

O ESTUDO DO POLIMORFISMO *IGFBP3* (rs11977526) A>G E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PROGRESSÃO PARA O CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM MULHERES DO AGRESTE ALAGOANO.

A. B. L. Neto¹; C. A. Nascimento²; E. L. de Moura³; I. F. dos Santos⁴; K. F. de Farias⁵ & P. P. de Freitas⁶.

Resumo:

O câncer cervical (CC) está na quarta posição entre os tipos de cânceres que mais afetam mulheres no mundo, sendo o Papilomavírus humano (HPV) do tipo oncogênico o principal agente etiológico desta doença. A Proteína de Ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-3 (IGFBP-3), junto aos demais Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina (IGFs), estão envolvidos em redes de sinalização cancerígenas. Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNPs) no gene *IGFBP3* foram associados aos níveis de IGFs circulantes, como do SNP *IGFBP-3*(rs11977526) A>G. O objetivo foi verificar a possível associação do SNP rs11977526 A>G na susceptibilidade ao desenvolvimento do CC. Estudo caso-controle, no qual o grupo caso, foram mulheres diagnosticadas com CC e HPV positivo e o controle foram participantes saudáveis, sem diagnóstico para CC e HPV negativo. O SNP foi detectado por *PCR real-time*. Não foram encontradas associações significativas entre o SNP rs11977526 A>G e o CC na população de estudo.

Autorização legal: Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP/UFAL), estando de acordo com todos os preceitos éticos segundo a resolução nº. 466 do Conselho Nacional de Saúde de 2012, sob o parecer de número 739.340.

Palavras-chave: IGFBP-3; Polimorfismos; Câncer Cervical.

Apoio financeiro: O financiamento para este trabalho foi proveniente da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Alagoas - FAPEAL.

Introdução:

O câncer do colo do útero ocupa, em uma escala mundial, a quarta colocação entre os tipos de cânceres que mais afetam mulheres, segundo tipo em regiões subdesenvolvidas e é a quarta causa de morte em mulheres acometidas por câncer no Brasil. O Papilomavírus Humano (HPV) causa a infecção genital mais frequente. O HPV do tipo oncogênico é o principal agente etiológico, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (INCA, 2020; OPAS 2019).

A Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina -3 (IGFBP-3), junto aos demais IGFs, estão envolvidos em redes de sinalização cancerígenas. O papel biológico destes, no desenvolvimento do câncer, é biologicamente possível, tendo em vista que a IGFBP-3 tem ação de suprimir a proliferação celular e induzir à morte celular programada (HUANG, et al., 2008). Além disso, IGFBP-3 é o principal portador sérico, e mediador da ligação IGF-1 / IGF-1R, inibindo a ligação entre IGF-1 e IGF-1R, consequentemente tendo efeito supressor de crescimento celular (BONILLA, et al. 2016).

Polimorfismos no gene *IGFBP3* foram associados aos níveis de IGFs circulantes, a exemplo do polimorfismo *IGFBP3*(rs11977526) A>G. Este gene é encontrado no cromossomo 7p12.3 e descrito na literatura como associado aos níveis séricos de IGFBP-3, modulando atividades mitogênicas e metabólicas relacionadas à regulação do crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (HE, et al., 2014; BONILLA, et al. 2016).

Pelo fato do polimorfismo *IGFBP3*(rs11977526) A>G ter relação com alterações nos níveis de IGFBP-3 e está envolvido em redes de sinalização carcinogênicas, é que este trabalho propõe a hipótese que o polimorfismo *IGFBP3*(rs11977526) A>G está associado na carcinogênese cervical. Diante deste cenário, propomos a seguinte questão de pesquisa: O polimorfismo rs11977526 A>G, no gene *IGFBP3*, está relacionado ao desenvolvimento de câncer do colo do útero? A partir desta, o objetivo do estudo foi verificar a possível associação do polimorfismo *IGFBP3*(rs11977526) A>G na susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer cervical.

