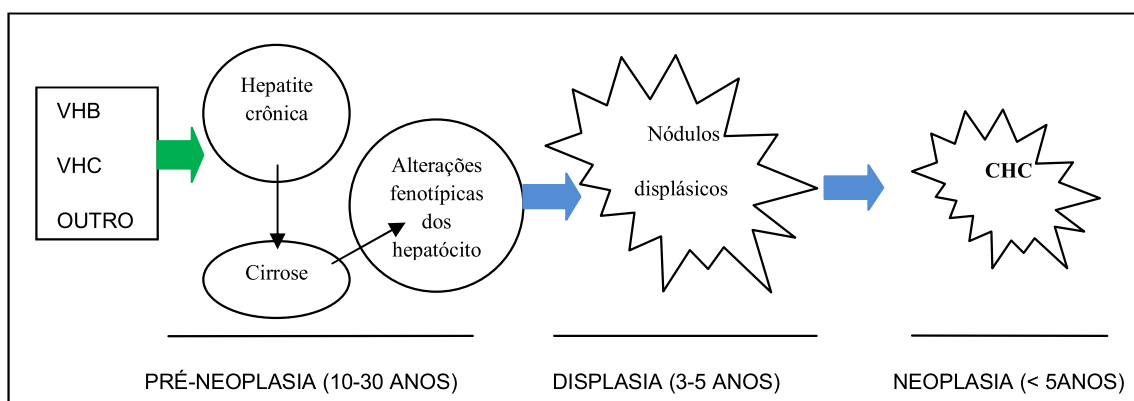


Figura1 - Sequência de lesões celulares culminando no desenvolvimento do CHC¹⁷.

Foram descobertos dois tipos de genes ligados ao câncer, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes são genes normais que codificam proteínas implicadas no controle da proliferação celular e da morte celular, existindo, aproximadamente, 100 tipos diferentes. A denominação de proto-oncogenes é creditada ao fato de que, como resultados de mutações, podem dar lugar às suas versões defeituosas: os oncogenes. Os genes supressores de tumor inibem a reprodução

excessiva da célula e sua falta leva à perda dos mecanismos normais que detêm a proliferação. Dentre os supressores tumorais, temos o gene p53, situado no braço curto do cromossomo 17¹⁸.

Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que parecem estar associados a apenas uma base. A frequência com que ocorrem é pequena, em pouco mais de 2% da população. Uma das formas mais estudadas de polimorfismos genéticos são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os SNPs são definidos como polimorfismos resultantes da substituição de um nucleotídeo por outro. Algumas das alterações ocorrem em sequências codificadoras do gene, levando à produção de proteínas defeituosas. As alterações genéticas podem ser de diferentes tipos. Dentre elas, as que mudam a sequência de DNA, mas não mudam a sequência da proteína; outras são as que mudam a sequência da proteína sem mudar sua função; há também as alterações genéticas que criam proteínas com diferentes atividades e, ainda, as que criam proteínas que não são mais funcionais. Desse modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer¹⁹.

As células humanas são muitas vezes expostas a agentes genotóxicos de origem endógena ou ambientais que podem causar carcinogênese. No entanto, estas células desenvolveram um sistema complexo para se proteger desses agentes. O gene supressor tumoral p53 desempenha um papel fundamental na proteção celular, servindo como um grande integrador dos sinais produzidos por danos ao DNA. Em células normais, o nível de proteína p53 é baixo ou indetectável, mas diversas formas de estresse podem desencadear o aumento na sua expressão²⁰.

Em células normais, a função do gene p53 é rigorosamente regulada pelo gene Murine Double Minute 2 (MDM2). O MDM2 se liga diretamente à proteína P53,

inibindo sua atividade e, assim, a degradação da P53 também diminui, e esse processo ocorre por meio de mediação do sistema de ubiquitinação²¹.

1.2.1 Proteína p53

O gene p53, considerado como o “guardião do genoma”, dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância. Este gene está localizado no cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma proteína, a p53, que foi descrita, pela primeira vez, em 1979, em células transformadas pelo vírus SV40.²²

A proteína p53 desempenha um papel central na regulação das diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos no DNA causados por diferentes agentes (Ex: luz ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos químicos). Esta proteína de 53 quilodáltons é uma reguladora transcricional induzida em respostas a danos ao DNA e pode levar a uma parada no ciclo celular, ou induzir a apoptose²³⁻²⁴.

Sendo constituída de 393 aminoácidos na sua extensão, a proteína p53 apresenta quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína. Uma vez ativada, a proteína p53 é capaz de reprimir o crescimento e sinalizar para a morte celular, rota mais conhecida como apoptose. Na extremidade amino terminal (ou N-terminal) da p53, existe um domínio de transativação, muito importante para a ativação específica de determinados genes. Na parte central, existem quatro domínios de ligação ao DNA, através dos quais a proteína p53 é capaz de se ligar ao DNA em locais específicos. Na extremidade carboxi-terminal (ou C-terminal), existem dois domínios. São eles: o domínio de tetramerização, que é responsável pela formação de tetrâmeros

do p53, e o domínio regulatório, que pode regular negativamente o domínio central de ligação ao DNA. Ao se ligar a este, inibe a ligação específica de p53 aos diferentes promotores²⁵.



Figura 2- Desenho esquemático dos 393 aminoácidos da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53. (STOREY e cols., 1998).

O gene p53 suprime a formação de células cancerígenas por meio de diversos mecanismos, com a ajuda de proteínas intermediárias, fazendo com que as células que sofreram danos no DNA parem na fase S do ciclo mitótico, até que o DNA seja reparado²⁶.

As mutações no gene p53 estão associadas a muitos tipos de tumores. Estima-se que 50% dos tumores humanos não possuem um gene p53 funcional. O p53 ativado tem dupla função: evitar a progressão do ciclo celular até que o dano no DNA seja reparado e, em algumas circunstâncias, induzir a apoptose. Se nenhuma proteína p53 estiver presente ou for funcional, o ciclo celular progride, mesmo que o DNA danificado não tenha sido reparado⁸.

A proteína p53 responde a uma variedade de sinais de estresse. A ocorrência de um ou mais destes sinais, associa-se à modificação bioquímica da proteína p53 e a um aumento significativo na meia vida da proteína p53. O rápido retorno da p53 em células normais é, na maior parte, devido à oncoproteína Murine Double Minute 2 (MDM2), um regulador direto da p53²⁷.

1.2.3 Gene Murine Double Minute 2 (MDM2)

O gene MDM2 foi inicialmente clonado a partir de cromossomos purificados dentro de uma linha celular transformada Balb/c3T3 chamada 3T3DM²⁸. Esse gene codifica uma proteína de mesmo nome, chamada MDM2, que é capaz de se ligar à extremidade N-terminal da proteína p53, bloqueando, desse modo, sua atividade transcricional. A ligação da proteína MDM2 com a proteína p53 é também responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, local onde a p53 é degradada por uma via de ubiquitinação. A exportação do complexo proteico MDM2/p53 para fora do núcleo é mediada por proteínas específicas denominadas exportinas, que são capazes de se ligar à proteína MDM2 e de auxiliar na exportação do complexo para fora do núcleo²².

Bioquimicamente, a proteína MDM2 funciona como uma ubiquitina-ligase E3, responsável pela ubiquitinação e degradação da proteína p53²⁹.

Localizado no braço longo do cromossomo 12 o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) na posição 309 (rs2279744), uma transversão de T para G em um ou ambos os alelos, cria um sítio para o fator de transcrição SP1 (fator de transcrição promotor específico da RNA polimerase), aumentando sua afinidade e elevando os níveis da proteína MDM2 na célula. Com mais MDM2 sendo expresso, há uma atenuação da resposta de p53 ao estresse, resultando em maior taxa de mutação, falhas no reparo ao DNA, redução da apoptose e senescência celular, o que aumenta, por consequência, o risco da tumorigênese³⁰.

