Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia - Nível Mestrado
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA NO CÓDON 72 DO GENE HUMANO *P53* E AS CARACTERÍSTICAS DE PIGMENTAÇÃO

KÁRITA ANTUNES COSTA

Goiânia • 2010

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Pós-Graduação em Biologia
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA NO CÓDON 72 DO GENE HUMANO *P53* E AS CARACTERÍSTICAS DE PIGMENTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biologia – Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientanda: Kárita Antunes Costa.

Orientadora: Dra. Lídia Andreu Guillo.

© Kárita Antunes Costa, 2010
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

DEDICATORIA

Dedico aos meus pais, fonte de inspiração e sabedoria. Obrigada pelo incentivo e paciência ao me ensinar que tudo vale à pena quando nos esforçamos, confiamos em Deus e não ficamos paralisados diante dos obstáculos.

Para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado, contamos com o apoio indispensável das seguintes instituições: ***Instituto Goiano de Hematologia (INGOH), Universidade Federal de Goiás (UFG), Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular*** *do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás****.*** *A mestranda ainda contou com o auxilio do programa de pós – graduação em Biologia e nos últimos quatro meses, a mestranda contou com o auxilio por meio de uma bolsa de estudos da* ***Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*** *(CAPES).*

EMBORA A SECA SEQUE AS FONTES E OS RIOS E OS CAMPOS FIQUEM ESTURRICADOS, E O GADO MORRA DE SEDE E FOME; E AS QUEIMADAS DEVOREM OS PASTOS E OS MACHADOS TRANSFORMEM FLORESTAS VERDES EM DESERTOS ÁRIDOS, E OS PALÁCIOS ESTEJAM CHEIOS DE CORRUPTOS – A DESPEITO DISSO MINHA ALEGRIA CONTINUARÁ A FLORIR E FAREI POEMAS DIANTE DO IMPOSSÍVEL.

Habacuque 3:17-18. Paráfrase.

AGRADECIMENTOS

"A gratidão é o único tesouro dos humildes."
(William Shakespeare)

*Agradeço primeiramente a **Deus**, meu norte, força divina responsável por todas minhas conquistas.*

Agradeço as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesta pesquisa. Desde já peço desculpas às pessoas que não foram citadas, não por desmerecimento, mas pelo fato de existirem um número grande de pessoas que contribuíram com meu trabalho.

*Agradeço incansavelmente aos meus pais **Fábio Ferreira da Costa** e **Maria Jacinta Antunes**, sempre acreditaram em mim, oferecendo palavras constantes de incentivo e força desempenhando uma função importantíssima na formação do meu caráter. Aos meus irmãos **Fabio Ferreira da Costa Junior** e **Delane Maria Antunes Costa** por estar sempre ao meu lado me dando força e sendo responsáveis por colocar mais alegria em meus dias.*

*A minha orientadora, Dra. **Lidia Andreu Guillo,** competente amiga conselheira, brava nas horas necessárias, um exemplo de mulher a quem devo seguir. Ela me ofereceu a chance na realização de um sonho e terá sempre meu eterno respeito. Mais uma vez muito obrigada!*

*A equipe do Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular, (**Débora Cristina Silva dos Passos, Érica Regina Leal de Freitas, Fernanda França de Souza, Ludimila Rispoli, Iara Lúcia, Mariana Martins Gomes e Zenilda Pateis de França**), minha eterna família. Obrigada pela amizade sincera, constante alegria, auxilio, prontidão para o trabalho, opiniões indispensáveis e paciência no auxilio.*

*A minha super companheira e estagiária **Ana Carina Bastos**, muito obrigada pelo auxilio indispensável, companheirismo e amizade.*

*Ao meu eterno mestre Dr. **Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva**, pessoa que conquistou meu respeito tanto no campo profissional como pessoal e eterna gratidão por me mostrar que posso ser melhor a cada dia e me convenceu de que a vida pode ser repleta de sonhos realizados quando focamos no trabalho, na honestidade e na dedicação.*

*A equipe do laboratório do professor Dr. **Cirano José Ulhoa** (Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás), sempre me auxiliando*

quando necessário, em especial ao aluno ***Saulo José Linhares Siqueira,*** *pela paciência, dedicação e companheirismo.*

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular da UFG sob a coordenação da Professora Dra. ***Célia Maria de Almeida Soares,*** *muito obrigada pelo apoio e sugestões valiosas.*

A equipe do ***Instituto Goiano de Hematologia (INGOH)****, que me auxiliaram na pesquisa sendo responsável por todas minhas coletas sanguíneas, o meu eterno obrigada a* ***Ana Paula Akagawa Parente*** *(Supervisora Geral do Banco de Sangue e Garantia de Qualidade****),*** *responsável por minhas coletas no INGOH.*

Meus agradecimentos aos professores Dra. ***Lee Chen Chen,*** *Dra.* ***Célia Maria de Almeida Soares*** *e Dra.* ***Maristela Pereira****, por terem avaliado e aprovado a proposta inicial e semifinal do projeto de pesquisa desta dissertação.*

Minha eterna gratidão a todas as pessoas que me ajudaram nessa caminhada, aos ***voluntários do INGOH*** *se dispondo de forma paciente a responder os questionários da coleta de dados.*

Agradeço a todos os professores que ministraram as disciplinas no mestrado.

A toda minha família que a todo o momento torceram por mim, sempre com conselhos precisos e muita paciência, mais uma vez muito obrigada!

AOS VOLUNTÁRIOS DO INSTITUTO GOIANO DE HEMATOLOGIA ***(INGOH)*** *POR TEREM TIDO A GENTILEZA DE DOAR SEU SANGUE PARA A CONCLUSÃO DESTE TRABALHO. DESCULPAS PELO DESCONFORTO MOMENTÂNEO E MUITO OBRIGADA. NÃO HAVERIA CONTINUIDADE NAS PESQUISAS SEM A GENTIL COLABORAÇÃO DE VOCÊS. O MELHOR ENTENDIMENTO DAS DOENÇAS DE PROGNÓSTICO OBSCURO, COMO O CÂNCER DE PELE E CONSEQUENTEMENTE A MELHORIA NA QUALIDADE DE VIDA DAS PESSOAS NÃO SERIA POSSÍVEL SEM A AJUDA DE VOCÊS. MAIS UMA VEZ MUITO OBRIGADA!*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 18

1.1. O gene humano *p53*..... 19

1.2. O polimorfismo do gene *p53* 23

1.3. A pigmentação humana..... 25

1.3.1. Melanogênese..... 25

1.3.2. Efeito da Radiação Ultravioleta (UVR) na melanogênese..... 27

1.3.3. O receptor de melanocortina MC1R..... 28

1.3.4. O papel da p53 na melanogênese 29

2. OBJETIVOS 32

2.1. Objetivo Geral..... 33

2.2. Objetivo específico..... 33

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 34

3.1. Características de Estudo..... 35

3.2. Grupo Amostral..... 35

3.3. Coleta de Sangue..... 35

3.4. Obtenção de dados: características de pigmentação e histórico de câncer..... 36

3.5. Extração de DNA..... 36

3.6. Determinação do polimorfismo por genotipagem mediante Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... 37

3.7. Analise estatístico..... 40

4. RESULTADOS..... 42

4.1. Características descritivas da população geral..... 43

4.2. Genotipagem..... 43

4.3. Análise da distribuição alélica do códon 72 do gene p53..... 52

4.3.1. Cor da pele..... 52

4.3.2. Resposta da pele à exposição solar..... 54

4.3.3. Cor do cabelo..... 55

4.3.4. Cor de olho..... 57

5. DISCUSSÃO..... 62

6. CONCLUSÃO..... 67

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 69

8. ANEXOS..... 76

8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... 77

8.2. Anexo 2: Questionário..... 80

8.3. Anexo 3: Informações sobre os *Primers* utilizados..... 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da proteína p53 e seus 393 aminoácidos, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções (domínios) diretamente associadas às complexas vias metabólicas, nas quais participa a p53 (Silva, 2009).....**20**

Figura 2. Modelo mostrando ativação da proteína p53 através da fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal (Silva, 2009).....**21**

Figura 3. Queimadura solar: eritema (Duvivier, 1995).....**28**

Figura 4. Papel da p53 na resposta a exposição ao sol (Adaptado de Nan et al. 2008).....**30**

Figura 5. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C1 ao C15), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**44**

Figura 6. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C16 ao C26), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**45**

Figura 7. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C26 ao C34), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**46**

Figura 8. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C35 ao C50), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**47**

Figura 9. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C51 ao C60), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**48**

Figura 10. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C61 ao C75), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**49**

Figura 11. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C76 ao C90), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**50**

Figura 12. Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C91 ao C100), após corrida em gel de agarose (2%), repetições de PCR e confirmação do genotipo mediante enzima de restrição (*Bst*UI).....**51**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo da quantidade de reagentes utilizados para realização da PCR.....**37**

Tabela 2. Primers para avaliação do polimorfismo e tamanho dos amplicons obtidos.....**38**

Tabela 3. Ciclagem para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....**38**

Tabela 4. Distribuição de voluntários de acordo com as variáveis analisadas.....**43**

Tabelas 5 à 12. Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados para um melhor entendimento.....**44-51**

Tabela 13. Polimorfismo do gene p53 dos 96 voluntários, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) alélica para cadapolimorfismo.....**53**

Tabela 14. Polimorfismo do gene p53 dos 96 voluntários, evidenciando os genótipos encontrados entre brancos e morenos e a freqüência (%) genotípica para cada polimorfismo.....**54**

Tabela 15. Polimorfismo do gene p53 dos 95 voluntários que responderam quanto à característica de apresentar vermelhidão ou se bronzear facilmente após exposição ao sol, evidenciando os genótipos e suas freqüências (%) para cada polimorfismo.....**55**

Tabela 16. Polimorfismo do gene p53 de 88 voluntários com cabelos castanhos/pretos, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) alélica para cada polimorfismo e relacionando com a resposta da pele após exposição solar. OR: **(**Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.....**56**

Tabela 17. Polimorfismo do gene p53 de 7 voluntários com cabelos loiros, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) alélica para cada polimorfismo e relação com a resposta da pele após exposição solar. OR: **(**Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.....**57**

Tabela 18. Polimorfismo do gene p53 de 85 voluntários com olhos castanho-pretos, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) para cada polimorfismo e relação com a resposta da pele ao sol após exposição solar. OR: **(**Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de Confiança.....**58**

Tabela 19. Polimorfismo do gene p53 de 10 voluntários com olhos azuis/verdes, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) para cada polimorfismo e relacão com a resposta da pele ao sol. OR: **(**Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.....**59**

Tabela 20. Polimorfismo do gene p53 de 36 voluntários que apresentam vermelhidão, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) para cada polimorfismo e relação com a cor dos olhos. OR: (Odds Ratio - razão de risco), IC: Intervalo de Confiança.....**60**

Tabela 21. Polimorfismo do gene p53 de 59 voluntários que apresentam vermelhidão, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a freqüência (%) para cada polimorfismo e relacão com a cor dos olhos. OR: (Odds Ratio - razão de risco), IC: Intervalo de Confiança.....**61**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina, base nitrogenada
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Arg	Arginina, aminoácido
BCC	Carcinoma de Células Basais *(basal cell carcinoma)*
C	Citosina, base nitrogenada
CDK	Quinase Ciclina-Dependente
IC	Intervalo de confiança
cAMP	Adenosina monofosfato ciclico
C-terminal	Extremidade Carboxi-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
G	Guanina, base nitrogenada
GO	Goiás
GST	Gene Supressor Tumoral
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)
kb	Kilo base (1kb = 1000pb)
Ld	Marcador de tamanho ou escada alélica (*Ladder*)
αMSH	Hormônio estimulador de melanócitos α
MC1R	Receptor de melanocortina 1 *(melanocortin receptor 1)*
N/A	Não Aplicável
N-terminal	Extremidade Amino-terminal
OR	*(Odds Ratio)*
pb	Par de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
POMC	Pro-opiomelanocortina *(pro-opiomelanocortin)*
Pro	Prolina, aminoácido
p53Arg/72	Proteína p53 com aminoácido arginina no códon 72
p53Pro/72	Proteína p53 com aminoácido prolina no códon 72
rpm	Rotação por minuto
SCC	Carcinoma de Células Escamosas **(***Squamous Cell Carcinoma)*
T	Timina, base nitrogenada
TBE	Tris-Borato de EDTA
UFG	Universidade Federal de Goiás
UVR	Radiação Ultravioleta
χ^2	Qui-quadrado
μg	Micrograma

RESUMO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA NO CÓDON 72 DO GENE HUMANO *P53* E AS CARACTERÍSTICAS DE PIGMENTAÇÃO

O gene *p53* codifica uma proteína à qual exerce várias funções como monitoramento do ciclo celular, atuação em mecanismos de reparo e apoptose. Novas funções exercidas por essa proteína vêm sendo observadas e estudadas como a atuação na cascata de pigmentação da pele agindo como fator de transcrição para genes importantes nesse processo como *POMC* (Pro-opiomelanocortina) e *MC1R* (receptor melanocortina 1). Dentre os polimorfismos genéticos, o do códon 72 do gene *p53* é o mais comumente estudado e esta variante tem sido associada ao risco elevado para vários tipos de cânceres, incluindo os de pele. No entanto, a associação entre este e outros tipos de cânceres tem gerado resultados controversos. O polimorfismo ocorre por uma substituição G/C no códon 72 do gene *p53* resultando em uma mudança da sequência de aminoácidos (CGC para arginina e CCC para prolina). Esse polimorfismo ocorre em domínios ricos em prolina gerando alterações morfofisiológicas assim como, uma diferença na mobilidade eletroforética da proteína. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma possível associação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *p53* com as características de pigmentação como cor de pele, cabelo, olho e resposta da pele após exposição solar (apresentar vermelhidão ou se bronzear). Os 96 voluntários saudáveis foram recrutados randomicamente e as informações sobre cor de pele, capacidade de se bronzear e outras características de pigmentação foram coletadas mediante um questionário padronizado. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue venoso e a genotipagem foi feita por Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). O polimorfismo foi investigado por fotodocumentação após eletroforese em gel de agarose. As amostras que geraram dúvidas foram confirmadas por digestão sítio específica através da atuação da enzima de restrição *Bs*tUI. As frequências alélicas dos 96 voluntários para p53Arg/72 e p53Pro/72, foram 67,70% e 32,30% respectivamente. As freqüências genotípicas para Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro foram 50,00%, 35,40% 14,60% respectivamente. Não foi detectada associação significante entre apresentar vermelhidão ou se bronzear após a exposição solar com o polimorfismo (p = 0,678), por outro lado observamos uma associação entre o genótipo Pro/Pro e olhos azuis/verdes (p = 0,01) entre os que apresentam vermelhidão da pele, demonstrando uma desvantagem em relação a exposição solar quando há ocorrência deste fenótipo específico (cor de olho) aliado ao genótipo Pro/Pro.

Palavras-chave: polimorfismo, gene *p53*, pigmentação, bronzeamento.