¹ Abel Barbosa Lira Neto. E-mail: abel.neto@arapiraca.ufal.br

² Cristiane Araújo Nascimento. E-mail: crisnasci@arapiraca.ufal.br

³ Edilson Leite de Moura. E-mail: edilsonleite17@hotmail.com

⁴ Israel Faustino dos Santos. E-mail: israelsantos2810@gmail.com

⁵ Karol Firema de Farias. E-mail: karolfireman@hotmail.com

⁶ Paulo Pedro de Freitas. E-mail: pedro.freitas1@hotmail.com

Metodologia:

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, no qual o grupo-caso foi composto por mulheres diagnosticadas com câncer cervical, confirmado por exame histopatológico e HPV positivo. O grupo controle foi composto por participantes saudáveis, sem alterações do epitélio cervical, selecionadas a partir do resultado de exame citopatológico com laudo de esfregaço normal, sem diagnóstico para câncer e negativas para o HPV. As participantes são oriundas do atendimento no SUS do Agreste Alagoano e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras de câncer cervical foram obtidas do banco de amostras do Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer (NPDC) Arapiraca-AL, provenientes de mulheres diagnosticadas com câncer cervical no período de 2015 a 2017. As amostras do grupo controle foram coletadas de pacientes saudáveis em cinco centros de saúde e duas unidades básicas de saúde do município de Arapiraca/AL. As amostras biológicas do grupo controle foram células cervicais raspadas com escova citológica (*citobrush*), posteriormente, acondicionadas a -20 °C. As amostras do grupo caso foram obtidas de tecido parafinado.

A extração do DNA foi realizada com o Kit comercial *PROMEGA*®, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras com concentração satisfatória (> 20 ng/μL) e um estado adequado de DNA (verificado em gel de agarose à 1%), foram submetidas à detecção viral, seguindo para o procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o objetivo de detectar o gene da β-actina humana (controle interno) e o gene *LI* expresso no material genético do vírus HPV. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 μL, contendo 6,25 μL de *GoTaq® Green Master Mix* (*Promega*®), 1 μL de cada primer e 3,25 μL de H₂O livre de nuclease e 1μL de cada amostra. As reações foram realizadas em equipamento termociclador *Swift*® de *ESCO*®.

Após a confirmação da presença, ou não, do vírus HPV, as amostras foram diluídas e direcionadas à genotipagem, que foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), com volume final de reação de 10μL, contendo 5μL de solução *TaqMan Genotyping Master Mix* do fabricante *Applied Biosystems*® (que contém TaqDNA polimerase, desoxirribonucleotídeos trifosfatados e tampão com MgCl₂); 0,125μL de sonda referente ao SNP *IGFBP3* (rs11977526) A>G e 4,87 μL de DNA de cada amostra. As reações foram realizadas em equipamento ABI StepOneplus da *Applied Biosystems*®. Os resultados das reações foram fornecidos pelo *software* do aparelho em um relatório com as curvas de amplificação e discriminação alélica de cada amostra.

A análise estatística foi feita através do site SNPStats, no qual foram submetidos os dados encontrados a partir dos experimentos realizados e o site retornou os resultados referentes à estatística. Foram feitos, também, de forma complementar, os testes χ^2 e de regressão logística, com os dados obtidos, através dos *softwares Stata13*.

Resultados e Discussão:

Das 45 amostras submetidas à PCR em tempo real, todas foram devidamente genotipadas. Em relação à frequência alélica, foi encontrada uma proporção de 65,56% (n=59) para o alelo G, e uma proporção de 34,44% (n = 31) para o alelo A. Para a frequência genotípica, encontrou-se uma proporção de 42,22% (n=19) para o genótipo homocigoto ancestral G/G, 46,67% (n=21) para o genótipo heterocigoto A/G e 11,11% (n=5) com o genótipo homocigoto recessivo A/A (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de Associação do SNP *IGFBP-3* G>A e o Câncer Cervical

		N (Frequências) Controles vs Casos				EHW	
		Toda a amostra	Controles	Casos	OR com 95% IC	P	
Associação alélica	G	59 (65.56%)	36 (61.02 %)	24 (77.42%)	Referência		
	A	31 (37.44%)	23(38.98%)	7 (22.58%)	0.45 (0.16 – 1.2)	0.123	
Associação genotípica						1,0	
Codominante	G/G	19 (42.22%)	11 (57.89 %)	8 (42.11%)	Referência		
	A/G	21 (46.67%)	14 (66.67%)	7 (33.33%)	0.68 (0.187 - 2.52)	0.570	
	A/A	5 (11.11%)	5 (100 %)	0 (0.00%)	1.00 (0-NA)		
Dominante	G/G	19 (42.22%)	11(57.89%)	8 (42.11%)	Referência		
	G/A + A/A	26 (57.78%)	19 (73.08%)	7 (26.92%)	0.50 (0.14 - 1.80)	0.290	
Recessivo	G/G +A/G	40 (88.89%)	25 (62.50%)	15 (37.50%)	Referência		
	A/A	5 (11.11%)	5 (100%)	0 (00.0%)	1.00 (0 - NA)		

Sobredominante	G/G + A/A	24 (53.33%)	16 (66.67%)	8 (33.33%)	Referência
ante	A/G	21 (46.67%)	14 (66.67%)	7 (33.33%)	1.00 (0 - NA)

Legenda: EHW (Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*); OR (*Odds Ratio*); IC (Intervalo de Confiança).