A proteína MDM2 é um regulador negativo direto para a proteína supressora de tumor p53. A superexpressão de MDM2, em até quatro vezes, em camundongos transgênicos leva à tumorigênese completa independente. Essa

superexpressão também está associada à menor sobrevida e sugere-se que seja um preditivo útil como fator de mau prognóstico em humanos com CHC³¹.

Segundo os pesquisadores Dan Michael e Moshe Oren , entre 5% e 10% dos tumores humanos possuem um aumento significativo na expressão da proteína MDM2, sendo este induzido pelo balanço negativo exercido sobre a proteína p53³².

Estudos demonstraram 7% de frequência global de amplificação do gene MDM2 em tumores humanos. Esta amplificação foi observada em 19 tipos de tumores, com frequência mais alta encontrada em tumores de tecidos moles (20%), osteossarcomas (16%) e carcinomas de esôfago (13%)³³.

Identificado um SNP no gene MDM2, com uma alteração de T por G na posição 309, localizada no primeiro intron do gene, observou-se que tal circunstância produziu a formação acelerada do tumor. A análise de 96 pacientes com CHC e de 222 controles demonstrou que o polimorfismo funcional no promotor MDM2 teve um impacto significativo no risco de desenvolver carcinoma hepatocelular em pacientes marroquinos³⁴. Além disso, tem sido sugerido que esse SNP está associado com o risco e idade de início precoce de vários cânceres humanos. Alguns estudos têm mostrado que o SNP T309G do MDM2 está associado com o risco de CHC em japoneses e pacientes marroquinos com hepatite crônica C e pacientes coreanos com hepatite crônica B²⁷.

Esse tipo de polimorfismo gene MDM2, resulta no aumento dos níveis de MDM2 e reduz a atividade da proteína p53³⁵. Assim, acreditamos que, uma vez que o gene MDM2 e a proteína p53 são componentes centrais na manutenção do genoma, tal polimorfismo pode estar envolvido com o desenvolvimento de CHC. O SNP T309G resulta em maiores níveis de RNA mensageiro e em proteína MDM2. Os níveis MDM2

aumentados inibem a p53, permitindo que células danificadas escapem do ponto de verificação do ciclo celular e, assim, de se tornarem carcinogênicas³⁶.

Este SNP promove aumento da afinidade da ligação na proteína estimuladora Sp1 e implica níveis mais elevados de RNA e proteínas com a posterior atenuação do p53³⁷. Em outro estudo, o genótipo GG apresentou uma maior afinidade de ligar proteínas estimulatórias Sp1 e também evidenciou uma expressão de MDM2 elevada bem como uma atenuação significativa da via p53, em comparação com aqueles casos que tinham genótipo T/T³⁸.

Nos últimos anos, vários estudos pesquisam a possível relação do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 e o Carcinoma Hepatocelular. Alguns estudos indicam que este polimorfismo está associado com o risco de desenvolver CHC em pacientes Coreanos, Japoneses, Turcos e Marroquinos com hepatite crônica³⁹.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a elevada prevalência do Carcinoma Hepatocelular e o impacto que promove na sobrevivência dos pacientes, torna-se fundamental um melhor entendimento da genética do CHC como mais uma ferramenta auxiliar na análise da perspectiva de recidiva tumoral e da perspectiva de cura dos pacientes. Esse estudo buscou avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular com diferentes etiologias e atendidos nos serviços da Santa Casa de Porto Alegre e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 em pacientes com carcinoma hepatocelular .

3.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar a frequência genotípica e alélica relativa ao polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 nas amostras de CHC estudadas.

2) Relacionar a presença do polimorfismo SNP T309G com os fatores etiológicos do CHC.

3) Relacionar a presença do polimorfismo SNP T309G com gênero dos pacientes.

4. Referencias Bibliográficas

- ¹ Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:351-61.
- ² Liovet JM, Bruix J. Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698 – 711.
- ³ Kudo M. Hepatocellular Carcinoma 2009 and Beyond: from the Surveillance to Molecular Targeted Therapy. *Oncology* 2008;75(suppl 1):1–12.
- ⁴ Jader AV , Ramalho FS, Zambelli LN, et al. Biomarkers of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with the Hepatocellular Carcinoma.. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/20387/InTech>. Acesso em 28 Ago 2013.
- ⁵ Farazi PA, Depinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis:from genes to environment. *Nature* September 2006, Volume6.
- ⁶ Silva M, Moya A, Berenguer M, et al. Expanded Criteria for Liver Transplantation in Patients with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Liver transplantation* 14:1449-1460, 2008.
- ⁷ Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil .*Clinics* 2010;65:1285-1290.
- ⁸ Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. *J Gastroenterol* 2009;44(Suppl XIX):96–101.
- ⁹ Kudo M. Hepatocellular Carcinoma 2009 and Beyond: from the Surveillance to Molecular Targeted Therapy. *Oncology* 2008;75(suppl 1):112
- ¹⁰ Kikuchi LO . Análise da sobrevida de pacientes com carcinoma hepatocelular pequeno. São Paulo 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5147/tde-13022008-095440/pt-br.php>. Acesso em: 22 set 2010.
- ¹¹ Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med* 2002;347:168-74.
- ¹² Chan HLY, Sung JJY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Sem Liver Dis* 2006;26:153-157
- ¹³ Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflotoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74:203-209.

-
- ¹⁴ Cillio U, Vitalle A, Grigoletto F, et al. Prospective validation of the Barcelona *Clinic Liver Cancer Staging System*. *J Hepatol* 2006; 44:723-731.
- ¹⁵ Yano M, Hamatani K, Eguchi H, et al. Prognosis in patients with hepatocellular carcinoma correlates to mutations of p53 and/or hMSH2 genes. *European Journal of Cancer* 43 (2007) 1092-1100.
- ¹⁶ Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, et al. *Introdução à genética*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 537.
- ¹⁷ Brose MS, Smyrk T, Weber B, et al. Genetic predisposition to cancer - cancer etiology. *Cancer medicine*, 2000;168-84.
- ¹⁸ De Roberts E, Hib J. *Biologia celular e Molecular*. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.297 e 298.
- ¹⁹ Butler JM. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press, New York, 2005;201-239.
- ²⁰ Zhang X, Miao X, Guo Y, et al. Genetic Polymorphisms in Cell Cycle Regulatory Genes MDM2 and TP53 Are Associated With Susceptibility to Lung Cancer. *Human Mutation* 27(1),110-117,2006
- ²¹ Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of TP53. *Nature* 1997;387:296–299.
- ²² Fett-Conte AC, Salles ABC. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev.bras.hematol.hemoter.*,2002,24(2):85-89.
- ²³ Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004, p.39.
- ²⁴ Michael D, Oren M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13 (2003) 49–58.
- ²⁵ Da Cruz AD. O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* nº 29. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/hpv.pdf> Acesso em 30 outubro 2011.
- ²⁶ Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.295
- ²⁷ Han JY, Lee GK, Jang DH, et al, Association of p53 Codon 72 Polymorphism and MDM2 SNP309 With Clinical Outcome of Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. *CANCER* August 15, 2008. Volume 113. Number 4.
- ²⁸ Momad J, Wu HH, Dasgupta G, e al.. MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242 (2000) 15–29.

-
- ²⁹ Iwakuma T, Lozano G. Mdm2, An Introduction. *Molecular Cancer Research*; Vol. 1, 993–1000, December 2003.
- ³⁰ Atwal GS, Kirchoff T, Bond EE, et al. Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *PNAS* June 23, 2009 . vol. 106 .Number 25. 10236–10241.
- ³¹ Leu JD, Lin I, Sun YF, et al. Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population. *World J Gastroenterol* 2009 November 28; 15(44): 5592-5597.
- ³² Michael D, Oren M . The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13 (2003) 49–58.
- ³³ Momand J, Jung D, Wilczynski S, et al. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, No. 15.
- ³⁴ Ezzikouri S, Abdellah EEF, Afifi R, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: A case–control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev* (2009), doi:10.1016/j.cdp.2009.01.003.
- ³⁵ Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. Volume 113. Issue 1, april 2009. Pages 109-114.
- ³⁶ Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, et al. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*. vol. 29, n° 6, pp.1192–1196, 2008.
- ³⁷ Acun T, Terzioğlu-Kara E, Konu O, et al. Mdm2 Snp309 G allele displays high frequency and inverse correlation with somatic P53 mutations in hepatocellular carcinoma. *Mutation Research* 684 (2010) 106–108.
- ³⁸ Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the TP53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, Vol. 119, 591–602, 2004.
- ³⁹ Wang X, Zhang X, Qiu B, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism increases susceptibility to hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in a northeast Han Chinese population. *Liver International* ISSN 1478-3223, 2012.

