



Análise de variantes funcionais em genes de miRNAs reguladores da via de p53: potenciais modificadores de fenótipo em portadores da mutação fundadora *TP53* p.(Arg337His)?

Eduarda Heidrich Pezzi^{1,2}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

INTRODUÇÃO

A **Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)** é uma doença autossômica dominante causada por mutações germinativas no gene *TP53* e caracterizada pela predisposição a múltiplos tumores em idade jovem. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, cerca de **1:300** recém-nascidos vivos apresentam a **mutação fundadora *TP53* p.(Arg337His)**. Poucos estudos até o momento investigaram o papel de variantes em genes de miRNAs que regulam a via da proteína p53 (codificada pelo gene *TP53*) como potenciais modificadores de fenótipo em pacientes SLF portadores desta mutação específica. Neste contexto, uma família de miRNAs, **miR-34**, é amplamente conhecida como reguladora positiva da expressão de p53. Recentemente, variantes funcionais localizadas em genes de miRNAs dessa família, **pre-miR-34a rs72631823** e **pri-miR-34b/c rs4938723**, tem sido associadas com risco aumentado para vários tipos de tumores.

OBJETIVOS

- ❖ Determinar a frequência das variantes funcionais **rs72631823(G>A)** e **rs4938723 (T>C)** em pacientes SLF portadores da mutação *TP53* p.(Arg337His) provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil;
- ❖ Avaliar se existe **efeito modificador de fenótipo** dessas variantes no mesmo grupo de pacientes.

PACIENTES E MÉTODOS

- ❖ **Grupo de estudo:** em uma análise preliminar, foram incluídas amostras de DNA de 169 pacientes SLF portadores da mutação *TP53* p.(Arg337His), dos quais 82 apresentavam diagnóstico prévio de câncer.
- ❖ **Genotipagem e Análises estatísticas:** a genotipagem foi realizada por PCR em Tempo Real utilizando o sistema de discriminação alélica TaqMan®. As análises estatísticas foram conduzidas no software SPSS v.18.0.

- ❖ Recentemente, **pre-miR-34a rs72631823[A]** foi associado com suscetibilidade para câncer de mama triplo-negativo em uma população europeia, sendo encontrado inclusive em homozigose. Além disso, uma análise evolutiva acerca das variações de sequência germinativas no gene *MIR34A* sugeriu previamente que as mesmas estão sujeitas a uma forte seleção purificadora (negativa) → **Hipótese:** a coocorrência tanto de mutações patogênicas em *TP53* quanto do alelo rs72631823[A] seria incompatível com a vida, o que explicaria o padrão monomórfico observado na nossa amostra (todos com genótipo GG).

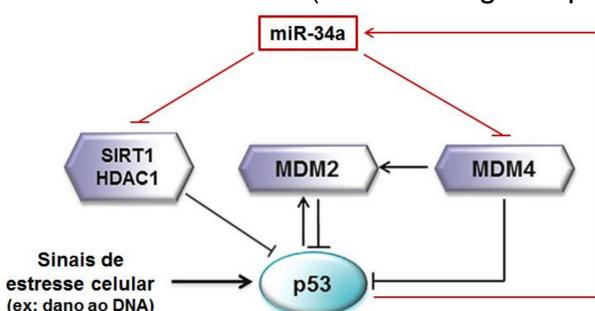


Figura 1. Via de sinalização de p53 e a regulação indireta exercida por miR-34a.

- ❖ O alelo **rs4938723[C]** pode aumentar a afinidade de ligação do fator de transcrição GATA-X na região promotora do transcrito **pri-miR-34b/c** → **Hipótese:** portadores desse alelo em homozigose identificados na nossa série de casos (**Tabela 2**) apresentariam níveis maiores de expressão de miR-34b/c e, consequentemente, da proteína p53, tornando-o um genótipo de proteção para ocorrência de câncer (**Tabela 3**) em casos positivos para a mutação p.(Arg337His).

RESULTADOS

Curiosamente, o **alelo variante rs72631823[A] não foi identificado em nenhum paciente da amostra analisada**. Conforme mostra a **Tabela 1**, este alelo tem sido reportado em uma frequência muito baixa (<0,2%) em bancos de dados populacionais, incluindo uma coorte de idosos da região Sudeste do Brasil (ABraOM).