ABSTRACT

ASSOCIATION STUDY OF POLYMORPHISM OF SINGLE BASE AT CODON 72 OF HUMAN *P53* GENE AND CHARACTERISTICS PIGMENTATION

The p53 gene encodes a protein which has various functions such as monitoring of the cell cycle, role in repair mechanisms and apoptosis. New functions performed by this protein have been observed and studied as acting in the cascade of skin pigmentation by acting as transcription factor for genes important in this process as POMC (pro-opiomelanocortin) and MC1R (melanocortin receptor 1). Among the genetic polymorphisms, the codon 72 p53 gene is the most commonly studied and this variant has been associated with increased risk for various cancers, including skin. However, the association between this and other types of cancers has generated controversial results. The polymorphism occurs in a substitution G / C codon 72 p53 gene resulting in a change of amino acid sequence (CGC to CCC for arginine and proline). This polymorphism occurs in areas rich in proline generating morphophysiological changes as well as a difference in electrophoretic mobility of the protein. The aim of this study was to establish a possible association between the codon 72 polymorphism of p53 gene with the characteristics of pigmentation such as skin color, hair, eye and skin response after exposure to sunlight (reddening or bronze). The 96 healthy volunteers were recruited randomly and information on skin color, ability to tan and other characteristics of pigmentation were collected through a standardized questionnaire. Genomic DNA was extracted from venous blood and genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR). The polymorphism was investigated by photo documentation after agarose gel electrophoresis. Samples that generated doubts were confirmed by digestion with site-specific action of the restriction enzyme *Bst*UI. Allele frequencies of 96 volunteers to p53Arg/72 and p53Pro/72 were 67.70% and 32.30% respectively. Genotype frequencies for Arg / Arg, Arg / Pro and Pro / Pro were 50.00% 35.40% 14.60% respectively. We did not detect a significant association between reddening or tanning after sun exposure with the polymorphism ($p = 0.678$), on the other hand we observed an association between the genotype Pro / Pro and blue eyes / green ($p = 0.01$) among showing redness of the skin, demonstrating a disadvantage in relation to the sun when there is occurrence of this specific phenotype (eye color) combined with the genotype Pro / Pro.

Key words: polymorphism, *p53* gene, pigmentation and tanning

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gene humano *p53*

O gene *p53*, também conhecido como TP53 (*Tumor Protein 53*, proteína tumoral 53) é um gene supressor de tumor (GST) tendo como produto a proteína p53. Atua como um controlador de pontos estratégicos da cadeia de eventos responsáveis pelo controle do crescimento e diferenciação celular, parada do ciclo celular, ativação de mecanismos de reparo, senescência e apoptose (Shu *et al.*, 2007). O gene *p53* é considerado o mais comumente alterado em cânceres humanos e essas alterações resultam em uma mudança qualitativa e/ou quantitativa na proteína em questão (Zhuo *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2007).

O gene *p53* se localiza no cromossomo 17p13, apresenta 11 éxons, sendo que o primeiro deles não é codificante. A proteína p53 é constituída de 393 aminoácidos na sua extensão e faz parte de uma família de proteínas homólogas juntamente com a p73 e a p63 (Lima *et al.*, 2006; Fett-Conte & Salles, 2002). Esta proteína apresenta quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína. Na extremidade amino-terminal (ou N-terminal) da p53 existe um domínio de transativação, importante para a ativação específica de determinados genes. Na parte central existem quatro domínios de ligação ao DNA, por meio dos quais a proteína p53 é capaz de se ligar ao DNA em sítios específicos. Na extremidade carboxi-terminal (ou C-terminal) existem dois domínios: (1) o domínio de tetramerização, que é responsável pela formação de tetrâmeros de p53, a forma mais ativada da p53 em transativação, e (2) o domínio regulatório, que pode controlar negativamente o domínio central de ligação ao DNA, se ligando a ele e, assim, inibindo a ligação específica da p53 aos diferentes promotores (Figura 1) [Shu *et al.*, 2007].

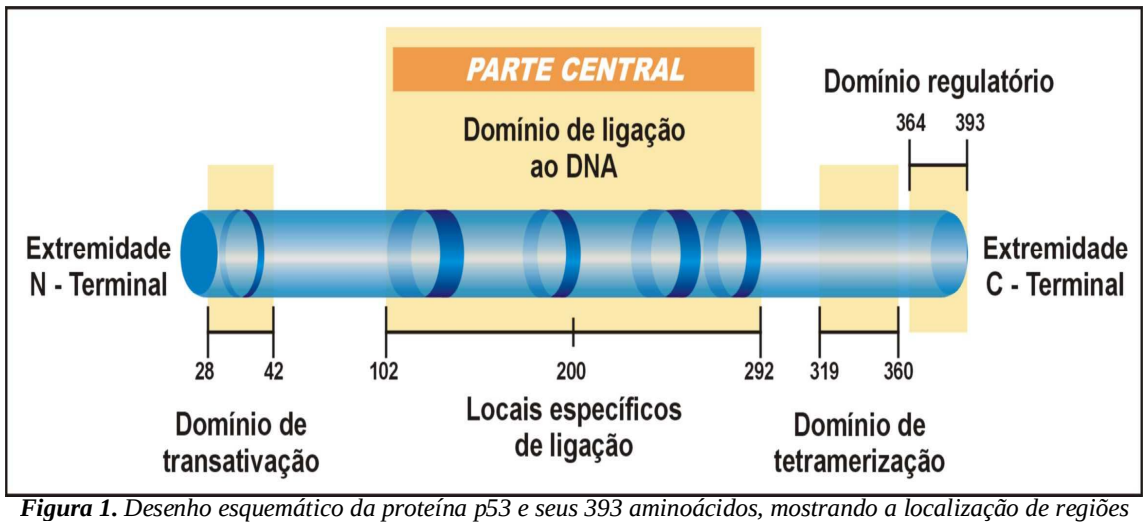


Figura 1. *Desenho esquemático da proteína p53 e seus 393 aminoácidos, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções (domínios) diretamente associadas às complexas vias metabólicas, nas quais participa a p53 (Silva, 2009).*

A proteína p53 está no centro de várias rotas de regulação celular, influenciando a expressão e a ativação de diversos fatores de transcrição e replicação, e é ativada sempre que ocorre um dano à molécula de DNA (Orsted *et al.*, 2007). Após o dano, a p53 se liga ao local danificado, interrompe as células na fase G1, ativa os mecanismos de reparo da célula ou ativa a apoptose (Lima *et al.* 2006; Shu *et al.*, 2007).

Caso a p53 esteja mutada ou com sequências de aminoácidos polimórficos, o processo de divisão pode perder o controle levando a iniciação, promoção e progressão de tumores ou alterando as outras funções importantes exercidas por esta proteína (Orsted *et al.*, 2007). Em condições favoráveis, ou seja, sem qualquer sinal de estresse celular, a p53 se encontra na forma inativa, mas esta é rapidamente ativada quando a célula sofre alguma agressão levando a sua estabilização e acúmulo intracelular (Galli *et al.*, 2009).

A proteína p53, ativada por fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal, não é capaz de se ligar ao DNA de maneira específica. Esta ligação não-específica ao DNA é causada pela ligação da extremidade C-terminal da proteína com o domínio central, causando um bloqueio desse domínio. O bloqueio pode ser revertido por acetilação da

extremidade C-terminal. Nessa situação, a p53 passa a se ligar de maneira específica ao DNA, podendo agir como um fator de transcrição (Figura 2) [Silva, 2009; Lewin, 2001].

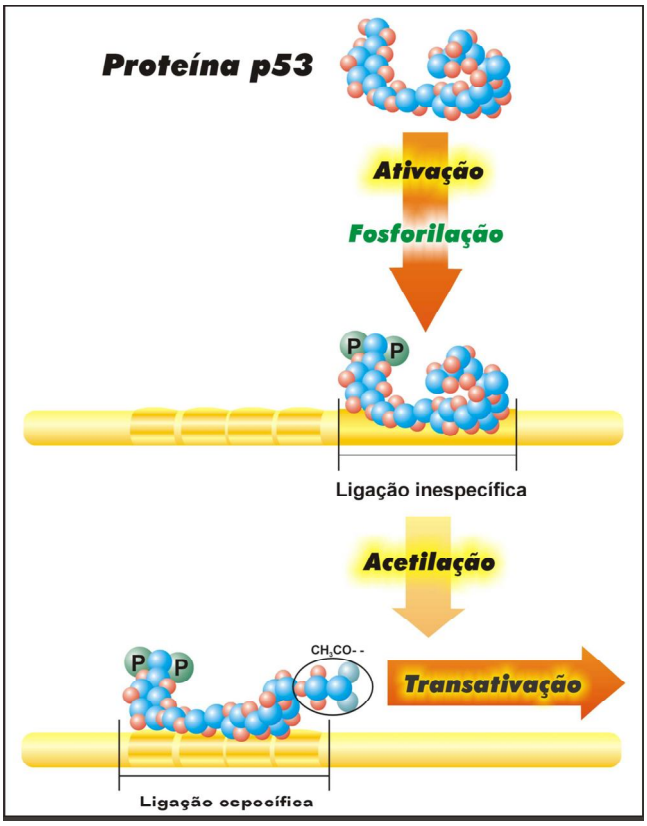


Figura 2. *Modelo mostrando ativação da proteína p53 através da fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal. Após fosforilação, a proteína se liga de maneira inespecífica ao DNA. A acetilação na extremidade C-terminal libera o domínio de ligação ao DNA, isso faz com que a p53 se ligue especificamente a determinados sítios do DNA, podendo assim agir como um fator transcricional (Silva, 2009).*

Após a expressão do *p53*, o domínio da proteína responsável pela função de fator de transcrição interage com pelo menos outros seis genes, dentre estes o p21, um inibidor de quinase dependente de ciclina (CKI) transativado pela p53, onde elevados níveis desta proteína resulta na perda da capacidade de fosforilar outras proteínas como as RBs (Retinoblastoma) dos complexos ciclinas-CDK. As RBs hipofosforiladas sequestram os fatores de transcrição necessários para síntese de DNA, bloqueando assim o ciclo antes da fase S (Ferreira & Rocha 2004). Essa transição de fases controlada pela ação de ciclinas – CDK age como um regulador negativo do ciclo celular impedindo a sua progressão caso o DNA não seja reparado (Lewin, 2001; Ferreira & Rocha, 2004; Soto *et al.*, 2005; Benjamin & Ananthaswamy 2007).

A ativação de p53 por fosforilação ou acetilação ainda é controversa. Mas a ativação e modificação de p53 fazem com que essa proteína aja como um fator de transcrição através da ligação em sequências específicas, promovendo a transativação a jusante de genes-alvo. Para desempenhar essa função, as proteínas p53 se associam entre si formando tetrâmeros, complexos protéicos resultantes da associação de quatro monômeros. Após o evento de tetramerização a proteína passa a ser capaz de conter o crescimento celular ou induzir a morte da célula por apoptose (Vazquez *et al.*, 2008). A sua concentração, bem como suas atividades, são reguladas e mantidas sob um rígido controle desempenhado por vários genes e seus produtos. Um dos processos para manter os níveis de p53 baixos é a degradação dessa proteína, nesse contexto, o proto-oncogene *MDM2* é importante, pois se trata de um gene ativado por p53 capaz de controlar os níveis e meia vida da proteína (Jeong *et al.*, 2009; Shu *et al*., 2007).

A proteína MDM2 é capaz de se ligar a extremidade N-terminal da p53, bloqueando assim a sua atividade transcricional. A ligação da proteína MDM2 com a proteína p53 é também responsável pela exportação da p53 do núcleo para o citoplasma da célula, local onde a proteína será degradada por uma via de ubiquitinação. A exportação do complexo protéico MDM2/p53 para fora do núcleo é mediada por proteínas específicas, denominadas exportinas, que são capazes de se ligar à proteína MDM2 e auxiliar na exportação do complexo para fora do núcleo (Vazquez *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2005).

Mutações e polimorfismos genéticos podem alterar a funcionalidade da proteína p53 e consequentemente a produção da melanina uma vez que a p53 encontra – se no inicio da cascata de pigmentação e é ativado quando exposto a maiores doses de radiação ultravioleta (UVR). Até o momento não há estudos mais detalhados envolvendo polimorfismo no códon 72 do *p53* relacionada à pigmentação, sendo ultimamente, relacionados ao risco para vários tipos de cânceres e a grupos étnicos uma vez que a frequência de SNP (*Single Nucleotide*

Polymorphism – Polimorfismo de Base Única) na população para o códon 72 varia entre grupos étnicos e latitude (Jeong *et al*., 2009).

1.2. O Polimorfismo do gene *p53*

Variações polimórficas nos genes promovem mudanças de códons e consequentemente, podem causar uma gama variada de alterações nos produtos expressos provocando modificações modestas ou dramáticas na atividade dos produtos. Existem 85 polimorfismos validados descritos para o gene *p53* humano capazes de influenciar direta ou indiretamente as rotas metabólicas nas quais a proteína p53 atua (IARC, 2010).

Polimorfismos no códon 11 (GAC/CAG/AAG), 248 (CGG/TCG), íntron 3 e o Ser47, que tem sido extensivamente estudado uma vez que suas variantes se relacionam com a diminuição da habilidade de transativação de outros genes, vem sendo bem estudados, no entanto, o polimorfismo do códon 72 (CGC/CCC) é o mais estudado de todos os identificados até o momento (Twu *et al.*, 2006; Hsieh & Lin 2006, Pezeshki *et al.*, 2006).

O códon 72 encontra se dentro do éxon 4 do gene *p53* e ocorre por uma substituição G/C, a qual resulta na mudança na sequência de codificação de aminoácidos arginina CGC (p53Arg /72 arginina) e prolina CCC (p53Pro/72 prolina), levando a alterações na mobilidade eletroforética da proteína. Com esta substituição de bases, três genótipos distintos podem ser gerados: Arg/Arg e Pro/Pro (homozigotos) e Arg/Pro (heterozigotos) (Zhuo *et al*., 2009; Hong *et al.,* 2005). Estes polimorfismos genéticos podem ser observados e estudados por amplificação do éxon 4 e digestão mediante atuação sítio específica de enzimas de restrição. A presença do sítio de restrição para *Bs*tUI (CGCG) resulta em dois fragmentos para p53Arg/72 e apenas um fragmento para p53Pro/72 possibilitando desta forma a obtenção das frequências genotípicas e alélicas para a associação e analise em questão (Hsieh & Lin, 2006).

Este polimorfismo vem sendo associado também ao risco de cânceres de pele em pacientes renais transplantados e a resposta desfavorável do organismo frente a abortos espontâneos e capacidade de se bronzear (Firouzabadi *et al.,* 2009*;* Laing *et al.,* 2007; McGregor *et al.,* 2002). O alelo p53Arg/72 possui a capacidade de induzir de uma forma mais eficientemente que o p53Pro/72, a interação da p53 com MDM2 e facilitar a exportação nuclear da p53 e a localização da mitocôndria e induzir a morte celular sendo desta forma um grande indutor apoptotico (Jeong *et al.,* 2009; Stefanaki *et al.,* 2006).

Varias observações em estudos recentes sugerem que o polimorfismo Arg72Pro do gene *p53* pode influenciar na longevidade, no risco de câncer como cérvix, uma vez que o alelo p53Arg/72 aumenta a susceptibilidade da proteína ser degradado pelo papiloma vírus humano (HPV) (Storey *et al.,* 1998*)* . Influencia ainda, nos cânceres de pulmão, bexiga, cabeça e pescoço e cânceres de pele do tipo melanoma e não melanoma. Relaciona-se também com o prognóstico de tais neoplasias e a pode estar relacionado com a resposta à exposição à UVR. No entanto, há controvérsias entre quais frequências genotípicas e alélicas se relacionam com estas anormalidades ora apontando a presença de p53Arg/72, ora p53Pro72 como fator de risco significante para determinados tumores (Orsted *et al*., 2007; Lima *et al.,* 2006).

1.3. Pigmentação humana

1.3.1 Melanogênese

A pigmentação humana é poligênica e altamente hereditária e as proteínas codificadas por estes genes contribuem para o controle da produção de melanina e a maturação de melanossomos, presentes nos melanócitos, considerados como fatores determinantes da pigmentação (Han *et al.*, 2008).