5 - ARTIGO CIENTÍFICO

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO SNP T309G NO GENE MDM2 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR

Andréa Gomes Coelho Izaguirre¹, Paulo Roberto Ott Fontes², Ângelo Mattos³, Antonio Atalibio Hartmann⁴, Thadeu Czerski⁵, Néelson Alexandre Kretzmann⁶

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, UFCSPA, Porto Alegre.

2 Professor Livre-Docente em Cirurgia, Mestre, Doutor e Livre-Docente em Cirurgia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA. Chefe do Departamento de Cirurgia da UFCSPA, Coordenador da equipe de Transplante Hepático da UFCSPA e ISCMPA - Santa Casa de Porto Alegre. Professor da Pós-graduação em Medicina: Hepatologia, UFCSPA, Porto Alegre.

3 Professor da Pós-graduação em Medicina: Hepatologia, UFCSPA, Porto Alegre.

4 Professor da pós-graduação em Patologia, UFCSPA, Porto Alegre.

5 Departamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

6 Professor da Pós-graduação em Medicina: Hepatologia, UFCSPA, Porto Alegre.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Carcinoma Hepatocelular é a quinta neoplasia mais comum no mundo. A presença do polimorfismo T309G no gene MDM2 (rs2279744) pode ser um fator de risco para o desenvolvimento desse carcinoma. Esse gene é um regulador negativo da proteína p53 e o polimorfismo T309G no gene MDM2 pode bloquear ou diminuir a atividade da p53 podendo aumentar a ocorrência de Carcinoma Hepatocelular. **OBJETIVO:** Avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular de diferentes etiologias, no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. **METODOLOGIA:** Foram analisados 67 pacientes com diagnóstico de Carcinoma Hepatocelular (CHC), no período de 2000 a 2009. O polimorfismo no gene MDM2 foi determinado pela técnica de PCR *Real Time* alelo-específico por meio do ensaio *TaqMan*. **RESULTADOS:** Quanto ao gênero 56 (83,6%) eram do gênero masculino e 11 (16,4%) do gênero feminino; a média de idade era de 60,6 anos (\pm 8,8), com idade mínima de 37 e máxima de 85 anos. Quanto à etiologia do Carcinoma Hepatocelular, observou-se que 31 casos (46,3%) estavam relacionados com a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), seguidos pelos casos de infecção pelo vírus da hepatite C + álcool, num total de 24 casos (35,8%), bem como pelo consumo de álcool, evidenciado em 4 casos (6%), e pela presença do vírus da hepatite B (VHB), ocorrente em 4 casos (6%). Outros fatores (VHB+VHC, cirrose +álcool) foram detectados em 4 casos (6%). O transplante hepático foi realizado em 48 casos (71,6%) e a hepatectomia em 19 (28,4%). As frequências dos genótipos foram de 40,3% para TT, 28,4% para TG, e 31,3% para GG. A frequência alélica foi de 54,5% para o alelo T e de 45,5% para o alelo G. **CONCLUSÃO:** A análise do polimorfismo T309G no gene MDM2 em pacientes com CHC não apresentou diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas, não sendo viável determinar nesta série se existe envolvimento do polimorfismo com o Carcinoma Hepatocelular.

Palavras-chave: Carcinoma Hepatocelular. Polimorfismo no gene MDM2. Gene P53.

INTRODUÇÃO

O Carcinoma Hepatocelular é a quinta neoplasia mais comum no mundo, com mais de meio milhão de novos casos anualmente, constituindo a principal causa da morte entre os pacientes cirróticos. A infecção crônica pelo vírus da hepatite B é o fator de risco predominante para CHC no Sudeste Asiático e na África e a infecção crônica pelo vírus da hepatite C é o fator de risco predominante para CHC em países ocidentais e no Japão¹. Entre os fatores de maior proeminência associados ao Carcinoma Hepatocelular, inclui-se a hepatite crônica pelo vírus C e pelo vírus B, o consumo de álcool e a aflatoxina B1. Outros fatores etiológicos foram igualmente propostos para conduzir ao CHC, embora com menor frequência. Além disso, o gênero também pode influenciar o risco e o prognóstico do CHC, sendo quatro vezes maior em homens do que em mulheres. No Brasil até 90% dos CHCs estão associados à cirrose, encontrando-se como principais etiologias as infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite C (VHC), o abuso crônico de álcool e a hemocromatose hereditária²⁻³.

As alterações nas bases do DNA, assim como nos mecanismos de reparos e nos genes envolvidos na instabilidade de microssatélites (IMS), também são encontrados no CHC, especialmente associados ao VHC. Em razão disso, alterações genéticas envolvidas em algumas das múltiplas etapas da carcinogênese vêm sendo estudadas nos últimos anos⁴.

O gene P53, considerado como o guardião do genoma dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância. A proteína p53 desempenha um papel central na regulação das diferentes

vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos no DNA causados por diferentes agentes como a luz ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos químicos. Esta proteína de 53 quilodáltons é uma reguladora transcricional induzida em respostas aos danos ao DNA e pode levar a uma parada no ciclo celular ou induzir a apoptose⁵⁻⁶.

A proteína MDM2 é um regulador negativo direto para a proteína supressora de tumor P53, que está envolvida em 50% dos cânceres humanos⁷. O gene MDM2 codifica uma proteína de mesmo nome (proteína MDM2) que é capaz de se ligar a extremidade N-terminal da proteína p53, bloqueando desse modo a atividade transcricional da P53⁸. Estudos realizados em camundongos demonstraram que a superexpressão de MDM2 é capaz de gerar tumores. Essa superexpressão também está associada à menor sobrevida e é um preditivo útil como fator de mau prognóstico em casos de CHC⁷.

O polimorfismo localizado no primeiro intron do gene MDM2 (SNP309) com alteração de T>G resulta em aumento de níveis da proteína MDM2 e reduz a atividade da proteína P53. Uma vez que o gene MDM2 e a proteína P53 são componentes centrais da manutenção do genoma o polimorfismo (SNP309) pode estar envolvido com o desenvolvimento de CHC⁹. Estudos sugerem que o polimorfismo T309G no gene MDM2 está associado com maior risco e com a idade precoce do início de vários cânceres humanos¹⁰.

Estudo de meta-análise realizado recentemente incluiu trabalhos da Turquia, Marrocos, Japão e Coréia, totalizando 738 casos com Carcinoma Hepatocelular e 1014 controles negativos sem CHC, num período de 2006 até 2010. Com objetivo de avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2, a pesquisa concluiu que

há envolvimento significativo desse polimorfismo com o risco de desenvolver Carcinoma Hepatocelular e que o alelo polimórfico G atua como importante fator de risco para o desenvolvimento do CHC¹¹.

Buscando conhecer melhor a biologia molecular do CHC como mais uma ferramenta auxiliar na análise da perspectiva de recidiva tumoral e da perspectiva de cura dos pacientes, esse estudo buscou avaliar o envolvimento do polimorfismo SNP T309G no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular com diferentes etiologias em pacientes atendidos nos serviços da Santa Casa de Porto Alegre e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

METODOLOGIA

População do estudo

A amostragem em estudo foi formada por pacientes com CHC diagnosticados por exame anatomopatológico. As amostras foram obtidas de tecido em bloco parafinado, no período entre 2000 e 2009. Os pacientes em estudo foram submetidos à hepatectomia ou ao transplante de fígado no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

No total foram identificados 124 casos com diagnóstico de CHC, destes, 32 amostras não foram utilizadas, pois em 8 amostras os blocos de tecido em parafina apresentavam material insuficiente para a análise e em 24 apresentavam excesso de necrose. Portanto, permaneceram no estudo um total de 92 amostras.