Tabela 1. Descrições da frequência do SNP rs72631823 até o momento.

Bancos de dados populacionais e estudos recentes	Número amostral (n)	Frequência do alelo variante rs72631823[A]
Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) ^{a,b}	609	0,0008
Genome Aggregation Database (gnomAD, frequência global) ^{a,c}	141.239	0,00015
Genome Aggregation Database (gnomAD, frequência na população africana) ^{a,c}	12.459	0,00177
Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMED) ^{a,d}	62.784	0,00039
Exome Aggregation Consortium (ExAC) ^{a,e}	60.457	0,00013
NHLBI GO Exome Sequencing Project (GO-ESP) ^{a,f}	5.150	0,0005
1000 Genomas (1000G) ^g	2.504	0,001
Controles saudáveis (Kalapanida <i>et al.</i> , 2018) ^{g,h}	124	0,0685
Casos de câncer de mama triplo-negativo (Kalapanida <i>et al.</i> , 2018) ^g	114	0,175

^a Bancos de dados populacionais; ^b Coorte de idosos saudáveis provenientes da região Sudeste do Brasil; ^c Dados de exoma e genoma completo de indivíduos não aparentados de diferentes populações; ^d Dados de genoma completo de indivíduos de diferentes etnias; ^e Dados de exoma obtidos a partir de diferentes populações; ^f Dados de exoma de uma coorte de indivíduos saudáveis dos Estados Unidos; ^g Estudo caso-controle realizado em uma população europeia (PMID: 30651924); ^h Mulheres assintomáticas sem história pessoal de câncer de mama selecionadas a partir de um rastreamento mamográfico.

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas do SNP funcional **pri-miR-34b/c rs4938723 (T>C)** em pacientes SLF portadores da mutação *TP53* p.(Arg337His).

Genótipo do SNP	N (%)
rs4938723 (T>C)	n=169
TT	62 (36,7%)
TC	94 (55,62%)
CC	13 (7,69%)
TC+CC	107 (63,3%)
Frequência alélica	
C	0,36

Tabela 3. Frequências genotípicas do SNP **rs4938723** de acordo com a história pessoal de câncer observada em portadores da mutação *TP53* p.(Arg337His).

Genótipo	Com câncer, n (%)	Sem câncer, n (%)	p
SNP rs4938723 (T>C)			
TT	35 (42,7)	27 (31,0)	
TC	45 (54,9)	49 (56,4)	0,024 ^a
CC	2 (2,4)	11 (12,6)	

^a Teste Exato de Fisher.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

- ❖ Recentemente, **pre-miR-34a rs72631823[A]** foi associado com suscetibilidade para câncer de mama triplo-negativo em uma população europeia, sendo encontrado inclusive em homozigose. Além disso, uma análise evolutiva acerca das variações de sequência germinativas no gene *MIR34A* sugeriu previamente que as mesmas estão sujeitas a uma forte seleção purificadora (negativa) → **Hipótese:** a coocorrência tanto de mutações patogênicas em *TP53* quanto do alelo rs72631823[A] seria incompatível com a vida, o que explicaria o padrão monomórfico observado na nossa amostra (todos com genótipo GG).

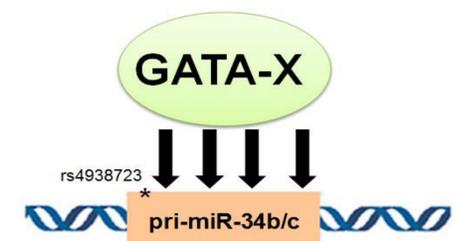


Figura 2. Mecanismo funcional associado com o SNP pri-miR-34b/c rs4938723 (T>C), mostrando que a presença do alelo C aumenta a afinidade do fator GATA-X, o que por sua vez aumenta a expressão desses miRNAs.

- ❖ Esse é o **primeiro estudo** a investigar a presença dessas **variantes de miR-34a e miR-34b/c em uma coorte de pacientes SLF**. Estudos funcionais e em um número maior de famílias SLF serão necessários para corroborar as nossas hipóteses.