Os melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, infundíbulo, na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide, e em leptomeninges. São células capazes de sintetizar melanina, um polímero pigmentar de fotoproteção (Ferreira & Rocha 2004), e projetam seus dendritos dentro da epiderme transferindo seus produtos melanossômicos (grânulos de melanina) para dentro dos queratinócitos de maneira que eles alcancem toda a epiderme devido ao seu movimento progressivo para a superfície (Rees, 2004). São de origem neuroectodérmica assim como os nervos e compreendem cerca de 10% de todas as células epidermais agindo como guardiãs contra danos causados por excessiva exposição à UVR (Yang *et al*., 2006). Os melanócitos são células fenotipicamente proeminentes, mas histologicamente discretas e são responsáveis pela pigmentação da pele, olhos e cabelos (Lin & Fisher, 2007).

Os melanócitos foliculares, responsáveis pela pigmentação do pelo, diferem dos melanócitos epidérmicos por seu maior tamanho e dendritos mais longos, e por estarem relacionados somente a 4 ou 5 queratinócitos diferentemente dos epidérmicos que se relacionam com 36 a 40 queratinócitos (Oliveira & Almeida, 2003). Os queratinócitos estão unidos em suas bordas livres por pontes intercelulares (desmossomas), que são mais bem visualizados na camada esponjosa (Duvivier, 1995).

Melanina é uma mistura de polímeros com diferentes propriedades físico-químicas que são enzimaticamente derivadas de tirosina por via de uma série de passos. Após sua expressão e maturação, estas proteínas são transportadas para queratinócitos adjacentes onde a maioria do pigmento é encontrada. Dentro das camadas de queratinócitos da pele, a melanina é disposta em caminhos particulares, mas notavelmente na camada basais (Rees, 2004). Agindo como o principal colaborador no processo de pigmentação, elas são expressas em duas formas: feomelanina (vermelho-amarela) e (marrom/preta) eumelanina. A diferença na pigmentação pode estar associada com a variação no número, tamanho, composição e distribuição de melanossomos (grânulos que comportam a melanina), produzidos pelos melanócitos, assim como polimorfismos ou mutações em genes importantes no desencadeamento da cascata de pigmentação assim como o *p53* (Montenegro & Franco, 1999; Shen *et al.*, 2003).

Na melanogênese humana (processo de síntese de proteína), dentro de organelas denominadas melanossomos ocorre uma catalisação inicial pela enzima tirosinase multifuncional. Juntamente com a tirosina, outras proteínas como a TRP 1 e a TRP 2 também regulam esse processo. De início ocorre uma oxidação enzimática da L-tirosina resultando em L-Dopa e uma oxidação da L-Dopa resultando em dopaquinona. Em seguida ocorre uma transformação espontânea da dopaquinona em leucodopacromo e dopacromo iniciando uma cascata bioquímica, na qual culmina na formação de um pigmento castanho/preto denominado eumelanina. A conjugação de dopaquinona com cisteina ou glutationa resulta em cisteinildopa e glutatioildopa que passando por uma serie de transformações culminam na formação de outro pigmento vermelho/amarelo denominado feomelanina (Oliveira & Almeida, 2003; Montenegro & Franco, 1999).

Estudos genéticos e moleculares em camundongos têm fornecido consideráveis compreensões sobre pigmentação patológica na melanogênese e em um número de genes

relacionados a esse processo (Rees, 2004). As mutações estudadas podem culminar em uma hiperpigmentações ou hipopigmentações com ou sem alteração no número de melanócitos. Tal fenótipo reforça o ensejo de um precoce entendimento sobre a expressão de genes relacionados a tais anormalidades no funcionamento dos melanócitos quando levamos em consideração a funcionalidade de forma apenas constitutiva ou quando a facultativa influencia a constitutiva (Lin & Fisher, 2007).

1.3.2. Efeito da radiação ultravioleta (UVR) na melanogênese

Agindo como um importante fator ambiental relacionado à pigmentação, a UVR pode ser dividida entre ultravioleta do tipo A (UVA; 320-400 nm), ultravioleta B (UVB; 280-320 nm) e ultravioleta do tipo C (UVC; 200-280 nm). Em adição, a UVR induz danos ao DNA sendo considerado um fator de risco para cânceres de pele (Souza *et al.*, 2004).

A confirmação da mutagenicidade da UVR ocorreu em 1960, com a descoberta da formação do fotodímero ciclobutano, após a irradiação da base timina por comprimento de onda de 254 nm. A produção de fotodímeros em pele humana, mais especificamente em queratinócitos e melanócitos, pode ser induzida tanto pela UVA quanto pela UVB (Castro, 2007).

Como revisto por Lin & Fish 2007, a olho nu, os efeitos da radiação ultravioleta (UVR) é marcado pelo bronzeamento ou não bronzeamento, porém, em nível gênico, mesmo a exposição a baixas doses de UVR podem gerar danos ao DNA antes que haja alguma evidencia de mudança na coloração da pele.

A sensibilidade da pele aos efeitos da radiação ultravioleta é variável dentro da população normal e a exposição da pele a significantes doses de UVR resultam em reações inflamatórias

caracterizadas por eritrema (vermelhidão, vasodilatação superficial), edema e possíveis bolhas acompanhada de muita dor (Figura 3) [Rees, 2004].

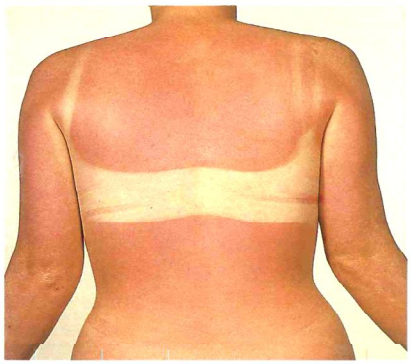


Figura 3. *Queimadura solar: o eritema pode ser induzido pela UVR, mas pode ser prevenido pelo uso do filtro solar. A queimadura solar é responsável pelo envelhecimento prematuro da pele e por muitos tipos de cânceres (Duvivier, 1995).*

Estudos a nível molecular sobre resposta a UVR, usando cultura de melanócitos, nos mostram que a exposição à UVR induz a parada do ciclo celular na fase G1 e que essa ação está diretamente ligada ao gene *p53* (Yang *et al.*, 2006), outros estudos indicaram uma indução significante de mutação em genes como o *p53* por UVR podendo ser relevante na modificação epitelial e também ser responsável por um alto risco de desenvolvimento de carcinomas em dermatites de cabeça e pescoço (Franchi *et al.*, 2006). Desta forma a interação entre fatores constitutivos e facultativos na pigmentação normal e patológica, precisa ser melhor compreendida para que em futuros estudo de comparação possamos avaliar a diferença nestas duas situações.

1.3.3. O receptor de melanocortina MC1R

A contribuição dos melanócitos para a pigmentação é conservada entre varias espécies e apesar de identificarem mais de 120 genes envolvido na pigmentação humana, o receptor melanocortina 1 (*MC1R*) e considerado o gene representativo e maior determinante do fenótipo de pigmentação no cabelo, olho e na pele (Cui *et al.*, 2006; Le Pape *et al.*, 2008).

Nos estudos com camundongos, o mutante recessivo para o *loci MC1R* possui cor de pelo com características feomelanicas (amarelo) enquanto o tipo selvagem possui características eumelanicas (marron/preto) (Lin & Fisher, 2007).

O *MC1R* é um gene expresso predominantemente por melanócitos e codifica para uma proteína receptora transmembrânica acoplada a proteína G. Esta proteína possui 317 aminoácidos e seu gene altamente polimorfo esta localizada no cromossomo 16q24.3 (Nan *et al.,* 2008; Savage *et al.,*2008). A proteína MC1R é ativada por dois ligantes: Hormônio Estimulador de melanócitos alfa (αMSH) ou Hormonio Adenocorticotrofico (ACTH) produzidos pela ativação transcricional do gene *POMC* (proopiomelanocortina). Embora originalmente identificado na pituitária, a expressão do *POMC* também ocorre na pele e folículos capilares. Estes agonistas causam um aumento na produção de melanina através de níveis elevados cAMP (Cui *et al*., 2006).

A proteína MC1R possui a capacidade de ativar a adenililciclase induzindo a produção de cAMP no qual lidera a fosforilação de CREB, uma proteína que faz parte da família de fatores de transcrição responsiva ao cAMP. Esta então age ativando a produção da melanina (Lin & Fisher, 2007; Rees, 2003).

Após sua produção, o αMSH é secretado por queratinócitos e melanócitos com o objetivo de estimular a proteína MC1R cuja mutação pode resultar no fenótipo ruivo.

1.3.4. O papel da p53 na melanogênese

A p53 ativa o processo de pigmentação por aumentar a ativação transcricional do *POMC* na pele como descrito na Figura 4 (Cui *et al.,* 2006).

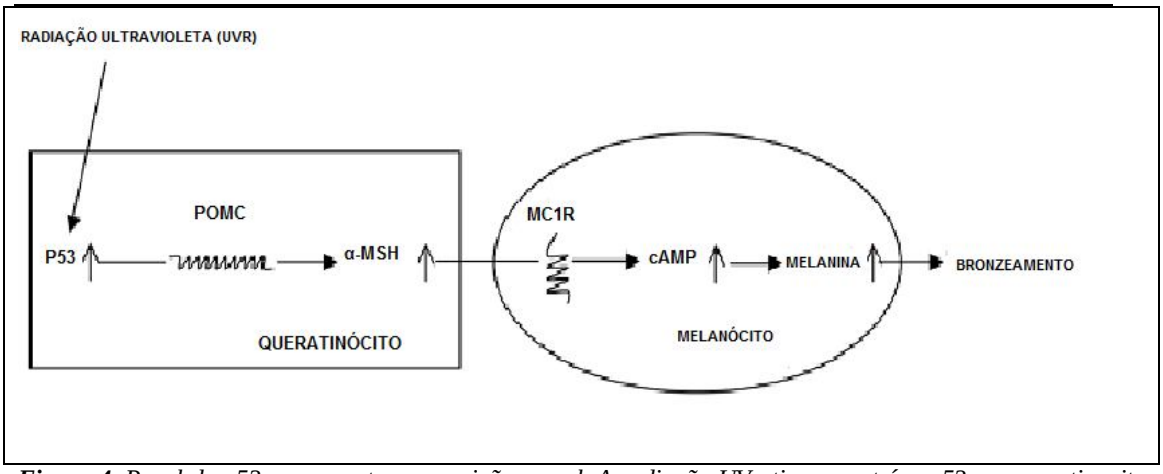


***Figura 4**. Papel da p53 na resposta a exposição ao sol. A radiação UV ativa a proteína p53 em queratinocitos da pele. Agindo como um fator transcricional, a p53 estimula a transcrição do gene POMC precursor do αMSH. Posteriormente o gene ativa o funcionamento da MC1R que, através de cAMP, ativa a produção de melanina culminando em uma mudança na coloração. (Adaptado de Nan et al.,2008).*

Estudos relatam que algumas variantes de MC1R são associadas a um alto risco para o desenvolvimento do melanoma e são também associadas com fenótipos específicos como pele clara e cabelos ruivos (Duarte, 2008). Variantes do MC1R podem diminuir a atividade da adenililciclase e consequentemente levar o indivíduo a exibir relativa diminuição na pigmentação, assim como o bronzeamento, fenótipo este normalmente encontrado nos ruivos. Tais pigmentações anormais possuem fortes informações a cerca de bases genéticas e promovem importantes pistas nos estudos relacionados à fotoproteção e predisposição a cânceres. O bronzeamento é um dos mais extraordinários exemplos de adaptação ambiental em humanos, e mecanismos moleculares relacionados a esta resposta ao sol podem ser acoplado aos elevados níveis de genes críticos como *p53*, *POMC* e *MC1R*, na resposta a danos ao DNA desempenhando um papel importante na cascata de pigmentação (Nan *et al*., 2008).

A importância do gene *p53* está no fato de ser um gene supressor de tumor responsável pelo equilíbrio celular inibindo o desenvolvimento de cânceres.

O polimorfismo do *p53* no códon 72 (Arg/Pro) está envolvido na mudança da habilidade da p53 em interagir com outras proteínas celulares incluindo genes associados com a cascata

de pigmentação da pele. Este polimorfismo tem sido bastante estudado e estes estudos baseados em varias populações indicaram que a frequência dos alelos p53Arg/72 e p53Pro/72 diferem entre os grupos étnicos e também com o aumento da latitude (Sjalander *et al.,* 1996). Neste contexto, genes relacionados à cascata de pigmentação, quando polimorfos em indivíduos saudáveis, podem alterar as características e fisiologia das proteínas resultantes da expressão destes genes podendo culminar em uma resposta negativa da pele em resposta a exposição à UVR (apresentar vermelhidão) e consequentemente a patologias de pele como cânceres (Souza *et al.,* 2004). Com estes estudos poderemos promover campanhas de prevenção para formas de pigmentação patológicas e diagnóstico baseado nos genótipos individuais. Entendendo esta funcionalidade constitutiva e facultativa dos genes em resposta a exposição à radiação UVR, poderemos promover novas formas de profilaxia e tratamento de doenças de pele podendo até desenvolver mecanismos para um aconselhamento genético.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma possível associação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *p53* com as características de pigmentação como cor de pele, cabelo, olho e resposta da pele após exposição solar (apresentar vermelhidão ou se bronzear).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Determinar a prevalência de polimorfismos no códon 72 do gene *p53* em um grupo de 96 voluntários selecionados aleatoriamente no laboratório INGOH (independente do sexo, etnia, situação de saúde e grau de instrução) por genotipagem mediante PCR na cidade de Goiânia /GO/Brasil.

• Estabelecer uma relação entre as frequências genotípico-alélicas do códon 72 do gene *p53* com as características de pigmentação cor de pele, olho e cabelo bem como a resposta da pele após exposição à UVR de cada indivíduo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Características de Estudo

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Goiás com número de protocolo: 125/09 e todos os registros foram sigilosos e de natureza confidencial. A pesquisa se caracteriza como uma investigação quantitativa e comparativa de voluntários por aplicação de questionário e coletas de dados no intuito de estabelecer uma associação entre polimorfismo no códon 72 do gene humano *p53* e características de pigmentação. O presente estudo confia no uso da estatística para estabelecer com exatidão os padrões de comportamento da população estudada.

3.2. Grupo Amostral

Para o estudo de polimorfismo no gene humano *p53* associado a características de pigmentação, um total de 96 voluntários do Instituto Goiano de Hematologia (INGOH) foram selecionados aleatoriamente independente do sexo, etnia, situação de saúde, grau de instrução e hábitos de vida residentes em Goiânia / GO, com idade entre 20 e 70 anos. Apenas de um voluntário não foi possível obter dados referentes à resposta à exposição solar (apresentar vermelhidão ou se bronzear).

3.3. Coleta de Sangue

No momento da doação, os voluntários foram informados sobre o objetivo da pesquisa e concordando em participar da mesma, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e responderam a um questionário padronizado (Anexo 2) aplicados pela equipe do laboratório INGOH. Os procedimentos da coleta de 5 mL de sangue foram feitos por pessoas capacitadas e material descartável (sistema de coleta a vácuo em tubos com EDTA). Informamos também sobre a probabilidade de ocorrer um leve desconforto, inerente a punção venosa ou devido ao garroteamento do braço, entretanto tais situações seriam

momentâneas e não apresentariam maiores consequências. Após a coleta pela equipe do INGOH, as amostras foram encaminhadas em tubos *vacutainers* ao Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular. As amostras foram identificadas apenas por números (para manter o sigilo quanto à identidade dos voluntários) e armazenadas no freezer por pouco tempo uma vez que optamos pela extração ser feita no mesmo dia da coleta com a finalidade de manter o bom rendimento da extração.