Esse estudo optou por não ter grupo controle negativo devido a dificuldade de obter um número significativo amostras sem carcinoma hepatocelular, além disso, o foco principal do nosso estudo foi a genotipagem do polimorfismo no gene MDM2.

A fim de manter a confidencialidade dos pacientes, todos os casos foram codificados com a sigla CHC seguida pelo número da amostra e o banco de dados do trabalho foi organizado com base nos prontuários dos pacientes.

Preparação das amostras

As amostras parafinadas de tecido tumoral foram cortadas em fragmentos de 4 μ m, com utilização do micrótomo e de navalhas próprias (*EasyPath*) estéreis. Este material foi armazenado em tubos de 1,5ml e mantido a menos 20°C até o momento da extração de DNA.

Extração de DNA

As amostras foram desparafinadas com xilol e etanol. Realizou-se uma lavagem com xilol, agitando durante 15 segundos e duas lavagens com etanol também com duração de 15 segundos cada. As duas lavagens a seguir foram centrifugadas a 13.000 rpm por 6 minutos. Após a centrifugação da lavagem, foi adicionada a amostra à proteinase k (20mg/ml), juntamente com um tampão de lise e o DNA permaneceu em banho-maria a 60°C *overnight* para potencializar o efeito da digestão enzimática. No dia seguinte o DNA foi extraído pelo Kit de Extração Bioneer (*Bionner Corporation, EE.UU.*). Todo o processo de extração de DNA foi realizado conforme a indicação do fabricante.

A integridade e a quantidade de DNA por amostra foram analisadas no aparelho *NanoDrop* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, USA*). O DNA de cada amostra foi extraído, quantificado e armazenado a -20°C.

Genotipagem

Para a identificação molecular do polimorfismo T309G no gene MDM2 (rs 2279744) foi utilizada a técnica de PCR *Real Time* alelo-específico por meio do ensaio *TaqMan* em termociclador *Step One Plus* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*).

No ensaio *TaqMan*, foi utilizado um par de *primers* a fim de identificar a sequência de DNA que contém o polimorfismo, sendo eles os seguintes: *Foward* 5'CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT 3' e *Reverse*:5' ACAGGCACCTGCGATCATC 3'. Foram utilizadas duas sondas, uma para identificar o alelo com o polimorfismo e a outra para o alelo sem o polimorfismo, são as seguintes: VIC-5'-CTCCCGCGCCGAAG-3' e a sonda FAM-5'-TCCCGCGCCGAG-3' (*primers* e sondas da *Applied Biosystems, Foster City, CA*).

Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por média, desvio-padrão e as categorias foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para comparar médias entre grupos, o teste *t-student* para amostras independentes ou Análise de Variância (ANOVA) *one-way* foram aplicados. Na comparação de proporções, o teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher foram aplicados.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 18.0.

RESULTADOS

Foram selecionadas 92 amostras para o estudo, em 11 não obtivemos sucesso na extração de DNA e em 14 amostras não conseguimos a amplificação pela reação de *PCR* alelo-específico, totalizando a análise dos dados de 67 pacientes.

Foram analisadas 67 amostras de pacientes com Carcinoma Hepatocelular, sendo que 56 pacientes (83,6%) eram do gênero masculino e 11 (16,4%) do gênero feminino. A média de idade contabilizou 60,6 anos ($\pm 8,8$), sendo a idade mínima de 37 anos e a idade máxima de 85 anos.

A etiologia do CHC estava relacionada com a infecção pelo VHC em 31 casos (46,3%), seguido pela infecção por VHC + álcool em 24 casos (35,7%), pela ingestão de álcool em 4 casos (6%), pelo VHB em 4 casos (6%) e por outras causas identificadas também em 4 casos (6%). O transplante hepático foi realizado em 48 pacientes (71,6%) e a hepatectomia em 19 pacientes (28,4%). Estes dados podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1- Características do grupo em estudo.

Variáveis		n=67
Gênero – n(%)	Masculino	56 (83,6)
	Feminino	11 (16,4)
	Idade (anos) - média \pm DP	60,6 \pm 8,8
Etiologia – n(%)	VHC	31 (46,3)
	VHC+Álcool	24 (35,7)
	Álcool	4 (6,0)
	VHB	4 (6,0)
	VHB+Álcool	1 (1,5)
	VHC+VHB	1 (1,5)
	Outros	2(3,0)
Procedimento – n (%)	Transplante	48 (71,6)
	Hepatectomia	19 (28,4)

Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo T309G no gene MDM2

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo T309G na amostra de 67 pacientes com CHC foi de 27 pacientes (40,3%) para o genótipo homozigoto do tipo selvagem TT, 19 pacientes (28,4%) para o genótipo heterozigoto TG e 21 pacientes (31,3%) para o genótipo homozigoto polimórfico GG. Quando calculada a frequência alélica para o alelo T encontramos 36 pacientes (54,5%) e para a variante polimórfica G 31 pacientes (45,5%).

Associação entre gênero e genótipo

Quanto à distribuição dos gêneros foi observado que 56 pacientes (83,6%) eram do gênero masculino e 11 pacientes (16,4%) do gênero feminino, sendo $p=0,107$. Destes, o genótipo TT esteve presente em 24 pacientes (88,9%) do gênero masculino e 3 pacientes (11,1%) do gênero feminino. Quando avaliado o genótipo TG encontramos 13 pacientes (68,4%) do gênero masculino e 6 pacientes (31,6%) do gênero feminino e quanto ao genótipo polimórfico GG este esteve presente em 19 pacientes (90,5%) do gênero masculino e 2 pacientes (9,5%) do gênero feminino.

Associação da Etiologia com os genótipos

Dos 27 pacientes (40,3%) com o genótipo TT, 13 pacientes (48,1%) apresentavam o VHC, 5 pacientes (18,5%) VHC + álcool e 4 pacientes (14,8%) somente o consumo de álcool. Quando presente o VHB o genótipo TT esteve presente em 2 pacientes (7,5%), 1 paciente (3,7%) quando associados VHB+ álcool e novamente 1 paciente (3,7%) quando associados o VHB + VHC. Também foi encontrado 1 paciente com (3,7%) com outras etiologias.

Dos 19 pacientes (28,4%) com genótipo TG 9 pacientes (47,4%) apresentavam o VHC, 9 pacientes (47,4%) o VHC + álcool, e 1 paciente (5,2%) o VHB. O genótipo TG não foi encontrado quando associado VHB + VHC, VHB + álcool e em outras etiologias (Tabela 2).

O genótipo polimórfico GG presente em 21 pacientes (31,3%) apresentou 9 pacientes (42,8%) com o VHC, 10 pacientes (47,6%) com o VHC + álcool e 1 paciente (4,8%) com o VHB (Tabela 2). Este genótipo não foi observado em pacientes que tinham como etiologia o álcool, VHB + VHC e VHB + álcool. Em outras etiologias, evidenciou 1 paciente (4,8%).

A associação da etiologia com o genótipo pode ser verificado na tabela 2.

Tabela 2- Associação da etiologia com o genótipo.

ETIOLOGIA	FREQUÊNCIA	GENÓTIPO TT (n=27)	GENÓTIPO TG (n=19)	GENÓTIPO GG (n=21)	P*
	(%)	n(%)	n(%)	n(%)	0,504
VHC	31(46,3%)	13(48,1%)	9(47,4%)	9(42,8%)	
VHC + ÁLCOOL	24(35,7%)	5(18,5%)	9(47,4%)	10(47,6%)	
VHB	4(6,0%)	2(7,5%)	1(5,2%)	1(4,8%)	
ÁLCOOL	4(6,0%)	4(14,8%)	-	-	
VHB + VHC	1(1,5%)	1(3,7%)	-	-	
VHB + ÁLCOOL	1(1,5%)	1(3,7%)	-	-	
OUTROS	2(3,0%)	1(3,7%)	-	1(4,8%)	

VHC: vírus da hepatite C; VHB: vírus da hepatite B.