3.4. Obtenção de dados: características de pigmentação e histórico de câncer

As características como cor de olho (castanho/preto ou azul/verde), cabelo (castanho/preto ou loiro), pele (branca, morena ou negra) e arguição sobre a reação da pele ao ficar exposta ao sol, foram arbitrariamente definidas por nossa equipe e informada à equipe do INGOH para facilitar o processo de entrevista. A população morena e negra, para efeitos de comparação, foram agrupadas em população morena.

3.5. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos linfócitos obtidos a partir da amostra de 1mL de sangue venoso segundo procedimentos descritos do kit comercial especifico para extração de DNA Illustra Blood genomicPrep Mini Spin Kit (*GE Healthcare*), conforme procedimentos do fabricante. De inicio, as hemácias foram lisadas com tampão de lise juntamente com a proteinase K, em seguida foram submetidas a uma série de centrifugações e transferências de colunas contendo uma matriz de fibra de vidro na qual o DNA genômico se liga. No final da extração foi adicionada a amostra tampão de eluição a 70ºC e após uma incubação de não mais que 1 minuto, o DNA foi armazenado a 4ªC. Todos os reagentes e protocolos foram usados e seguidos de acordo com fabricante.

3.6. Determinação do polimorfismo por genotipagem mediante PCR

A análise do genótipo no códon 72 do *p53* foi padronizada e a amplificação da região do códon 72 ocorreu através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se *primers* específicos para genotipagem do SNP 72. Juntamente com os *primers*, outros reagentes foram utilizados na reação de PCR, como dNTP mix (Invitrogen), Taq-DNA-Polimerase Recombinant (Invitrogen), Água Mili-Q, Íons Mg^{2+}, PCR Buffer 10x sem Mg (Invitrogen) como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. *Protocolo da quantidade de reagentes utilizados para realização da PCR.*

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume por reação (µL)	Volume Final (µL)
Tampão	10X	1X	5	Multiplica-se cada volume por reação pelo número de reações + 2
MgCl	50 mM	4,5 mM	4,5	
dNTP	10 mM	0,2mM	1,0	
Primers	10 mM	0,2 mM	1,0	
Taq-polimerase	5,0 U/mL	1 U/mL	0,2	
DNA	N/A*	200 ng	10,0	
H2O Milli-Q	N/A	N/A	27,3	
Total			**50**	**N/A***

**N/A: Não aplicável*

Os *primers* e o tamanho dos amplicons encontram-se na Tabela 2 abaixo cada um obedecendo ao protocolo com temperaturas de anelamento diferentes como na Tabela 3. As informações detalhadas sobre os *primers* usados estão contidas no Anexo 4.

***Tabela 2**. Primers para avaliação do polimorfismo e tamanho dos amplicons obtidos.*

	Senso 5'3'	Anti-senso5'3'	pb
P53Arg/72	TCC CCC TTG CCG TCC CAA	CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141
P53Pro/72	GCC AGA GGC TGC TCC CCC	CGT GAC AGT CAC AGA CCT	177

Arg: arginina; Pro: prolina; pb: pares de bases

As reações foram padronizadas nas condições já descritas na Tabela 1. Para cada grupo de reações preparadas foi feito um controle negativo nas mesmas condições, porém sem DNA genômico, para assegurar que os reagentes estavam livres de contaminações. As reações foram realizadas no termociclador TC-312 (*Techne*) seguindo as ciclagens descritas na Tabela 3.

***Tabela 3.** Ciclagem para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).*

Estágios	Temperatura	Tempo	No. de Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	5 min	1
Desnaturação Cíclica	94°C	1 min	35
Anelamento	60°C (Arg) 54ºC (Pro)	1 min	
Extensão Cíclica	72°C	1 min	
Extensão Final	72°C	5 min	1
Repouso	4°C	∞	N/A

N/A: não se aplica

Os *primers* utilizados neste estudo foram descritos em trabalhos semelhantes (McGregor *et al.*, 2002, Lima *et al.*, 2006, Pezeshki *et al.*, 2006, Hamú *et al.*,2007, Ferouzabadi *et al.*, 2009). As etapas da PCR consiste em uma temperatura inicial de 94ºC para a desnaturação do DNA, 54ºC para o anelamento do par de primers para prolina e 60ºC para o prolina e 72ºC para a atuação da TaqDNA polimerase.

Para esta dissertação, todos os géis usados para separar os fragmentos de DNA, amplificados por PCR, foram agarose (GIBCO BRL *Ultra*PURE Agarose LIFE TECHNOLOGIES) a 2% . Dentro de cada canaleta do gel foram adicionados as amostras contendo 10µL de DNA juntamente com 5µL de tampão de amostra (Azul de Bromofenol e Glicerol). Após submeter às amostras ao vórtex e centrifugá-las, estas foram aplicadas no gel.

Para a realização da eletroforese, submeteram-se os géis a uma voltagem constante de 80V e 300 mA, por um tempo médio de 1:40h. Após a corrida, o gel foi corado em banho de brometo de etídio (EtBr; *ULtraPure* Invitrogen) (6µl em 50 ml de TBE) por um período de 15 a 20 minutos. E, finalmente, os fragmentos foram revelados com o sistema fotodocumentação digital após analise no transluminador mediante luz UV.

O peso (100pb) de comparação (escada alélica) usado nesta dissertação foi Fornecido pela Invitrogen (100 pb DNA *Ladder* Invitrogen). Sua utilização resultou em uma identificação das bandas de interesse uma vez que uma possui 177 pb e a outra 141pb.

Para a preparação do Tris-Borato de EDTA (TBE 10x) foram utilizados Tris base 12,11 g para 1l, Ácido bórico 5,6 g para 1l, EDTA 10 mM (pH 8.0 10X) 100 mL para 1l e H_2O Milli-Q até chegar ao volume correto. Na preparação do EDTA 0,5M pH 8,0 foram utilizados EDTA (pm 372,24) 1,86 g para 500 ml, H_2O Milli-Q e o controle do pH com NaOH foi obtido com a adição de aproximadamente 10 gotas.

Para a digestão (PCR-RFLP) e confirmação de algumas amostras, usamos a enzima *BstU*I [fonte:*Bacillus stearothermophilus* U458(Z.CHEN)]. Inicialmente o DNA genômico foi amplificado usando os mesmos reagentes da PCR feita para amplificação do fragmento p53Arg/72 e p53Pro/72 com algumas modificações. Os *primers* usados foram o *forward* do p53Arg/72 = 5'TCC CCCTTGCCGTCCCAA3' juntamente com o *reverse* do p53Pro/72 = 5'CGTGACAGTCACAGACCT3' resultando em um fragmento de 279pb.

O protocolo para PCR-RFLP consiste em uma temperatura inicial 94ºC por 5 minutos, 35 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 58ºC por 30 segundos e 72ºC por 45 segundos. Uma extensão final de 72ºC por 5 minutos. Os produtos do PCR foram digeridos por 1,5µL de *Bst*UI (10U por microlitro, *New England Biolabs*) em tampão obtido juntamente com a enzima (NEBuffer 2, 10X) e 30 µL de DNA incubado em um período de 6 a 7 horas a 60ºC de acordo com dados do fabricante. As amostras foram sujeitas a eletroforese em gel de

agarose 2% a 80V e 300mA por aproximadamente 1:40 hora. As bandas foram visualizadas com DNA corado por brometo de etideo e fotodocumentadas. A forma p53Arg/72 do códon 72 contém sítios de reconhecimento para a enzima *Bst*UI, sítios estes ausentes em p53Pro/72. O alelo p53Arg/72 quando clivado pela *Bst*UI resulta em dois fragmentos, um de 160 pb e o outro de 119 pb, enquanto que um individuo homozigoto para p53Pro/72 apresenta apenas uma banda de 279 pb. Já o individuo heterozigoto p53Arg/Pro/72 apresenta três bandas, uma de 279 pb, a outra de 160 pb e a outra de 119 pb.

3.7. Análise Estatística

Os dados resultantes do polimorfismo do códon 72 do gene *p53* foram agrupados em numero de indivíduos com suas respectivas frequências (para fins do teste do Equilibrio de Hardy-Weinberg) para os alelos p53Arg/72 (arginina) e p53Pro/72 (prolina) e para os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro. Para estudar a associação entre as variáveis categóricas analisadas (frequências genotípica e alélica), empregaremos o teste de Qui-Quadrado (x^2). As freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo no códon 72 do gene *p53* foram comparadas com as características de pigmentação dos voluntários. Toda a analise estatística como determinação de *Odds Ratio* (OR) e dos intervalos de confiança (IC) foi desenvolvida usando o *software* GraphPad Prism (GraphPad, San Diego CA). As diferenças somente são consideradas significativas para *p* menor ou igual a 0,05. Caso o teste Qui-Quadrado revele um valor > 0,05, a hipótese nula (H0) é confirmada, ou seja, os estudos são homogêneos.

A lei de Hardy-Weinberg é baseada em um modelo matemático que avalia o efeito da produção nas frequências alélicas e genotípicas de um grupo em estudo. Esse equilíbrio será considerado se a população estiver sem a influência de mutações, reprodução aleatória e migração ou seleção natural. Nesse caso ira se manter uma proporção esperada (Silva, 2009).

Geralmente a falha neste equilíbrio se associa a uma avaliação restrita de um determinado grupo étnico uma vez que ficou comprovada a existência de proporções distintas entre diferentes etnias (Jeong *et al.*,2009).

4. RESULTADOS

4.1. Características descritivas da população

A analise incluiu 96 voluntários com média das idades de 32 anos. O grupo de estudo apresentou-se composto em maior parte por indivíduos que se autodeclararam morenos (61,50%). No quesito cor de olho, o grupo apresentou uma absoluta maioria de indivíduos com olhos castanho-pretos (88,50%), da mesma forma, para cor de cabelo, castanho/preto foi à cor mais frequente (92,70%) (Tabela 4).

Tabela 4. *Distribuição de voluntários de acordo com as variáveis analisadas.*

Idade	**N**	**%**
< ou igual a 50 anos	**90**	**93,80**
> que 50 anos	**6**	**6,20**
Cor da Pele	**N**	**%**
Branca	**37**	**38,50**
Morena	**59**	**61,50**
Cor de olhos	**N**	**%**
Castanhos/Pretos	**85**	**88,50**
Verdes/Azuis	**11**	**11,50**
Cor dos cabelos	**N**	**%**
Castanhos e Pretos	**89**	**92,70**
Loiros	**7**	**7,30**
Total	**96**	**100,00**
Resposta da pele a exposição solar	**N**	**%**
Vermelhidão	**36**	**38,50**
Bronzeamento	**59**	**61,50**

4.2. Genotipagem

Os fragmentos de interesse foram amplificados nas condições já descritas. Todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2%) e apresentaram os padrões de bandas conforme as figura abaixo (Figuras 5 à 12). Na eventualidade do aparecimento de bandas inespecíficas ou bandas fracas ou desniveladas que geraram dúvidas quanto à obtenção do genótipo, protocolamos a utilização de enzimas de restrição para a confirmação do polimorfismo das amostras como observado nas Figuras (5 à 12).

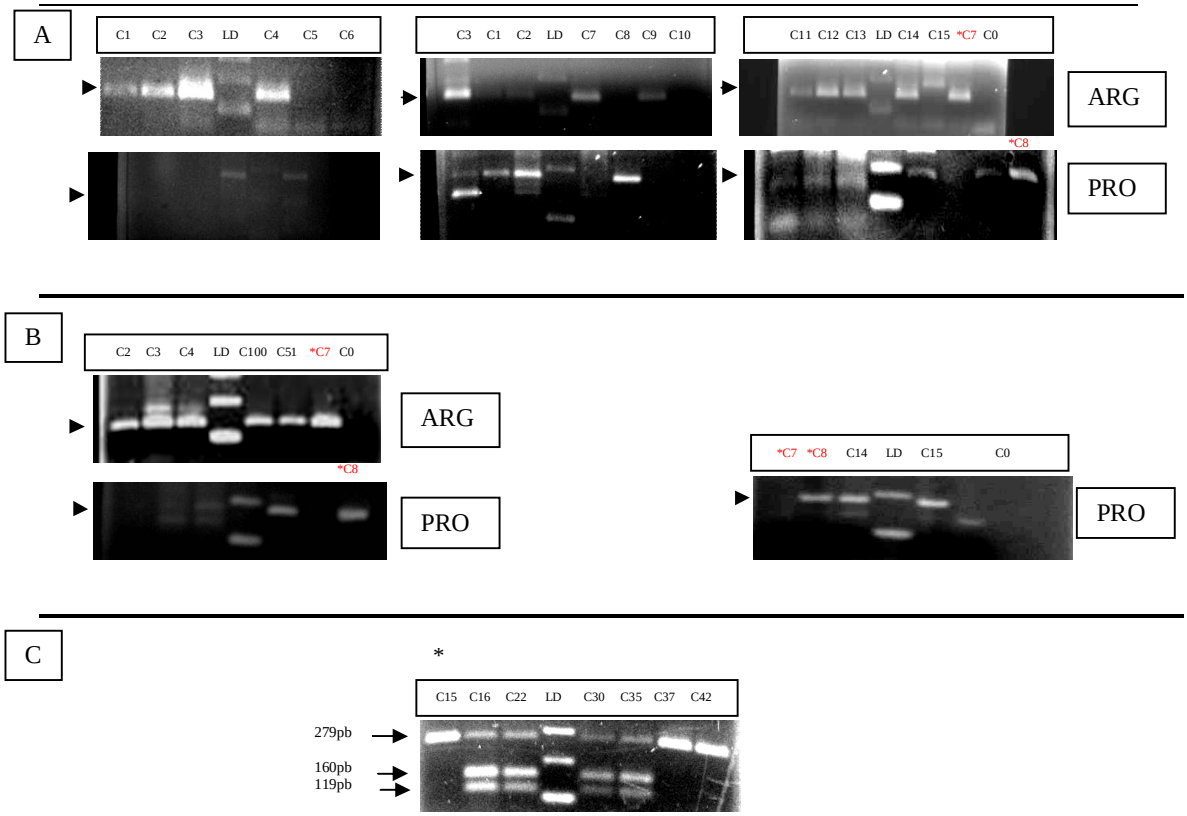


Tabela 5. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
ARG/ARG					C	C	X		X	C	X	X	X		
ARG/PRO	X	X	X	X	C	C				C				X	
PRO/PRO					C	C		X		C					X
BSTUI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pro/Pro

Figura 5: A: *Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C1 ao C15), após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na quarta canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro.* ***B:*** *Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). C0 = controle negativo. C6 e C7: controles negativos iniciais (água milli-Q para descartar a hipótese de contaminação.* ***C:*** *Confirmação do genotipo Pro/Pro da amostra C15 (*) mediante enzima de restrição (BstUI). Única banda de 279 pb: homozigoto prolina Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto arginina (Arg/Arg) e a presença das três bandas são os heterozigotos(Arg/Pro).*

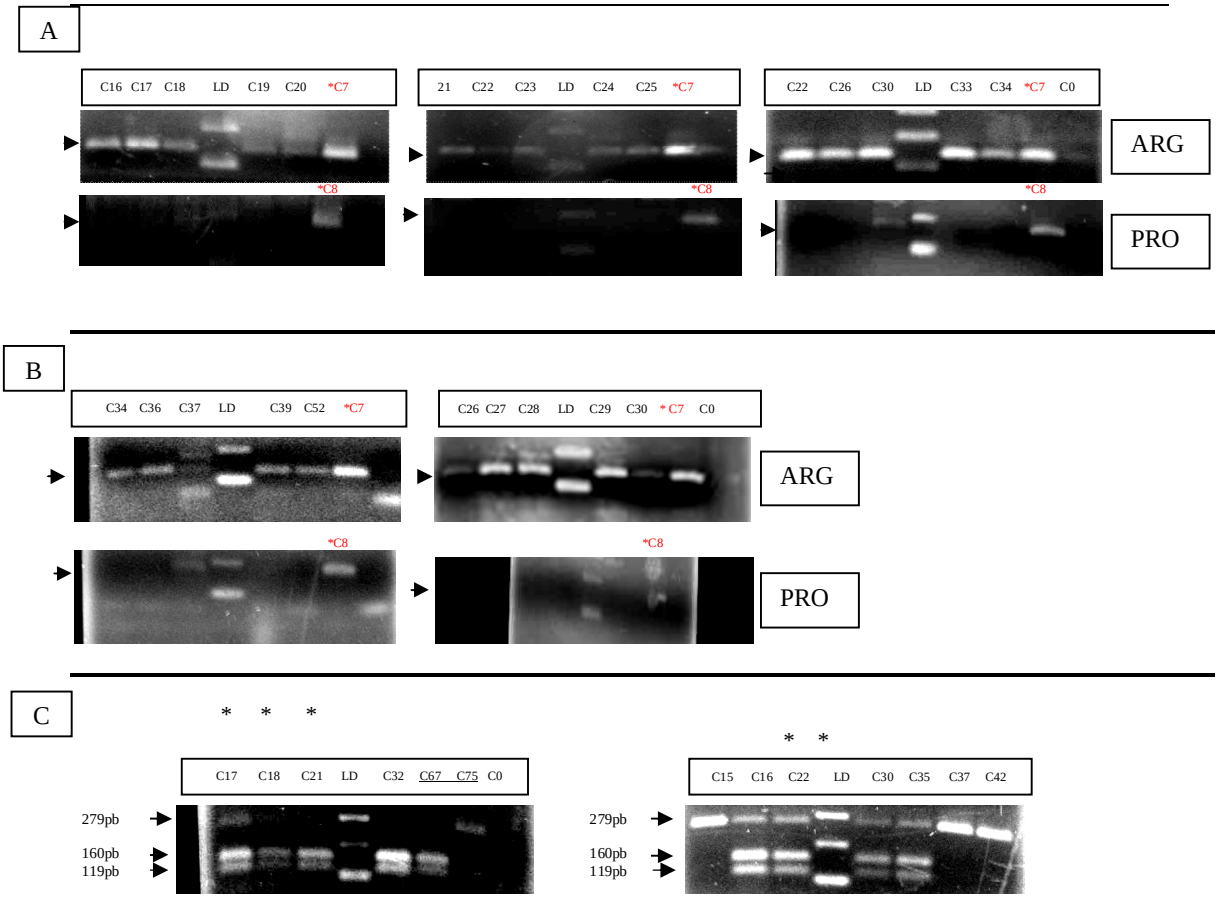


Tabela 6. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26
ARG/ARG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ARG/PRO											
PRO/PRO											
BSTUI	Arg/Pro	Arg/Pro	Arg/Arg			Arg/Arg	Arg/Pro				

Figura 6*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C16 ao C26), após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na quarta canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro. **B:** Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). C0= Controle negativo. **C:** Amostras sublinhadas são controles positivos homozigoto Arginina C67 e homozigoto prolina C75. Confirmação do genotipo Arg/Pro da amostra C16 (*), Arg/Pro da amostra C17 (*), Arg/Pro da amostra C18(*), Arg/Arg da amostra C21(*), Arg/Pro da amostra C22(*). Única banda de 279 pb: homozigoto prolina Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto arginina Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigoto Arg/Pro.*

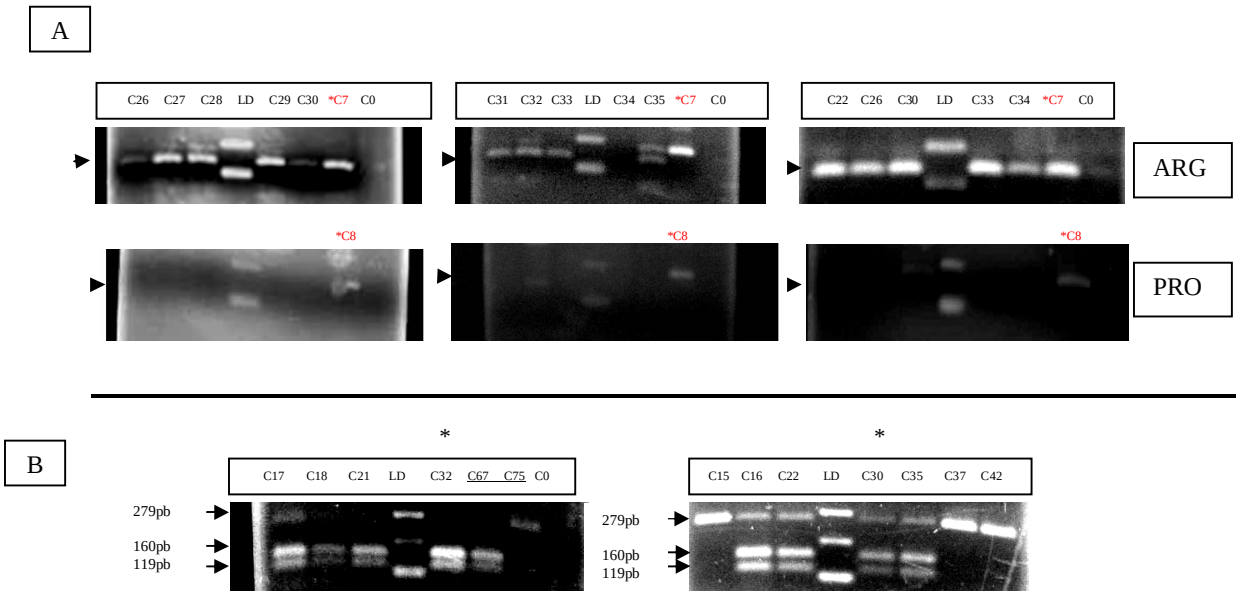
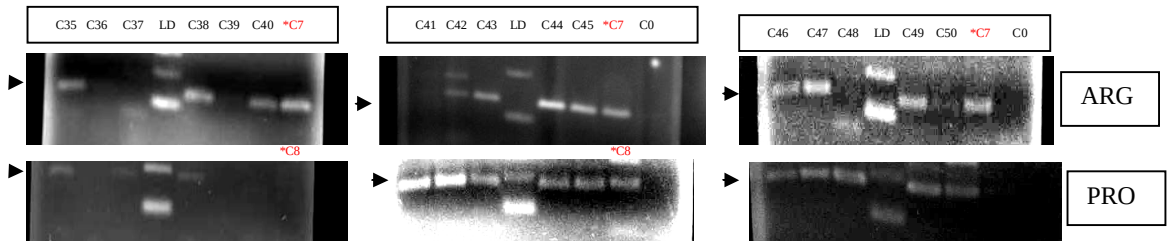


Tabela 7. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

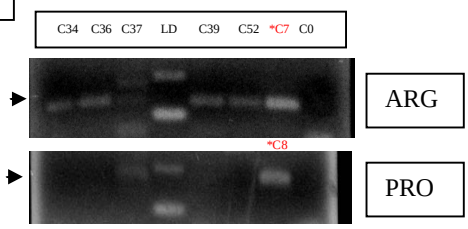
	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34
ARG/ARG	X	X	X	X		X	X	X	X
ARG/PRO					X				
PRO/PRO									
BSTUI					Arg/Pro		Arg/Arg		

Figura 7: A*: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C26 ao C34), após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na quarta canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro.* ***B****: Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). C0 = controle negativo).* ***C:*** *Amostras sublinhadas: são os controles positivos para homozigoto arginina C67 (Arg/Arg) e homozigoto prolina C75 (Pro/Pro).* Confirmação do genotipo Arg/Pro da amostra C30, Arg/Arg da amostra C32. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

A



B



C

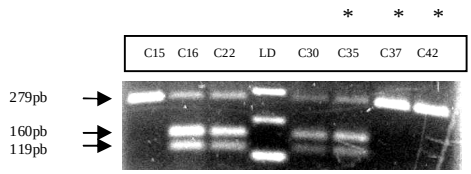


Tabela 8. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

Genótipo	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50
ARG/ARG		X			X	X										
ARG/PRO	X			X				X	X	X	X	X	X		X	X
PRO/PRO			X				X							X		
BSTUI	Arg/Pro		Pro/Pro					Pro/Pro								

Figura 8*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C35 ao C50, após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na quarta canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro.* ***B****: Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72).* ***C:*** Confirmação do genotipo Arg/Pro da amostra *C35, Pro/Pro *C37 e Pro/Pro da amostra *C42. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

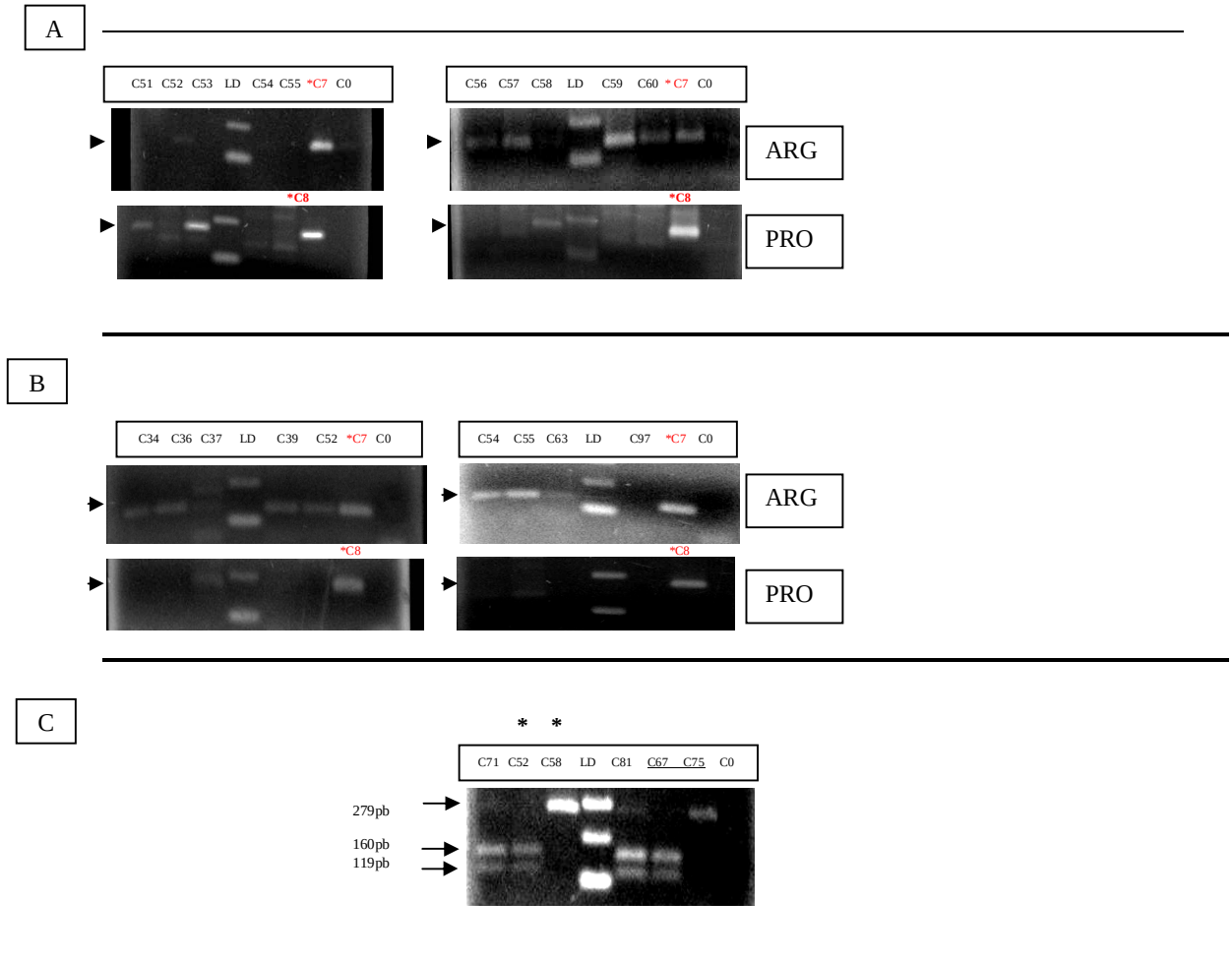


Tabela 9 *. Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

Genótipo	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57	C58	C59	C60
ARG/ARG		X		X	X	X	X		X	X
ARG/PRO	X									
PRO/PRO			X					X		
BstUI		Arg/Arg						Pro/Pro		

Figura 9*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C51 ao C60) após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na quarta canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro. **B**: Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). **C:** Amostras sublinhadas: são os controles positivos para homozigoto arginina C67 (Arg/Arg) e homozigoto prolina C75 (Pro/Pro).* Confirmação do genotipo Arg/Arg da amostra C52 e Pro/Pro da amostra C58. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

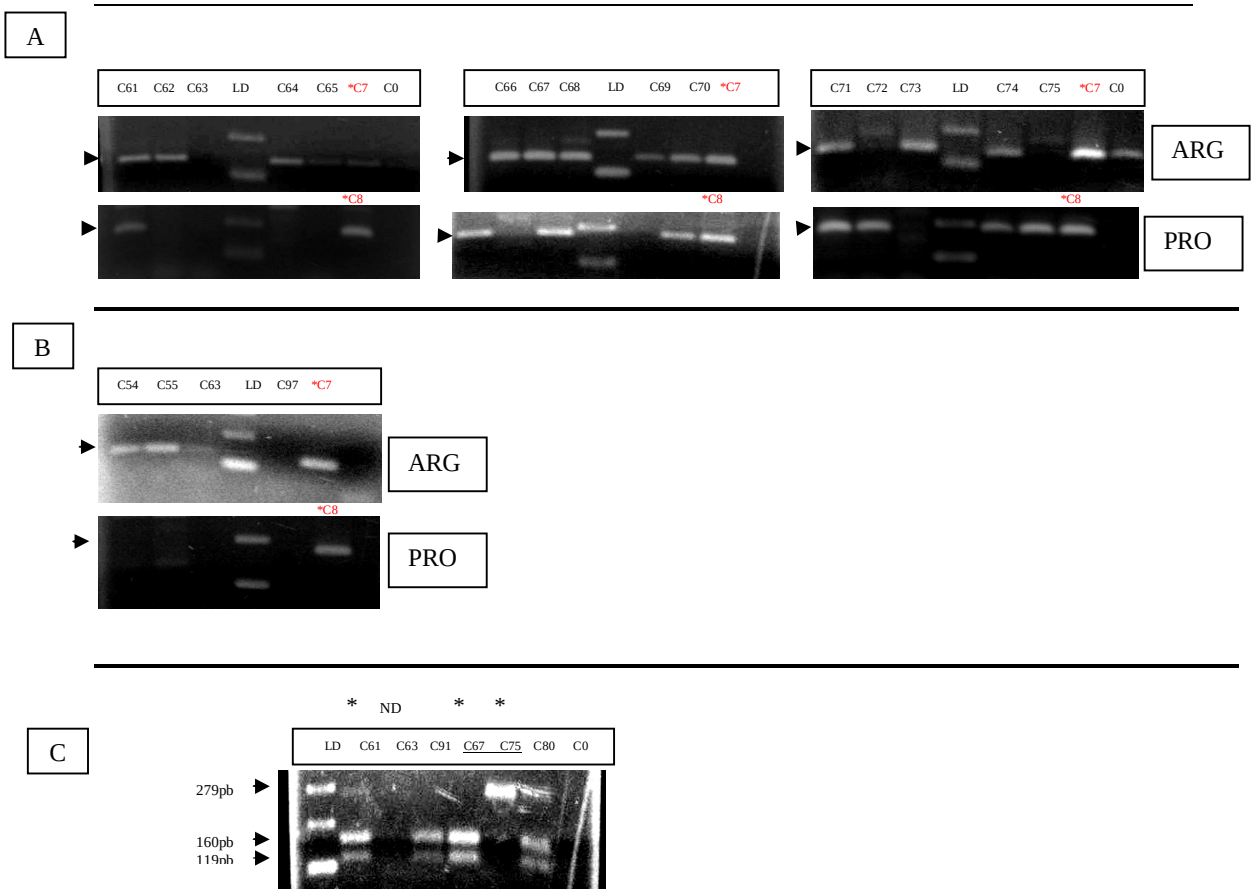


Tabela 10. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67	C68	C69	C70	C71	C72	C73	C74	C75
ARG/ARG		X	X	X	X		X		X				X		
ARG/PRO	X					X		X		X	X			X	
PRO/PRO												X			X
BSTUI	Arg/Pro		ND				Arg/Arg								Pro/Pro

ND: Não determinada.