Outros: cirrose + VHB, cirrose + VHC.

* Teste qui-quadrado de Pearson.

DISCUSSÃO

O gene MDM2 tem papel importante como regulador negativo da proteína P53 e a presença do polimorfismo T309G resulta em aumento nos níveis de proteína MDM2 reduzindo a atividade da proteína P53. Assim, uma vez que o gene MDM2 e a proteína P53 são componentes centrais da manutenção do genoma, esse polimorfismo

pode estar envolvido com o desenvolvimento de CHC da mesma forma que está em outros tipos de neoplasias ^{7,9}.

Em um estudo que avaliou a frequência polimórfica SNP T309 G no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular na população do Marrocos, o genótipo homozigoto selvagem TT esteve presente em 40,62% dos casos, o genótipo heterozigoto TG foi identificado em 47,92% dos casos e o genótipo polimórfico GG em 11,46%. O mesmo estudo comparou pacientes com e sem Carcinoma Hepatocelular e constatou que o genótipo polimórfico GG tinha maior prevalência de CHC (11,6 % em pacientes com CHC contra 5,85% em pacientes sem CHC) ¹².

Ao comparar o estudo acima com o presente trabalho, encontramos diferenças nas frequências genotípicas, principalmente no que se refere ao genótipo GG, que em nosso trabalho foi de 31,3%. No que concerne ao genótipo TT, foram encontradas frequências semelhantes. O estudo citado concluiu, após comparar o grupo de estudo com grupo controle, que a presença do genótipo GG parece estar envolvida com o CHC.

Por falta de grupo controle em nosso estudo, não foi possível fazermos tal comparação.

Não encontramos diferenças na distribuição das frequências relacionada com o gênero, levando em conta a distribuição do CHC ser mais frequente em homens do que em mulheres.

Em estudo realizado na Coreia foi pesquisado o envolvimento do mesmo polimorfismo no gene MDM2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular e VHB, sendo encontrada uma frequência genotípica de 15,7% para o genótipo tipo selvagem TT, 43,5% para o heterozigoto TG e 40,3% para o polimórfico GG. Esse mesmo estudo

comparou ainda a frequência genotípica em amostras sem Carcinoma Hepatocelular e identificou uma frequência de 28% para o genótipo tipo selvagem TT, 44,6% para o genótipo TG e 27,4% para o genótipo polimórfico GG¹³. O presente estudo encontrou frequências diferentes, principalmente para o genótipo TT que foi maior (40,3%) e para o genótipo TG que foi menor (28,4%) independente da etiologia. Este fato pode estar associado ao grupo de estudo pesquisado na Coreia que incluiu como etiologia somente o VHB e ao tamanho da amostra sendo um total 583 casos (287 com CHC e 296 sem CHC). Nosso estudo obteve apenas 67 pacientes com etiologia variada sendo apenas 4 pacientes com VHB e não teve grupo controle.

Um estudo realizado no Japão em pacientes com CHC e VHC apresentou uma frequência genotípica de 16% para o genótipo tipo selvagem TT 51% para o heterozigoto TG e 33% dos casos para o genótipo polimórfico GG¹⁴. Essa investigação apresentou uma frequência para o genótipo polimórfico GG semelhante ao da nossa pesquisa (31,3%), mas a frequência do genótipo TG e a do TT foram diferentes do presente estudo sendo elas 28,4% e 40,3%, respectivamente. Salienta-se que nossa amostragem possui 82% de pacientes infectados com o VHC. Segundo a pesquisa feita no Japão, a presença do alelo G pode estar associada ao risco de desenvolver CHC.

Em estudo realizado em Taiwan, pesquisadores analisaram um grupo de 58 pacientes com CHC e 138 sem CHC. No grupo de pacientes com CHC foi encontrada uma frequência de 19% para o genótipo TT, 63,8% para o genótipo TG e 17,2% para o genótipo GG. Sendo que neste estudo os resultados no grupo sem CHC não tiveram diferenças significativas quando comparadas com a presença de CHC identificando-se uma frequência de 25,3% para o genótipo TT, 58% para TG e 16,7% para o genótipo

GG⁷. O presente estudo encontrou frequências genótípicas diferentes do estudo tailandês principalmente quanto ao genótipo GG e TT 31,3% e 40,3%, respectivamente.

Cabe ressaltar que as frequências genótípicas encontradas em nosso estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo elas semelhantes em relação ao genótipo polimórfico GG e ao selvagem TT.

No entanto, considerando a frequência com que o polimorfismo T309G no gene MDM2 ocorre nos tumores humanos (5% a 10%), e comparando com a frequência do genótipo polimórfico GG encontrada neste estudo, observamos que o resultado foi relativamente elevado, uma vez que apresentou frequência de 31,3%.

Em estudo de revisão sistemática realizado em 2010, pesquisadores buscaram evidências entre possível associação deste polimorfismo no gene MDM2 e o Carcinoma Hepatocelular, e concluíram que o polimorfismo SNP T309G no gene em estudo apresentou evidências moderadas de associação com o desenvolvimento de CHC, merecendo, assim, mais estudos aprofundados no que diz respeito à biologia molecular do CHC e do gene MDM2¹⁵.

Pesquisadores chineses avaliaram o envolvimento deste mesmo polimorfismo com a susceptibilidade de desenvolver Carcinoma Hepatocelular em pacientes chineses com vírus da hepatite B, incluindo no estudo 310 pacientes com CHC e vírus da hepatite B, 314 pacientes controle sem CHC e com VHB e 480 pacientes sem CHC e sem VHB. Tal pesquisa concluiu que os resultados encontrados sugerem que o polimorfismo no gene MDM2 pode influenciar o risco de desenvolver CHC em pacientes com VHB na população chinesa¹⁶.

Por fim, salienta-se que, na bibliografia pesquisada, não foram encontradas publicações de trabalhos brasileiros que tratassem do polimorfismo T309G no gene

MDM2 em pacientes com CHC. Sendo assim, não foi possível uma comparação com dados encontrados em pesquisas brasileiras. Além disso, a ausência de um grupo controle sem Carcinoma Hepatocelular impediu a comparação entre os resultados das frequências genotípicas e alélicas com as que encontramos no grupo em estudo com CHC.

CONCLUSÃO

Na pesquisa feita por nosso grupo, a análise do polimorfismo T309G no gene MDM2 em pacientes com CHC não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas, assim como na frequência dos alelos, não sendo, portanto, viável avaliar se existe envolvimento do polimorfismo com o Carcinoma Hepatocelular. Da mesma forma, não foi possível encontrar diferença nas frequências genotípicas em relação à etiologia e ao gênero nas amostras estudadas.

Levando em consideração a frequência com que o polimorfismo T309G no gene MDM2 ocorre nos tumores humanos (5% a 10%), e comparando com a frequência de 31,3% encontrada para o genótipo polimórfico GG neste estudo, observamos que o nosso resultado foi relativamente elevado.

Sendo assim, são necessárias maiores investigações frente às diferentes populações, etiologias e fatores de risco associados ao CHC em relação ao polimorfismo T309G do gene MDM2.

FONTE FINACIADORA

Este trabalho foi apoiado e financiado pela CAPES e Proap.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Liovet JM, Bruix J. Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698 – 711.
- ² Farazi PA, Depinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature* September 2006, Vol. 6.
- ³ Silva M, Moya A, Berenguer M, et al. Expanded Criteria for Liver Transplantation in Patients with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Liver transplantation* 14:1449-1460, 2008.
- ⁴ Masatsugu Y, Kiyohiro H, Hidetaka E, et al. Prognosis in patients with hepatocellular carcinoma correlates to mutations of p53 and/or hMSH2 genes. *European Journal of Cancer* 43 (2007) 1092-1100.
- ⁵ Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 39.
- ⁶ Michael D, Oren M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13 (2003) 49–58.
- ⁷ Leu JD, Lin I, Sun YF, et al. Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population. *World J Gastroenterol* 2009 November 28; 15(44): 5592-5597.
- ⁸ Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 295.
- ⁹ Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. Volume 113. Issue 1, April 2009. Pages 109-114.
- ¹⁰ Momad J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242 (2000) 15–29.
- ¹¹ Guo-Yuan L, De-ke J, Su-Qin S, et al. MDM2 SNP309TOG Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Risk: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research* 42 (2011) 149 – 155.
- ¹² Ezzikouri S, Abdellah EEF, Afifi R, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: A case–control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev* (2009), doi:10.1016/j.cdp.2009.01.003.
- ¹³ Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, et al. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*. vol. 29, n° 6, pp.1192–1196, 2008.