Figura 10*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C61 ao C75) após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na primeira canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro. **B**: Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). **C:** Amostras sublinhadas: são os controles positivos para homozigoto arginina C67 (Arg/Arg) e homozigoto prolina C75 (Pro/Pro).* Confirmação do genotipo Arg/Pro da amostra C61, Arg/Arg da amostra C67 e Pro/Pro da amostra C75. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

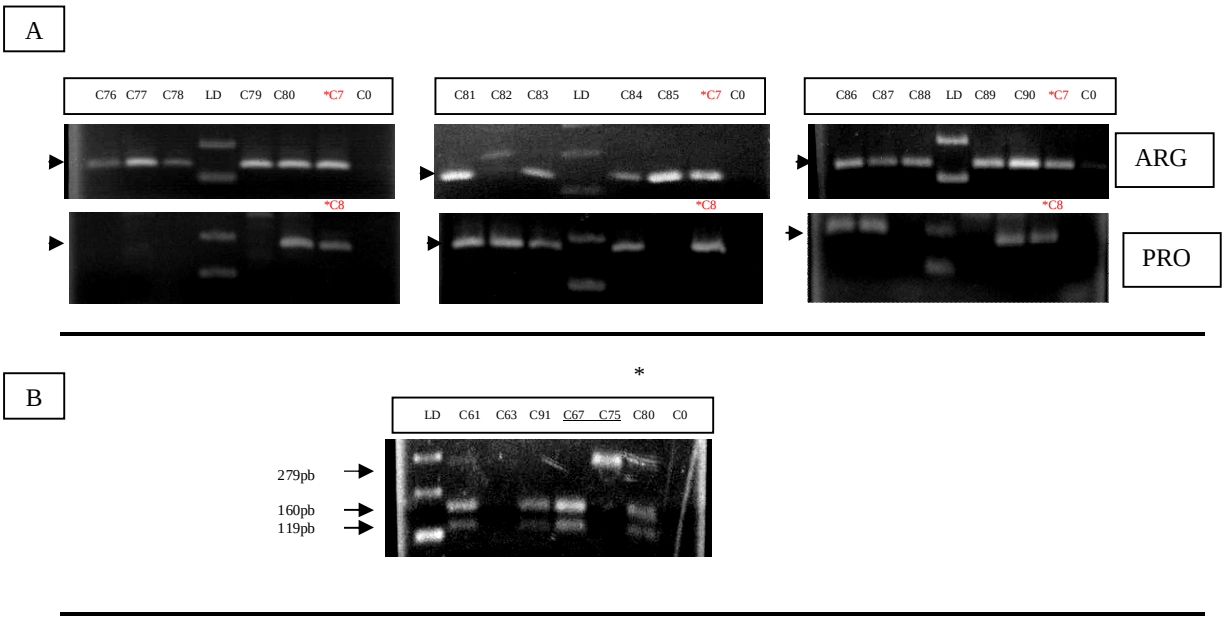
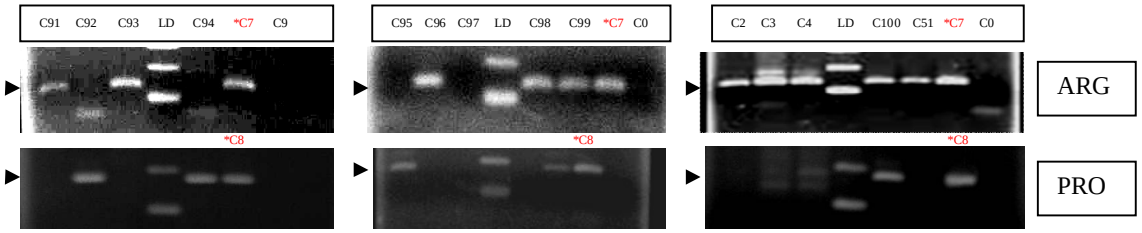


Tabela 11. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

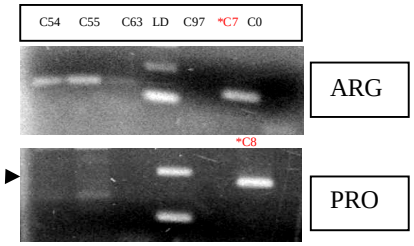
	C76	C77	C78	C79	C80	C81	C82	C83	C84	C85	C86	C87	C88	C89	C90
ARG/ARG	X	X	X	X						X			X	X	
ARG/PRO					X	X		X	X		X	X			X
PRO/PRO							X								
BSTUI					Arg/Pro										

Figura 11*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C76 ao C90) após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na primeira canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72).* **B:** *Amostras sublinhadas: são os controles positivos para homozigoto arginina C67 (Arg/Arg) e homozigoto prolina C75 (Pro/Pro).* Confirmação do genotipo Arg/Pro da amostra C80. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

A



B



C

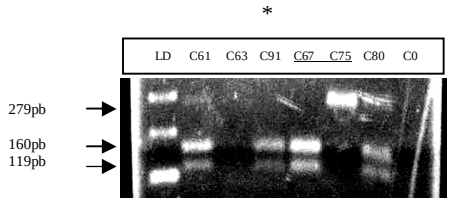


Tabela 12. *Dados organizados de acordos com os resultados dos geis apresentados acima para um melhor entendimento.*

	C91	C92	C93	C94	C95	C96	C97	C98	C99	C100	C2	C3	C4	C51
ARG/ARG	X		X			X		X						
ARG/PRO										X	X	X	X	
PRO/PRO		X		X	X				X					
BSTUI	Arg/Arg						ND							

ND: não determinado

Figura 12*: **A**: Genotipagem demonstrando os produtos de PCR (C91 ao C100) após corrida em gel de agarose (2%). O peso molecular de 100 pb (LD, ladder) encontra-se na primeira canaleta de cada gel. As setas indicam o produto de interesse sendo as bandas de 141 pb correspondentes ao alelo p53Arg/72 e as bandas de 177 pb correspondem ao alelo p53Pro/72. O voluntários que possuem apenas uma banda p53Arg/72 homozigoto arginina Arg/Arg. Desta forma os que possuem apenas uma banda p53Pro/72 são homozigotos prolina Pro/Pro. E os que possuem as duas bandas são heterozigotos Arg/Pro. **B**: Repetições de PCR com aumento na quantidade de DNA e também a quantidade de amostra aplicada no gel. Amostras em vermelho: são os controles positivos para arginina C7 = (p53Arg/72) e para prolina C8 = (p53Pro/72). **C:** Amostras sublinhadas: são os controles positivos para homozigoto arginina C67 (Arg/Arg) e homozigoto prolina C75 (Pro/Pro).* Confirmação do genotipo Arg/Arg da amostra C91. Única banda de 279 pb: homozigoto Pro/Pro, duas bandas de 160 e 119 pb: homozigoto Arg/Arg e a presença das três bandas são os heterozigotos Arg/Pro.

4.3. Análise da distribuição alélica e genotípica do códon 72/*p53*

4.3.1. Cor de pele

Primeiramente verificamos a distribuição das frequências alélicas para p53Arg/72 e para p53Pro/72 no codon 72 dos 96 voluntários, e os resultados foram 67,70% e 32,30% respectivamente.

A distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro foi de 50,00%, 35,40%, 14,60% respectivamente e encontra-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Um dos itens avaliados no questionario (Anexo 2) foi o referente a cor da pele (branca e morena) com o objetivo de se verificar uma possivel associação entre a cor da pele e frequências genotipica e alélica.

A distribuição alélica entre a população que se autodeclarou branca foi de 51 (68,90%) para o alelo p53Arg/72 e 23 (31,10%) para o alelo p53Pro/72, enquanto que esta distribuição entre os morenos foi de 79 (66,90%) para o alelo p53Arg/72 e 39 (33,10%) para o alelo p53Pro/72. Pelo teste de diferenciação populacional, a diferença gênica entre brancos e morenos não se mostrou significante (p = 0,776) evidenciando uma distribuição alélica equivalente entre esses grupos (Tabela 13). A determinação da cor da pele baseada na autodeclaração criou um viés decorrente da dificuldade de se padronizar a cor. Além disso a população brasileira possui uma grande interetnicidade e resultados controversos quanto a autodeclaração também dificultou o estudo de associação.

Tabela 13. *Polimorfismo do gene p53 dos 96 voluntários, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a frequência (%) alélica para cada polimorfismo para a cor da pele.*

Alelos	**Brancos** **N (%)**	**Morenos** **N (%)**
Arg	51 (68,90)	79 (66,90)
Pro	23 (31,10)	39 (33,10)
Total	74 (100,00)	118 (100,00)

O valor de p encontrado pelo teste de Qui-quadrado (X^2) foi de 0,776.

A distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro entre a população que se autodeclarou branca foi de 19 (51,40%), 13 (35,10%) e 5 (13,50%) e para a distribuição de genótipos entre morenos foi de 29 (49,10%), 21 (35,60%) e 9 (15,30%) respectivamente (Tabela 14). Pelo teste de diferenciação populacional, a diferença genotípica entre as populações (brancos e morenos) não se mostrou significante (p = 0,965). Desta forma podemos concluir que não foi observada uma associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* e a cor da pele.

Tabela 14. *Polimorfismo do gene p53 dos 96 voluntários, evidenciando os genótipos encontrados entre brancos e morenos e a frequência (%) genotípica para cada polimorfismo.*

Genótipo	**Brancos** N (%)	**Morenos** N (%)
Arg/Arg	19 (51,40)	29 (49,10)
Arg/Pro	13 (35,10)	21 (35,60)
Pro/pro	5 (13,50)	9 (15,30)
Total	37 (100,00)	59 (100,00)

O valor de p encontrado pelo teste de Qui-quadrado (X^2) foi de 0,965.

4.3.2. Resposta da pele à exposição solar

A seguir avaliamos a frequência dos genótipos entre os 95 voluntários que responderam ao questionário afirmando que apresentam vermelhidão ou se bronzeiam logo após a exposição à luz solar. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela a 15. Para os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro encontramos os valores de 18 (50,00%), 12 (33,30%) e 6 (16,70%), respectivamente, entre as pessoas que demonstraram vermelhidão. Da mesma forma para os que se bronzeiam encontramos 30 (50,90%), 21 (35,60%) e 8 (13,50%), respectivamente. Considerando as frequências genotípicas, nosso estudo demonstrou que não houve associação entre apresentar vermelhidão após exposição solar e o genótipo (p = 0,678 e OR = 1.275) [Tabela 15].

Tabela 15. *Polimorfismo do gene p53 dos 95 voluntários que responderam quanto à característica de apresentar vermelhidão ou se bronzear facilmente após exposição ao sol, evidenciando os genótipos e suas frequências (%) para cada polimorfismo. OR: (Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.*

Genótipo	**Vermelhidão N (%)**	**Bronzeamento N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	18 (50,00)	30 (50,90)	0,936	0,966 (0,421-2.210)
Arg/Pro	12(33,30)	21 (35,60)	0,822	0,904 (0,377-2.169)
Pro/Pro	6 (16,70)	8 (13,50)	0,678	1.275 (0,403-4.030)
Total	36 (100,00)	59 (100,00)		

4.3.3. Cor de cabelos

Em nossas amostras de voluntários, 89 (92,70%) apresentaram cabelos castanhos/pretos e 7 (7,30%) tinham cabelos loiros. Entre os que apresentaram cabelos castanhos e responderam que apresentam vermelhidão após exposição ao sol, em relação aos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro, encontramos os valores de 14 (43,80%), 13 (40,60%) e 5 (15,60%), respectivamente. Da mesma forma para os que responderam que se bronzeiam facilmente quando expostos ao sol as frequências foram: 29 (51,80%), 20 (35,70%) e 7 (12,50%) (Tabela 16). Quando analisamos as mesmas variáveis para os cabelos loiros, observamos para os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro os valores de 3 (75,00%), 0 (00,00) e 1 (25,00%) entre os que apresentaram vermelhidão e 1 (33,33%) para cada genótipo respectivamente (Tabela 17).

Na associação entre a resposta a exposição à luz solar (vermelhidão ou se bronzear) e o genótipo para voluntários com cabelos castanhos/pretos, não observamos uma associação entre os genótipos e a vermelhidão após exposição solar. Da mesma forma para os voluntários que apresentaram cor de cabelo loiro, não detectamos uma associação entre os que

apresentaram vermelhidão com os genótipos apesar do alto valor de *odds ratio (*OR= 6.000), para o genótipo Arg/Arg (Tabela 17). Isso nos sugere que o apresentar vermelhidão após a exposição à UVR em associação com o genótipo não depende da cor do cabelo dos voluntários.

Tabela 16. *Polimorfismo do gene p53 de 88 voluntários com cabelos castanhos/pretos, evidenciando a quantidade (N) de alelos genotipados e a frequência (%) alélica para cada polimorfismo e relacionando com a resposta da pele ao sol após exposição solar. OR: (Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.*

Genótipo	**Vermelhidão N (%)**	**Bronzeamento N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	14 (43,80)	29 (51,80)	0,468	0,724 (0,302-1.734**)**
Arg/Pro	13 (40.60)	20 (35,70)	0,647	1.232 (0,504-3.007)
Pro/Pro	5 (15,60)	7 (12,50)	0,681	1.296 (0,375-4.481)
Total	32 (100,00)	56 (100,00)		

Tabela 17. *Polimorfismo do gene p53 de 7 voluntários com cabelos loiros, evidenciando a quantidade (N) de alelos genotipados e a freqüência (%) alélica para cada polimorfismo e relacionando com a resposta da pele após exposição solar. OR: (Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.*

	Cor de cabelo (Loiro)			
Genótipo	**Vermelhidão N (%)**	**Bronzeamento N (%)**	***p***	**OR(95%IC)**
Arg/Arg	3 (75,00)	1 (33,33)	0,270	6.000 (0,221-162.7)
Arg/Pro	0 (00,00)	1 (33,33)	0,212	0,185 (0,005-6.481)
Pro/Pro	1 (25,00)	1 (33,33)	0,809	0,666 (0,002-18.07)
Total	4 (100,00)	3 (100,00)		

4.3.4. Cor de olhos

Entre os nossos 96 voluntários, 85 (88,50%) apresentaram olhos castanhos-pretos e 11 (11,50%) tinham olhos azuis/verdes. Entre os que apresentaram olhos castanhos/pretos e responderam que apresentam vermelhidão após exposição ao sol em relação aos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro encontramos os valores de: 15 (50,00%), 12 (40,00%) e 3 (10,00%), respectivamente. Da mesma forma para os que responderam que se bronzeiam facilmente quando expostos ao sol as frequências foram: 28 (50,90%), 19 (34,50%) e 8 (14,60%) [Tabela 18]. As mesmas variáveis analisadas para os olhos azuis/verdes resultaram para os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro os valores de 2 (33,30%), 1 (16,70) e 3 (50,00%) entre os que apresentaram vermelhidão, e: 2 (50,00%), 2 (50,00%) e 0 (00,00%) respectivamente (Tabela 19).