¹⁴ Dharel N, Kato N, Muroyama R, et al. MDM2 Promoter SNP309 Is Associated with the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (16) August 15, 2006.

¹⁵ Jin F, Xiong WJ, Jing JC, et al. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol* (2011) 137:1095–1104.

¹⁶ Wang X, Zhang X, Qiu B, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism increases susceptibility to hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in a northeast Han Chinese population. *Liver International* ISSN 1478-3223, 2012.

6-CONCLUSÕES

Este estudo avaliou pacientes com CHC e o polimorfismo T309G no gene MDM2 e as frequências genóticas encontradas foram de 40,3% para o genótipo TT; 28,4% para o genótipo TG e 31,4% para o genótipo GG.

A frequência alélica foi de 54,5% para o alelo T e de 45,5% para o alelo G.

Quando avaliada a etiologia e o polimorfismo T309G no gene MDM2 não foi possível encontrar diferenças estatísticas

Não encontramos diferenças na distribuição das frequências relacionada com o gênero.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número de casos de Carcinoma Hepatocelular cresce mundialmente, chegando a ocupar a 5ª posição dentre os diferentes tipos de neoplasias. Pesquisadores de vários países buscam novas ferramentas para auxiliar no prognóstico de pacientes com CHC, sendo necessário, por essa razão, elucidar a patogênese molecular desse tipo de carcinoma.

Em vista disso, estão sendo desenvolvidos estudos sobre o envolvimento de polimorfismo SNP 309 com a troca do nucleotídeo T pelo G no gene MDM2 (SNP T309G) e o Carcinoma Hepatocelular, a fim de verificar se existe associação entre a presença do alelo G a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de CHC.

Desse modo, o presente estudo buscou avaliar a associação entre o SNP T309G no gene MDM2 e o carcinoma hepatocelular. Diante dos dados até então publicados, o pequeno número amostral das diferentes etiologias aqui estudadas e a falta de um grupo controle, tornam-se necessários estudos mais detalhados sobre esse polimorfismo, visando esclarecer tal envolvimento com CHC. Com isso será possível disponibilizarmos de mais uma ferramenta para a avaliação de prognóstico e para um tratamento mais eficaz dos pacientes.

SCIENTIFIC ARTICLES

ANALYSIS OF THE INVOLVEMENT OF T309G SNP IN THE MDM2 GENE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Andréa Gomes Coelho Izaguirre¹, Paulo Roberto Ott Fontes², Ângelo Mattos³, Antonio Atalibio Hartmann⁴, Thadeu Czerski⁵, Néelson Alexandre Kretzmann⁶

1 Graduate Program in Medicine: Hepatology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

2 Professor of Surgery, MD, PhD, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA. Head of Department of Surgery UFCSPA, Head Liver Transplantation Unit UFCSPA, Santa Casa of Porto Alegre - ISCMPA, Brazil.

3 Professor of Graduate Program in Medicine: Hepatology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

4 Professor of Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

5 Department of Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

6 Professor of Post Graduation Program in medicine: Hepatology, Federal University of Health Sciences de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Hepatocellular Carcinoma is the fifth most common type of neoplasia worldwide. The presence of the T309G polymorphism in the MDM2 gene (rs2279744) may be a risk factor for the development of this carcinoma. This gene is a negative regulator of the p53 protein and T309G polymorphism in the MDM2 gene can block or decrease the activity of p53 and may increase the occurrence of Hepatocellular Carcinoma. **OBJECTIVE:** To evaluate the involvement of the SNP T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma of different etiologies, the hospital complex Santa Casa de Porto Alegre. **METHODS:** We studied 67 patients with a diagnosis of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in the period 2000-2009. Polymorphism in the MDM2 gene was determined by the TaqMan-based real-time, allele-specific PCR assay. **RESULTS:** Regarding gender, 56 (83.6%) were male and 11 (16.4%) were female and the average age was 60.6 years (± 8.8), with a minimum age of 37 and maximum of 85 years. Regarding etiology of Hepatocellular Carcinoma, we observed that 31 cases (46.3%) were related to infection by hepatitis C virus (HCV), followed by infections by the hepatitis C virus + alcohol, totaling 24 cases (35.8%), as well as by alcohol consumption, shown in 4 cases (6%), and the presence of hepatitis B virus (HBV), occurring in 4 cases (6%). Other factors (HBV + HCV, cirrhosis + alcohol) were detected in 4 cases (6%). Liver transplantation was performed in 48 cases (71.6%) and hepatectomy in 19 (28.4%). Genotype frequencies were 40.3% for TT, 28.4% for TG, and 31.3% for GG. Allele frequency was 54.5% for the T allele and 45.5% for G allele. **CONCLUSION:** The analysis of T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with HCC showed no significant differences in genotype and allele frequencies, and it was not feasible to determine in this series any involvement of polymorphism with Hepatocellular Carcinoma.

Keywords: Carcinoma Hepatocellular. Polymorphism in MDM2 gene. P53 gene.

INTRODUCTION

Hepatocellular Carcinoma is the fifth most common type of neoplasia worldwide, with more than half a million new cases annually and is the leading cause of death among cirrhotic patients. Chronic infection with hepatitis B virus is the predominant risk factor for HCC in Southeast Asia and Africa and chronic infection with hepatitis C virus is the predominant risk factor for HCC in Western countries and Japan¹. The factors of most prominence associated with Hepatocellular Carcinoma include chronic hepatitis by B virus and C virus, alcohol consumption, and aflatoxin B1. Other etiologic factors have also been proposed to lead to HCC, although less frequently. In addition, gender can also influence the risk and prognosis of HCC, which is four times higher in men than in women. In Brazil, up to 90% of cases of HCC are associated with cirrhosis, major causes being chronic infections with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), chronic alcohol abuse, and hereditary hemochromatosis²⁻³.

Changes in DNA bases, as well as in repair mechanisms and genes involved in microsatellite instability (MSI), are also found in HCC, especially when associated with HCV. As a result, genetic alterations involved in some of the multiple stages of carcinogenesis have been studied in recent years⁴.

The P53 gene, considered the guardian of the genome, among all those known to be involved in the processes of carcinogenesis, is of utmost importance. The p53 protein plays a central role in the regulation of various signaling pathways that control cellular responses to DNA damage caused by various agents such as ultraviolet light, ionizing radiation, and chemical carcinogens. This 53-kilodalton protein is a

transcriptional regulator induced in response to DNA damage and can lead to stoppage of the cell cycle or induce apoptosis⁵⁻⁶.

The MDM2 protein is a direct negative regulator to the tumor suppressor protein p53, which is involved in 50% of human cancers⁷. The MDM2 gene encodes a protein of the same name (MDM2 protein), which is capable of binding to the N-terminus of the p53 protein, thereby blocking the transcriptional activity of p53⁸. Studies conducted in mice have shown that overexpression of MDM2 is capable of generating tumors. This overexpression is also associated with reduced survival and is a useful predictive factor of poor prognosis in cases of HCC⁷.

The polymorphism located in the first intron of the MDM2 gene (SNP309), with T>G change results in increased levels of the MDM2 protein and reduces the activity of the p53 protein. Since the MDM2 gene and the P53 protein are central components of maintaining the genome, polymorphism (SNP309) may be involved in the development of HCC⁹. Studies suggest that T309G polymorphism in the MDM2 gene is associated with increased risk and with the early age of onset of a number of human cancers¹⁰.