Tabela 18. *Polimorfismo do gene p53 de 85 voluntários com olhos castanho-pretos, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a frequência (%) para cada polimorfismo e relacionando com a resposta da pele ao sol após exposição solar. OR: (Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de Confiança.*

Genótipo	**Vermelhidão** **N (%)**	**Bronzeamento** **N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	15 (50,00)	28 (50,90)	0,936	0,964 (0,0,396-2.348**)**
Arg/Pro	12 (40,00)	19 (34,50)	0,617	1.263 (0,504-3.164)
Pro/Pro	3 (10,00)	8 (14,60)	0, 550	0,652 (0,159-2.671)
Total	30 (100,00)	55 (100,00)		

Na associação entre a resposta a exposição à luz solar (vermelhidão ou se bronzear) e o genótipo para voluntários com olhos castanhos/pretos, não observamos nenhuma relação. Por outro lado, encontramos um valor alto de *odds ratio* (OR= 9.000) para a associação entre o genótipo Pro/Pro e a vermelhidão após exposição solar entre indivíduos que apresentaram olhos azuis/verdes (Tabela 19).

Tabela 19. *Polimorfismo do gene p53 de 10 voluntários com olhos azuis/verdes, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a frequência (%) para cada polimorfismo e relacionando com a resposta da pele ao sol após exposição solar. OR: (Odds Ratio) razão de risco, IC: Intervalo de confiança.*

Genótipo	**Vermelhidão N (%)**	**Bronzeamento N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	2 (33,30)	2 (50,00)	0,598	0,500 (0,0373-6.688**)**
Arg/Pro	1 (16,70)	2 (50,00)	0, 259	0,200 (0,010-3.666)
Pro/Pro	3 (50,00)	0 (00,00)	0, 091	9,000 (0,339-238.4)
Total	6 (100,00)	4 (100,00)		

Devido a esta alta tendência de associação entre um fenótipo especifico (olhos azuis/verdes) com o genótipo Pro/Pro entre os que apresentaram vermelhidão, analisamos a associação entre a cor dos olhos e o genótipo apenas entre os que apresentam vermelhidão, observamos uma associação significativa entre os que possuem olhos azuis/verdes e o genótipo Pro/Pro (*p = 0,01)* (Tabela 21).

Tabela 20. *Polimorfismo do gene p53 de 36 voluntários que apresentam vermelhidão, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a frequência (%) para cada polimorfismo e relacionando com a cor dos olhos. OR: (Odds Ratio - razão de risco), IC: Intervalo de Confiança.*

Genótipo	**Azuis/verdes N (%)**	**Castanhos/pretos N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	2 (33,30)	15 (50,00)	0,673	0,070 (0,1324-3.701)
Arg/Pro	1 (16,70)	12 (40,00)	0,233	0,272 (0,0288-2.579)
Pro/Pro	3 (50,00)	3 (10,00)	**0,01**	**6,500 (0,9568-44,16)**
Total	6 (100,00)	30 (100,00)		

Em seguida, ao analisarmos a associação entre a cor dos olhos e o genotipo entre os que se bronzeiam facilmente entre os que apresentam vermelhidão, não observamos a associação entre o Pro/Pro e a cor de olhos azuis/verdes (Tabela 21).

Tabela 21. *Polimorfismo do gene p53 de 59 voluntários que apresentam vermelhidão, evidenciando a quantidade de alelos genotipados e a frequência (%) para cada polimorfismo e relacionando com a cor dos olhos. OR: (Odds Ratio - razão de risco), IC: Intervalo de Confiança.*

Genótipo	**Azuis/verdes N (%)**	**Castanhos/pretos N (%)**	***p***	**OR (95%IC)**
Arg/Arg	2 (50,00)	28 (50,90)	0,972	0,964 (0,126-7.346)
Arg/Pro	2 (50,00)	20 (36,70)	0,558	1.750 (0,228-13.40)
Pro/Pro	0 (00,00)	7 (12,40)	0,447	0,718 (0,003-14.75)
Total	4 (100,00)	55 (100,00)		

Apesar do alelo p53Pro/72 conferir à proteína uma melhor capacidade melanogênica, ele foi mais frequente em voluntários com fenotipos relacionadas a uma menor pigmentação (cabelos e olhos claros).

5. DISCUSSÃO

A presente dissertação de mestrado trata-se de um estudo sobre polimorfismo do gene humano *p53* associado com características de pigmentação uma vez que essa substituição comum de apenas um par de bases no códon 72 desse gene muda a morfofisiológica da proteína. Essa mudança altera suas funções dentre elas, a atuação no início da cascata de pigmentação agindo como fator de transcrição para outros genes críticos na produção de melanina. Estas novas funções genoprotetoras de p53 demonstram que o bronzeamento (produção de melanina após exposição solar) é parcialmente controlado por p53 Nan *et al.*, 2008).

Em nossos estudos iniciais de associação entre o polimorfismo do gene *p53* no códon 72 e a pigmentação humana, observamos a prevalência do genótipo homozigoto Arg/Arg em mais da metade dos voluntários (67,70%) sendo, portanto o genótipo mais frequente. A diferença genotípico/alélica entre brancos e morenos não se mostrou significativa (p = 0,776 e 0,965) desta forma a população estudada possui uma distribuição semelhante. Quanto à cor da pele, tivemos dificuldades em analisar o polimorfismo em relação a esta característica de pigmentação devido à enorme variedade étnica juntamente com a dificuldade de estabelecer uma padronização para a cor da pele assim como resultados controversos na autodeclaração.

Outro fator importante observado foi quanto à reação da pele após exposição solar (vermelhidão ou bronzeamento). Neste caso observamos o valor encontrado de 1, 275 para OR entre o genótipo Pro/Pro e vermelhidão embora essa associação não apresentasse significância estatística (0, 678).

A associação entre os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro com a resposta da pele ao sol em apresentar vermelhidão não depende da cor do cabelo. Porém, quando analisamos outro fenótipo como cor dos olhos, observamos uma associação entre Pro/Pro e olhos azuis para os que apresentam vermelhidão (p = 0,01) estabelecendo um fenótipo característico agindo em sinergismo com genótipo para uma resposta a exposição solar desfavorável, resultado semelhante

ocorre com o fenótipo cabelo ruivo. De acordo com Duarte (2008) esse fenótipo representa indivíduos com variantes do MC1R e pode aumenta o risco para o desenvolvimento do melanoma cutâneo nesses indivíduos. Estes resultados estão semelhantes aos resultados obtidos por Cui *et al.* (2006) e Nan *et al.* (2008) onde eles observam uma associação do alelo p53Pro/72 com risco para pigmentação patológica dentre elas como o melanoma.

Vários estudos foram feitos para avaliar os efeitos das variantes do gene *p53* na progressão do ciclo celular. Pim & Banks (2004) perceberam uma diferença marcante na atividade biológica das duas formas polimórficas p53Arg/72 e p53Pro/72 e concluíram que o p53Pro/72 interage de maneira mais eficaz com elementos da maquinaria transcricional que a forma p53Arg/72 desempenhando assim um papel significativo no sucesso da fase G1, induzindo fortemente o p21 um inibidor de CDK. Por outro lado, a forma p53Arg/72 é significativamente mais eficiente que a forma p53Pro/72 na indução apoptótica apresentando maior habilidade para localizar a mitocôndria e induzir a morte celular, é eficiente também na eliminação de oncócitos na supressão de transformações neoplásicas (Orsted *et al.,* 2007; Bendesky *et al.,* 2007). Adicionalmente, variantes do gene *p53* parece conferir respostas diferenciadas a quimioterapia, a radioterapia, resultando em uma menor sobrevida de pacientes. Recentemente, essa variante vem sendo relacionada à produção de melanina (Nan *et al.,* 2008). Lima *et al.* 2006 observaram uma prevalência entre Arg/Arg e câncer colorretal, Orsted *et al.* (2007) também demonstraram que o polimorfismo pode não diminuir o risco de câncer mas aumenta a sobrevida após diagnostico. Estudos, evidenciam novos alvos para p53, indicando que os polimorfismos no gene da proteína influenciam não somente no desenvolvimento direto da carcinogênese, mas também em outros processos em todo o organismo (Orsted *et al.,* 2007).

Os estudos de causalidade em câncer são extremamente complexos, pois a sua história natural é um processo de múltiplos estágios, onde há uma série de causas atuando de maneira pouco conhecida nas fases de indução, promoção e progressão da doença. De uma forma

geral, o polimorfismo e nenhuma causa é necessária ou suficiente por si mesma para levar à ocorrência do câncer, há sempre vários eventos associados para a etiologia da doença.

De acordo com Gwosdz *et al.* (2006), estudos moleculares epidemiológicos têm explorado a associação entre o polimorfismo do *p53* no códon 72 e diferentes tipos de cânceres incluindo de pulmão, de pele como SCC (carcinoma de células escamosas) e de cabeça e pescoço. McGregor *et al.* (2002) observaram uma associação entre o alelo p53Arg/72, fototipo I-II e queimaduras provocadas após exposição a UVR assim como o desenvolvimento de BCC e SCC. Pezeshki *et al.* (2006), sugeriu uma associação entre o alelo p53Arg/72 com o risco para BCC após exposição a UVR. Da mesma forma Shen *et al. (*2003) demonstraram uma associação entre o genótipo Arg/Arg com pessoas acima de 50 anos e o risco para melanoma cutâneo, porém nenhuma variante polimórfica desse gene tem sido ligado de forma conclusiva ao risco de cânceres de pele. O polimorfismo do *p53* tem sido citado com um fator que pode agir sinergicamente com outros fatores de etiologia para carcinogênese, mas os resultados se encontram controversos sugerindo que ora o alelo p53Arg/72 ora o alelo p53Pro/72 se comportam como vilão.

Com nossos estudos surgiram várias perspectivas geradas para a continuidade desse trabalho devido complexidade da via de pigmentação e também pelas características citadas na literatura em relação ao comportamento da proteína em quando há presença de p53Arg/72 ou p53Pro/72. Os trabalhos na área da epidemiologia molecular abrem novas expectativas na pesquisa em relação à importância de vários outros genes envolvidos características de pigmentação, dentre eles, o *p53*, a utilidade dos marcadores moleculares quando os indivíduos são expostos a agentes ambientais e com isso poderemos estabelecer qual genótipo ou alelo responde melhor ao sol e esclarecer o papel da susceptibilidade genética nas estratégias de prevenção e tratamento de doenças com prognóstico obscuro como o câncer de pele principalmente do tipo melanoma. Qualquer proposta de estudo com o objetivo de entender

melhor como a pele reage ao sol e quais genes estão envolvidos e como eles são expressos é um desafio. Este estudo foi iniciado com motivação para realização de pesquisas básicas que pudessem de alguma forma, fornecer uma maior quantidade de dados para as pesquisas de ponta, que são as principais responsáveis pela determinação de avanços no diagnóstico, tratamento e consequentemente no prognóstico das várias doenças estudadas, dentre elas, os cânceres de pele. À medida que os avanços técnico-científicos acontecem, as condutas clínicas podem ser ajustadas aumentando assim a chance de profilaxia contra câncer de pele ou tratamento bem-sucedido para quem já é portador melhorando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes.

A avaliação epidemiológica citada nesta dissertação apontou os hábitos de exposição à UVR (externos) e comportamento gênico (internos) com as características de pigmentação bem como os principais fatores de risco associados a uma boa ou má resposta ao sol em termos de produção de melanina (bronzear ou apresentar vermelhidão).

Normalmente quando se tenta estabelecer alguma interação genotípica ou alélica com o polimorfismo, a doença já está instalada e na maioria das vezes apresentando um prognóstico desfavorável ao individuo. Desta maneira, surge a necessidade de estabelecer quais frequências genotípicas e alélicas se relacionam com uma resposta da pele quando exposta ao sol em voluntários saudáveis antes do desenvolvimento da doença. Desta forma estabeleceremos campanhas de prevenção mais direcionadas uma vez que a produção de melanina camufla a necessidade de maiores cuidados quanto à exposição à UVR.

6. CONCLUSÃO

Não foram detectadas associações entre as características de pigmentação cor de pele e cabelo e o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* em níveis significantes. Observamos uma associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* e a característica de apresentar vermelhidão embora não significante estatisticamente. A observação de uma associação significativa entre os olhos azuis/verdes com o genótipo Pro/Pro entre os que apresentaram vermelhidão estabelece fenótipos específicos (cor de olho) associado a variantes gênicas que podem elevar o risco de desenvolvimento para algumas patologias de pigmentação (apresentar vermelhidão). Com uma genotipagem em maior escala, os resultados significantes poderão definir qual genótipo ou alelo na nossa população se associa com fenótipo de apresentar vermelhidão ou se bronzear, possibilitando desta forma um direcionamento para aconselhamentos genéticos, meios de profilaxia e campanhas de prevenção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **BENDESKY A.; ROSALES A.; SALAZAR A M.; SORDO M.; PENICHE J.; OSTROSKY-WEGMAN P.** p53 Codon 72 Polymorphism, DNA Damage and Repair, and Risk of Non-melanoma Skin Cancer. Mutation Research 619 (2007) 38-44

- **BENJAMIN C L & ANANTHASWAMY H N.** p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 November 1; 224(3): 241-248.

- **CASTRO E A.** Expressão da Proteína p53 em Diferentes Níveis de Foto envelhecimento da Pele. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

- **CUI R.; WIDLUND H R.; FEIGE E.; LIN J. Y.; WILENSKY D L.; IGRAS V E.; ORAZIO J.; FUNG C Y.; SCHANBACHER C F.; GRANTER S R.; FISHER D E.** Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. Cell 2006. 12.045.

- **DUARTE T D.;** Variantes Moleculares do MC1R e o Melanoma Cutâneo: Um Estudo Caso-Controle. Expressão Acadêmica, Universidade Federal de Goiás, 2008.

- **DUVIVIER A MCKEE.** Atlas de Dermatologia Clínica. Editora Manole, 1995.

- **FERREIRA C G & ROCHA** J. C. Oncologia Molecular. Atheneu Editora, São Paulo, 2004.

- **FETT-CONTE A & SALLES A B C F.** A importância do Gene p53 na Carcinogênese humana. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia vol.24 no.2 São José do Rio Preto. Junho 2002.

- **FRANCHI A.; MASSI D.; GALLO O.; SANTUCCI M.; PORFIRIO, B.** Radiation-Induced Cutaneous Carcinoma of the Head and Neck: Is There an Early Role for p53 Mutations?. Jornal Compilation 2006 Blackwell Publishing Ltda. Clinical and Experimental Dermatology, 31, 793-798.

- **FIROUZABADI R D.; GHASEMI N.; ROZBAHANI M A.; TABIBNEJAD N.** Association of p53 Polymorphism with ICSI/IVF Failure and Recurrent Pregnancy Loss. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology 2009; 49: 216-219.

- **GALLI, P.; CADONI, G.; VOLANTE, M.; FEO, E. D.; AMORE, R.; GIOGIO, A.; ARZANI, D.; PALUDETTI, G.; RICCIARDI, G.; BOCCIA, S.** A Case – control Study on the Combined Effects of p53 and p73 Polymorphism on Head and Neck Cancer Risk in an Italian Population. BCM Cancer 2009, 9:137.

- **GWOSDZ C.; SCHECKENBACH K.; LIEVEN O.; REIFENBERGER J.; KNOPF A.; BIER H.; BALZ V.** Comprehensive Analysis of the p53 Status in Mucosal and Cutaneous Melanomas. International Journal Cancer: 118, 577-582 (2006).

- **HAMÚ C S.; OLIVEIRA M V P.; SILVA M T C**. *et al.* Polimorfismo do Gene tp53 no Códon 72 em Pacientes com suspeita de LMC. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia vol. 29 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2007.

- **HAN J.; KRAFT P.; NAN H.; GUO Q.; CHEN C.; QURESHI A.; HANKINSON S E.; HU F B.; DUFFY D L.; ZHAO Z Z.; MARTIN N G.; MONTGOMERY G W.; HAYWARD N K.; THOMAS G.; HOOVER R N.; CHANOCK S.; HUNTER D J.** A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Alleles Associated With Hair Color and Skin Pigmentation. PloS Genetics, May 2008 vol. 4.

- **HONG Y.; MIAO X.; ZHANG X.; DING F.; LUO A.; GUO W.T.; LIU Z.; LIN D.** The Role of p53 and MDM2 Polymorphisms in the Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Cancer Res 2005; 65: (20). October 15, 2005.

- **HSIEH Y. & LIN C.** P53 Codon 11, 72, and 248 Gene Polymorphisms in Endometriosis. International Journal of Biological Sciences. 2006; 2(4): 188-193.

- IARC: *International Agency for Research on Cancer*. Agencia Internacional para Pesquisa de Cancer. Acesso em 04 de Fevereiro de 2010.

- **JEONG B.; HU W.; BELYIV.; RABADAN R.; LEVINE,A. J.** Differential Levels of Transcription of p53-regulated Genes by the Arginine/Proline Polymorphism: p53 with Arginine at Codon 72 Favors Apoptosis. The FASEB Journal Research Communication. Vol. 24 December, 2009.

- **LAING M E.**; **KAY E.; CONLON P.; MURPHY G M.** Genetic Factors with Skin Cancer in Renal Transplant Patients. Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine 2007; 23:62 67

- **LE PAPE, E.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; WOLBER, R.; HEARING, V. J.** Regulation of Eumelanin/Pheomelanin Synthesis and Visible Pigmentation in Melanocytes by Ligands of the Melanocortin 1 Receptor. Pigment Cell Melanoma Res. Agosto de 2008; 21 (4): 477-486.

- **LEWIN, B**. Genes VII. Artmed Editora, Porto Alegre, 2001

- **LIMA J M.; SERAFIM P V P.; SILVA I D C G.** *et al.* Estudos do Polimorfismo no gene p53 (códon 72) em Cancêr Colorretal. Arq. Gastroenterol. V. 43 no.1 São Paulo jan./mar. 2006.

- **LIN K Y. & FISHER D E.** Melanocyte Biology Skin Pigmentation. Nature vol. 445/22 Fevereiro 2007.

- **MCGREGOR, J. M.; HARWOOD, C. A.; BROOKS, L.** et al. Relationship Between p53 Codon 72 Polymorphism and Susceptibility to Sunburn and Skin Cancer. The Journal of Investigative Dermatology, vol. 119, no. 1 july 2002.

- **MONTENEGRO M. R. & FRANCO M.** Patologia Processos Gerais. 4ª Edição. Editora Atheneu, São Paulo, 1999.

- **NAN H.; QURESHI A A.; HUNTER D J.; HAN J.** Interaction Between p53 Codon 72 Polymorfism and Melanocortin 1 Receptor Variants on Suntan Response and Cutaneous Melanoma Risk. British journal of Dermatology 2008 159, pp314-321.

- **OLIVEIRA I. O. & JUNIOR H. L. A.** Conhecimentos Atuais Sobre a Biologia dos Melanócitos no Foliculo Piloso Humano. An. Bras. Dermatol. Vol. 78 no.3 Rio de Janeiro Maio/Junho 2003.

- **ORSTED D. D. BOJESEN S.E. TYBJAERG-HANSEN A. NORDESTGAARD B.G.** Tumor Supressor p53 Arg72Pro Polymorphism and Longevity Cancer Survival, and Risk of Cancer in the General Population. The Journal of Experimental Medicine 2007; 204(6): 1295-301.

- **PEZESHKI A.; SARI-ASLANI F.; GHADERI A.** *et al*. p53 Codon 72 Polimorphism in Basal Carcinoma of the Skin. Pathology Oncology Research vol.12, No 1, 2006.

- **PIM D & BANKS L.** p53 Polymorphic Variats at Códon 72 Exert Different Effects on Cell Cycle Progression. International Journal of Cancer 2004; 108: 196-9.

- **RESS J. L.** The Genetics of Sun Sensitivity im Human. Am. J. Hum. Genet. 75:739-751, 2004.

- **SAVAGE, S. A.; GERSTENBLITH, M. R.; GOLDSTEIN, A. M.; MIRABELLO, L.; FARGNOLI, M. C.; PERIS, K.; LANDI, M. T.** Nucleotide diversity and population differentiation of the Melanocortin 1 Receptor gene, MC1R. BMC Genetics 2008, 9:31

- **SHEN H.; LIU Z.; STROM S S.; SPITZ M R.; LEE J E.; GERSHENWALD J E.; ROSS M I.; MANSFIELD P F.; DUVIC M.; ANANTHASWAMY H N.; WEI, Q.** p53 Codon 72 Arg Homozygotes Are Associated With an Increased Risk of Cutaneous Melanoma. The Journal of Investigative Dermatology 121:1510, 2003.

- **SHU K.; LI B.; WU L.** The p53 Network: p53 and its Downstream Genes. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces 55 (2007) 10-18.

- **SILVA A M T C.** O Polimorfismo do Gene p53 no Câncer de Cabeça e Pescoço: Estudo de Associação e Meta-Analise. Dissertação Apresentada ao Programa de Doutorado em Biologia, Universidade Federal de Goiás, 2009.

- **SJALANDER A.; BIRGANDER R.; SAHA N.; BECKMAN L.; BECKMAN G.** p53 Polymorphism and Haplotypes Show Distinct Differences Between Major Ethnic Groups. Human Heredity 1996; 46:41 - 48

- **SOTO J. L.; CABRER A C M.; SERRANO S.; LÓPEZ – NEVOT, M. A.** Mutation Analysis of Genes that Control the G1/S Cell Cycle in Melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A and CDKN2B. BMC Cancer 2005, 5:36.

- **SOUZA S R P.; FISCHERB F M.; SOUZAC J M P.** Bronzeamento e Risco de Melanoma Cutâneo. Revista Saúde Pública vol.38 no. 4 São Paulo Agosto 2006.

- **STEFANAKI I.; STRATIGOS A J.; DIMISIANOS G *et al*.** P53 Codon 72 Pro Homozygosity Increases the Risk of Cutaneous Melanoma in Individuals with Dark Skin Complexion and Among Noncarriers of Melanocortin 1 Receptor Red Hair Variants. British Journal of Dermatology 2007 156, pp357-362.

- **STOREY A.; THOMAS M.; KALITA A.; HARWOOD C.; GARDIOL D.; MANTOVANI F.; BREUER J.; IRENE M. L.; MATLASHEWSKI G.; BANKS, L.** Role of a p53 Polymorphism in the Develqopment of Human Papilloma-virus-associated Cancer. Nature vol. 393, may 1998.

- **TWU C.; JIANG R.; SHU C.; LIN J.** Association of p53 Codon 72 Polymorphism with Risk of Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Taiwam. J. Formos Med Assoc 2006. Vol 105, No 2.

- **VAZQUEZ A.; BOND EE.; LEVINE AJ.; BOND GL.** The Genetics of the p53 Pathway, Apoptosis and Cancer Therapy. Nature 2008; 979-87.

- **YANG G.; ZHANG G.; PITTELKOW M R.; RAMONI M.; TSAO H.** Expression Profiling of UVB Response in Melanocytes Identifies a Set of p53 – Target Genes. Journal of Investigative Dermatology (2006), v 126.

- **ZHUO W.; ZHANG Y.; XIANG Z.; CAI L.; CHEN Z.** Polymorphisms of TP53 Codon 72 With Breast Carcinoma Risk: Evidence from 12226 Cases and 10782 Controls. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2009, 28:115.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1 . TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Aos doadores de sangue do INGOH:

Pedimos sua colaboração na realização de uma pesquisa sobre tipos de pele e sua associação com genes que controlam a resposta da pele ao sol intitulada "Associação de polimorfismo de base única (SNP) no códon 72 do gene humano p53 com as características de pigmentação" sob responsabilidade da pesquisadora responsável Kárita Antunes Costa.

Para tanto, solicitamos uma pequena quantidade de sangue (5ml), a ser coletado no momento da sua doação pela equipe do Instituto Goiâno de Hematologia (INGOH). A coleta será feita por pessoas capacitadas e material descartável (sistema de coleta a vácuo em tubos com EDTA), podendo ocorrer um leve desconforto, inerente a punção venosa ou devido ao garroteamento do braço, entretanto tais situações são momentâneas e não apresentarão maiores conseqüências. Também solicitamos que responda a um breve questionário sobre a cor de sua pele, olhos, cabelos e histórico de câncer na família. Com seu consentimento tais informações serão muito úteis para um melhor entendimento de como a pele reage ao sol e servirão também como "controle" para fins estatísticos em futuras pesquisas de caso-controle associado à pigmentação da pele . Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

Tanto a amostra de sangue como o questionário serão usados exclusivamente para pesquisas relacionadas à pigmentação da pele, e não serão, em hipótese alguma, usados em pesquisa com outras finalidades. Esse material permanecerá guardado no laboratório onde a pesquisa será feita e será utilizado para pesquisas futuras mediante autorização do comitê de ética. O seu destino ao anonimato e a privacidade esta garantida e sua identidade não será divulgada, por que sua amostra será identificada apenas com um número presente no questionário, sendo assim as informações obtidas terão caráter sigiloso.

Concordando em participar desta pesquisa, esclarecemos que você não terá ajuda financeira decorrente de sua participação, mas estará contribuindo muito com a pesquisa, uma vez que as informações obtidas a partir do sangue coletado nos fornecerão dados importantes para entender melhor as características de pigmentação e a resposta da pele ao sol. Quando a pesquisa terminar, os resultados serão publicados e enviados para o seu conhecimento. Caso

aceite participar da pesquisa, assine no final deste documento, que esta em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Caso decida retirar seu consentimento, ou mesmo caso não aceite participar desta pesquisa, você não será em hipótese alguma prejudicado(a) ou penalizado(a). Em caso de duvida, você poderá entrar em contato a qualquer momento com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelos telefones (62) 3521-1075 ou (62) 3521-1076. Poderá também entrar em contato com a pesquisadora responsável Kárita Antunes Costa nos fones: (62)3246-0580 ou (62)8155-6854 ou com a coordenadora do projeto Draª Lídia Andreu Guillo, nos telefones: (62) 3521-1495 ou (62) 9976-1878.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, RG/ CPF/ _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento, se for o caso).

Local e data:_____

Nome e Assinatura do sujeito: _____

Impressões dactiloscópicas

Para pesquisas **envolvendo crianças, adolescentes e adultos, portadores de perturbação mental ou doença mental e sujeitos em substancial diminuição em suas capacidades de consentimento**, cujo Termo de Consentimento será assinado por seus representantes legais:

Eu,_____, RG/ CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo sua participação no estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da sua participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/tratamento prestado ao sujeito pesquisado.

Local e Data: _____

Nome e Assinatura do responsável: _____

Impressões dactiloscópicas

8.2. ANEXO 2. QUESTIONÁRIO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE PIGMENTAÇÃO APLICADAS AOS INDIVÍDUOS QUE FIZERAM PARTE DESTE ESTUDO

QUESTIONÁRIO

Característica de pigmentação

Idade:_____

1-Descendência (pais ou avós): ( )européia ( )asiática ( )africana ( )indígena ( )brasileiro

2-Cor da pele: ( )branca ( )morena ( )negra

3-Cor dos olhos: ( )azuis ( )verde/cinza ( )castanho ( ) preto

4-Cor dos cabelos: ( )Ruivos ( )louro claro ( ) louro ( )castanho ( )preto

5-Cor de pele da mãe _____

6-Cor da pele do pai _____

7-Ao ficar exposto ao sol: Bronzeia facilmente ( ) Apresenta vermelhidão ( )

Observações _____

_____

Quadro clínico

1-É/foi portador de algum tipo de câncer de pele ( )sim ( )não Qual?_____

2-Em caso de sim, esta em tratamento?_____ Há quanto tempo?_____

3-Alguém da família já teve algum tipo de câncer de pele ( )sim Qual_____ ( )não

4-Em caso de sim, qual o grau de parentesco?_____

5-Outras observações ou comentários _____

Local e data: _____/_____/_____/

Responsável pela coleta: _____

8.3. ANEXO 3. INFORMAÇÕES SOBRE OS *PRIMERS* UTILIZADOS

Invitrogen Brasil Custom Primers

Certificado de Análise

INVITROGEN BRASIL LTDA
Número da Ordem: 5075567

Primer: ArgF

Pesquisador: Dra. Lídia Andreu Guillo

Seqüência (5' → 3'): DNA: TCC CCC TTG CCG TCC CAA

Peso Molecular (μg/μmol): 5,332.6

Coef. Milimolar de Extringência (OD/μmol): 165.4

Pureza	**Padrão**
Tm (1M Na^+)	**91.00**
Tm (50 mM Na^+)	**69.00**
%CG	**67.00**

Número do Primer: 129016**(E12)**

Tamanho do Primer: 18

Escala de Síntese: 25N

μg por OD: 32.24

nmoles por OD: 6.05

OD's	**3.73**
μg's	**120.28**
nmoles	**22.6**

Primer: ArgR

Pesquisador: Dra. Lídia Andreu Guillo

Seqüência (5' → 3'): DNA: CTG GTG CAG GGG CCA CGC

Peso Molecular (μg/μmol): 5,542.6

Coef. Milimolar de Extringência (OD/μmol): 188.0

Pureza	**Padrão**
Tm (1M Na^+)	**93.00**
Tm (50 mM Na^+)	**71.00**
%CG	**78.00**

Número do Primer: 129016**(F01)**

Tamanho do Primer: 18

Escala de Síntese: 25 N

μg por OD: 29.48

nmoles por OD: 5.32

OD's	**4.98**
μg's	**146.93**
nmoles	**26.5**

Primer: ProF

Pesquisador: Dra. Lídia Andreu Guillo

Seqüência (5' → 3'): (DNA): GCC AGA GGC TGC TCC CCC

Peso Molecular (μg/μmol): 5,422.6

Coef. Milimolar de Extringência (OD/μmol): 174.8

Pureza	**Padrão**
Tm (1M Na^+)	**90.00**
Tm (50 mM Na^+)	**68.00**
%CG	**78.00**

Número do Primer: 129016 **(F02)**

Tamanho do Primer: 18

Escala de Síntese: 25N

μg por OD: 31.02

nmoles por OD: 5.72

OD's	**4.23**
μg's	**131.32**
nmoles	**24.2**

Invitrogen Brasil Custom Primers
Certificado de Análise

INVITROGEN BRASIL LTDA
Número da Ordem: 5075567

Primer: ProR

Pesquisador: Dra. Lídia Andreu Guillo

Seqüência (5' → 3'): DNA: CGT GCA AGT CAC AGA CTT

Peso Molecular (μg/μmol):	5,484.6
Coef. Milimolar de Extringência (OD/μmol):	197.9
Pureza	**Padrão**
Tm (1M Na^+)	**74.00**
Tm (50 mM Na^+)	**53.00**
%CG	**50.00**

Número do Primer: 129016	**(F03)**
Tamanho do Primer:	18
Escala de Síntese:	25N
μg por OD:	27.71
nmoles por OD:	5.05
OD's	**4,64**
μg's	**128.70**
nmoles	**23.5**