Studies of meta-analysis conducted recently included works in Turkey, Morocco, Japan and Korea, totaling 738 cases with Hepatocellular Carcinoma and 1014 negative controls without HCC, in a period from 2006 to 2010. Aiming to evaluate the involvement of polymorphism SNP T309G in MDM2 gene,, research has concluded that there is significant involvement of this polymorphism with the risk of developing the Hepatocellular Carcinoma and the polymorphic allele G acts as an important risk factor and that the polymorphic allele G acts as an important risk factor for the development of HCC¹¹.

Seeking to better understand the molecular biology of HCC as an auxiliary tool in the analysis from the perspective of tumor recurrence and from the perspective of patient cure, this study sought to evaluate the involvement of T309G SNP in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma with different etiologies and attended services in the Santa Casa de Porto Alegre, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

OBJECTIVE

The objective this study was evaluate the involvement of the SNP T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma of different etiologies in the state of Rio Grande do Sul.

METHODOLOGY

Study population

The study sample consisted of patients with HCC diagnosed by pathological examination. The samples were obtained from tissue in paraffin block, in the period 2000-2009. The study patients underwent hepatectomy or liver transplantation at the Hospital Complex of Santa Casa of Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

In total, 124 cases were identified with diagnosed HCC. Of these, 32 samples were not used because, in 8 samples, the tissue in paraffin blocks had insufficient material for analysis and 24 samples showed excess necrosis. Therefore, a total of 92 samples remained in the study.

This study chose not to have the negative control group due to the difficulty of obtaining a large number of samples without Hepatocellular Carcinoma, in addition the main focus of our study was to Genotyping of the polymorphism in MDM2.

In order to maintain the patients' confidentiality, all cases were encoded with the HCC initials followed by sample number and the work database was organized based on the patients' records.

Sample preparation

The paraffin samples of tumor tissue were cut into pieces of 4 μ m, using the microtome and appropriate sterile (EasyPath) razors. This material was stored in 1.5ml tubes and kept at minus 20°C until the time of DNA extraction.

DNA extraction

The samples were deparaffinized with xylene and ethanol. We performed a cleaning with xylene by shaking for 15 seconds and two washes with ethanol also for 15 seconds each. The two washes were then centrifuged at 13,000rpm for 6 minutes. After centrifugation of the washes, proteinase K (20mg/ml) was added to the sample, along with a lysis buffer and DNA remained in a water bath at 60°C overnight to potentiate the effect of enzymatic digestion. On the next day, the DNA was extracted using the Bioneer Extraction Kit (Bionner Corporation, USA). The entire process of DNA extraction was performed as indicated by the manufacturer.

The integrity and quantity of DNA per sample were analyzed in the apparatus NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). The DNA from each sample was extracted, quantified and stored at -20°C.

Genotyping

For molecular identification of the T309G polymorphism in the MDM2 gene (rs 2279744) we used the TaqMan-based real-time, allele-specific PCR assay in the StepOnePlus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA).

In the TaqMan assay, we used a pair of primer in order to identify the DNA sequence containing the polymorphism, which was as follows: Forward 5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3' and Reverse: 5'-ACAGGCACCTGCGATCATC-3'. Two probes were used, one to identify the allele with polymorphism and the other for the allele without the polymorphism, as follows: VIC-5'-CTCCCGCGCCGAAG-3' and the probe FAM-5'-TCCCGCGCCGAG-3' (primers and probes of Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as mean, standard deviation and the categories were described by absolute and relative frequencies. To compare means between groups, the t-student test for independent samples or analysis of variance (ANOVA) were applied one way.

In the comparison of proportions, the chi-squared test or Fisher's exact test were applied.

The level of significance was set at 5% ($p \leq 0,05$) and the analyses were performed using the program SPSS version 18.0.

RESULTS

We selected 92 samples for the study. In 11, we were not successful in extracting DNA samples and, in 14, we were unable to achieve amplification by allele-specific PCR reaction, totaling the data analysis of 67 patients.

We analyzed 67 samples from patients with Hepatocellular Carcinoma, in which 56 patients (83.6%) were male and 11 (16.4%) were female. The average age accounted for 60.6 years (± 8.8), with a minimum age of 37 years and maximum age of 85 years.

The etiology of HCC was related to infection with HCV in 31 cases (46.3%), followed by infection with HCV + alcohol in 24 cases (35.7%), alcohol intake in 4 cases (6%), HBV in 4 cases (6%), and other causes also identified in 4 cases (6%). Liver transplantation was performed in 48 patients (71.6%) and hepatectomy in 19 patients (28.4%). These data are shown in Table 1.

Table 1 – Characteristics of the study group.

Variables	n=67
Gender- n(%)	
Male	56 (83.6)
Female	11 (16.4)
Age (years) – mean \pm DP	60.6 \pm 8.8
Etiology – n (%)	
HCV	31 (46.3)
HCV + Alcohol	24 (35.7)
Alcohol	4 (6.0)
HBV	4 (6.0)
HBV + Alcohol	1 (1.5)
HCV + HBV	1 (1.5)
Others	2(3.0)
Procedure – n (%)	
Transplantation	48 (71.6)
Hepatectomy	19 (28.4)

Distribution of genotypes and alleles of the T309G polymorphism in the MDM2 gene

The distribution of genotypes for the T309G polymorphism in the sample of 67 patients with HCC was 27 patients (40.3%) for the wild-type homozygous TT genotype, 19 patients (28.4%) for the TG heterozygous genotype and 21 patients (31.3%) for the GG polymorphic homozygous genotype. In the calculation of the allele frequency for the T allele, we found 36 patients (54.5%) and, for the G polymorphic variant, 31 patients (45.5%).

Association between gender and genotype

Regarding gender distribution, it was observed that 56 patients (83.6%) were male and 11 patients (16.4%) were female, with $p=0.107$. Of these, the TT genotype was present in 24 male patients (88.9%) and 3 female patients (11.1%). When evaluating the TG genotype, we found 13 male patients (68.4%) and 6 female patients (31.6%), while the polymorphic GG genotype was present in 19 male patients (90.5%) and 2 female patients (9.5%).

Association of etiology with the genotypes

Of the 27 patients (40.3%) with the TT genotype, 13 patients (48.1%) showed HCV, 5 patients (18.5%) showed HCV + alcohol, and 4 patients (14.8%) showed only alcohol consumption. In the presence of HBV, the TT genotype was present in 2 patients (7.5%), 1 patient (3.7%) when associated HBV + alcohol, and again 1 patient (3.7%) when associated HBV + HCV. We also found 1 patient (3.7%) with other etiologies.

Of the 19 patients (28.4%) with the TG genotype, 9 patients (47.4%) showed HCV, 9 patients (47.4%) showed HCV + alcohol, and 1 patient (5.2%) showed HBV.

The TG genotype was not found when associated with HBV + HCV, HBV + alcohol, and other etiologies (Table 2).

The polymorphic GG genotype present in 21 patients (31.3%) showed 9 patients (42.8%) with HCV, 10 patients (47.6%) with HCV + alcohol, and 1 patient (4.8%) HBV (Table 2). This genotype was not observed in patients who had alcohol, HBV + HCV and HBV + alcohol as etiologies. In other etiologies, we observed 1 patient (4.8%).

Table 2 – Association of etiology with the genotype.

ETIOLOGY	FREQUENCY	TT GENOTYPE (n=27)	TG GENOTYPE (n=19)	GG GENOTYPE (n=21)	P*
	(%)	n (%)	n (%)	n(%)	0.504
HCV	31 (46.3%)	13 (48.1%)	9 (47.4%)	9 (42.8%)	
HCV + ALCOHOL	24 (35.7%)	5 (18.5%)	9 (47.4%)	10 (47.6%)	
HBV	4 (6.0%)	2 (7.5%)	1 (5.2%)	1 (4.8%)	
ALCOHOL	4 (6.0%)	4 (14.8%)	-	-	
HBV + HCV	1 (1.5%)	1 (3.7%)	-	-	
HBV + ALCOHOL	1 (1.5%)	1 (3.7%)	-	-	
OTHER	2 (3.0%)	1 (3.7%)	-	1 (4.8%)	

HCV: hepatitis virus C; HBV: hepatitis virus B. Other: cirrhosis + HBV, cirrhosis + HCV.

* Pearson's chi-squared test.

DISCUSSION

The MDM2 gene plays an important role as a negative regulator of the p53 protein and the presence of T309G polymorphism results in increased levels of the MDM2 protein, thus reducing the activity of p53 protein. Thus, since the MDM2 gene and the p53 protein are central components of the maintenance of the genome, this polymorphism could be involved in the development of HCC in the same way as in other types of neoplasm⁷⁻⁹.

In a study that evaluated the polymorphic frequency SNP T309 G in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma in the population of Morocco, wild-type homozygous TT genotype was present in 40.62% of cases, the heterozygous TG genotype was identified in 47.92% cases, and the polymorphic GG genotype was identified in 11.46%. The same study compared patients with and without Hepatocellular Carcinoma and found that the polymorphic GG genotype had a higher prevalence of HCC (11.6% in patients with HCC versus 5.85% in patients without HCC)¹².

When comparing the study above to our research, we observe differences in genotype frequencies especially with regard to the GG genotype, which was 31.3% in our study. Regarding the TT genotype, similar frequencies were found.

After comparing the study group with the control group, the above study concluded that the presence of the GG genotype seems to be involved with HCC.

For lack of a control group in our study, it was not possible to make such a comparison.

We found no differences in the distribution of frequencies associated with gender taking into account that the distribution of HCC is more frequent in men than in women.

A study conducted in Korea investigated the involvement of the same polymorphism in the MDM2 gene in patients with Hepatocellular Carcinoma and HBV, with genotype frequency of 15.7% for the wild-type TT genotype, 43.5% for heterozygous TG, and 40.3% for polymorphic GG. The same study also compared genotype frequency in samples without Hepatocellular Carcinoma and identified a frequency of 28% for the wild-type TT genotype, 44.6% for the TG genotype, and

27.4% for the polymorphic GG genotype¹³. These data show the importance of knowing genotype frequency in different populations likely to develop HCC. This study found different frequencies, mainly for the TT genotype, which was higher (40.3%), and the TG genotype, which was lower (28.4%), regardless of the etiology. This fact may be associated with the study group researched in Korea, which included only HBV as an etiology and the sample size being a total of 583 cases (287 with HCC and 296 without HCC). Our study had only 67 patients with different etiologies and only 4 patients with HBV.

Another study conducted in Japan in patients with HCC and HCV showed a genotype frequency of 16% for the wild-type TT genotype, 51% for heterozygous TG, and 33% of cases for the polymorphic GG genotype¹⁴. This investigation showed a frequency for the polymorphic GG genotype similar to that of our research (31.3%) but the frequency of the TT and TG genotypes were different from this study, reaching 28.4% and 40.3%, respectively. It is noted that our sample contains 82% of patients infected with HCV. According to the research conducted in Japan, the presence of the G allele may be associated with risk of developing HCC.

A study conducted in Taiwan, researchers analyzed a group of 58 patients with HCC and 138 without HCC. The group of patients with HCC showed a frequency of 19% for the TT genotype, 63.8% for the TG genotype, and 17.2% for the GG genotype. In this study, the results in the group without HCC had no significant differences when compared to the presence of HCC, with a frequency of 25.3% for the TT genotype, 58% for TG, and 16.7% for the GG genotype⁷. This study found genotypic frequencies that differed from the Thai study mainly as regards the GG and TT genotypes, at 31.3% and 40.3%, respectively.

It should be noted that the genotype frequencies found in our study showed no statistically significant differences and were similar in relation to the GG polymorphic and TT wild genotypes.

However, considering the frequency with which T309G polymorphism in MDM2 gene occurs in human tumors (5-10%), and comparing the frequency of the GG polymorphic genotype in this study, we observed that the result was relatively high as it presented a frequency of 31.3%.

In a study of a systematic review conducted in 2010, researchers sought evidence possible association between this polymorphism in MDM2 gene and Hepatocellular Carcinoma and they concluded that the polymorphism SNP T309G in the studied gene showed to showed moderate evidences association with the development of HCC, deserving thus more thorough studies regarding the molecular biology of HCC and of the MDM2 gene¹⁵.

Chinese researchers evaluated the involvement of this same polymorphism with susceptibility of developing hepatocellular carcinoma in Chinese patients with Hepatitis Virus B, including the study 310 patients with HCC and Hepatitis Virus B, 314 control patients without HCC with HBV positive and 480 patients without HCC without HBV. This research concluded that the results suggest that the MDM2 gene polymorphism may influence the risk of developing HCC in patients with HBV in the Chinese population¹⁶.

Finally, it is noted, in that the literature surveyed, we found no publications of Brazilian studies that addressed T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with HCC. Therefore, it was not possible to perform a comparison with data found in Brazilian research. In addition, the absence of a control group without Hepatocellular

Carcinoma prevented the comparison between the results of the genotypic and allelic frequencies with those found in the study group with HCC.

CONCLUSION

In the research conducted by our group, the analysis of T309G polymorphism in the MDM2 gene in patients with HCC showed no statistically significant differences in genotype frequencies, as well as in the frequency of alleles. It was not, therefore, not feasible to assess whether there is involvement of polymorphism with Hepatocellular Carcinoma. Similarly, we could not find differences in genotype frequencies in relation to etiology and gender in the samples studied.

Considering the frequency of the polymorphism T309G in MDM2 gene to occurs in human tumors (5% to 10%), and comparing the frequency of 31.3% found for the GG genotype polymorphic in this study, we found that our results were relatively high.

Therefore, further research is necessary in the face of different populations, etiologies and risk factors associated with HCC in relation to T309G polymorphism of the MDM2 gene.

ABBREVIATIONS

SNP: single nucleotide polymorphism (SNP).

HCC: Hepatocellular Carcinoma.

VHC: Hepatitis C virus.

VHB: Hepatitis B virus

REFERENCES

- ¹ Liovet JM, Bruix J. Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698 – 711.
- ² Farazi PA, Depinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature* September 2006, Vol. 6.
- ³ Silva M, Moya A, Berenguer M, et al. Expanded Criteria for Liver Transplantation in Patients with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Liver transplantation* 14:1449-1460, 2008.
- ⁴ Masatsugu Y, Kiyohiro H, Hidetaka E, et al. Prognosis in patients with hepatocellular carcinoma correlates to mutations of p53 and/or hMSH2 genes. *European Journal of Cancer* 43 (2007) 1092-1100.
- ⁵ Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 39.
- ⁶ Michael D, Oren M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13 (2003) 49–58.
- ⁷ Leu JD, Lin I, Sun YF, et al. Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population. *World J Gastroenterol* 2009 November 28; 15(44): 5592-5597.
- ⁸ Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 295.
- ⁹ Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. Volume 113. Issue 1, April 2009. Pages 109-114.
- ¹⁰ Momad J, WU HH, Dasgupta G. MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242 (2000) 15–29.
- ¹¹ Guo-Yuan L, De-ke J, Su-Qin S, et al. MDM2 SNP309TOG Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Risk: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research* 42 (2011) 149 – 155.
- ¹² Ezzikouri S, Abdellah EEF, Afifi R, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: A case–control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev* (2009), doi:10.1016/j.cdp.2009.01.003.
- ¹³ Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, et al. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*. vol. 29, n° 6, pp.1192–1196, 2008.
- ¹⁴ Dharel N, Kato N, Muroyama R, et al. MDM2 Promoter SNP309 Is Associated with the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (16) August 15, 2006.
- ¹⁵ Jin F, Xiong WJ, Jing JC, et al. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol* (2011) 137:1095–1104.
- ¹⁶ Wang X, Zhang X, Qiu B, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism increases susceptibility to hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in a northeast Han Chinese population. *Liver International* ISSN 1478-3223, 2012.