Fonte: Próprio autor, 2020.

Não foram encontradas associações significativas de risco ou proteção entre o polimorfismo *IGFBP3*(rs11977526) A>G e a progressão para o câncer cervical na população do Agreste Alagoano. O baixo poder amostral (0.15%) foi um fator limitante para este estudo. Não existem estudos na literatura sobre associação da variante *rs11977526* A>G do gene *IGFBP3* com o câncer cervical. No entanto, há informações descritas sobre as funções e associações dos níveis alterados da proteína *IGFBP-3* com essa doença.

O HPV 16 faz parte do grupo de vírus de alto risco oncogênico, tendo as proteínas E6 e E7 expressos também em cânceres cervicais. Além de poderem estimular a proliferação e diferenciação celular, interagindo com algumas proteínas, dentre elas o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina. O *IGF1* tem como principal regulador da resposta celular e proteína de ligação o *IGFBP3*, tendo seus níveis alterados correlacionados com neoplasias malignas, tais como câncer de mama, pulmão, colorretal e próstata. Estas alterações podem prejudicar a modulação de atividade mitogênica do *IGF-1*, sugerindo-se uma contribuição às progressões malignas e potencialização de tumores cervicais provocados através de infecções por HPV's do tipo oncogênicos (BAEGE et al., 2004; BERGER et al., 2002; GIOVANNUCCI, 1990).

Estudos descreveram uma relação entre o HPV e o *IGFBP3*, de modo que este segundo pode ser regulado pelo mecanismo de carcinogênese através da proteína E7 do vírus, assim tendo seus níveis de expressão aumentados (PICKARD et al., 2017). No entanto, o *IGFBP-3* é inibido pelo E7, no processo pelo qual este segundo se liga ao primeiro, desencadeando uma clivagem proteolítica. Dessa forma, impedindo o papel do *IGFBP3* de suprimir a proliferação celular e indução à morte celular programada (MANNHARDT, et al., 2000). Em outro estudo as altas concentrações de *IGFBP-3* foram correlacionadas como um possível fator de proteção ao desenvolvimento do câncer de ovário (HUANG, et al., 2008).

Em um estudo realizado no Reino Unido, com amostras de 52.865 casos de câncer colorretal e 46.287 controles saudáveis, foi encontrada associação significativa entre os níveis de *IGFBP3*, previsto com base em fatores genéticos, e níveis circulantes de *IGF1* com o câncer colorretal. Tanto os níveis de *IGFBP3* quanto o risco de desenvolvimento do câncer colorretal, foram associados com a variante *rs11977526* no gene *IGFBP3* (MURPHY et al., 2019).

Conclusões:

Apesar de nossos resultados não terem demonstrado associações significativas de risco ou proteção entre o polimorfismo *IGFBP-3*(rs11977526) A>G e a progressão para o câncer cervical na população de estudo, a hipótese apresentada neste trabalho não foi descartada devido ao baixo poder amostral. Ademais, este trabalho é um indicativo para realização de mais estudos para elucidar as relações entre a variante genética *rs11977526* A>G e a susceptibilidade ao câncer cervical.

Referências bibliográficas:

BAEGE, Astrid C.; DISBROW, Gary L.; SCHLEGEL, Richard. *IGFBP-3*, a marker of cellular senescence, is overexpressed in human papillomavirus-immortalized cervical cells and enhances *IGF-1*-induced mitogenesis. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5720-5727, 2004.

BERGER, Allison J. et al. Insulin-like growth factor-binding protein 3 expression increases during immortalization of cervical keratinocytes by human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. **The American journal of pathology**, v. 161, n. 2, p. 603-610, 2002.

BONILLA, Carolina et al. Assessing the role of insulin-like growth factors and binding proteins in prostate cancer using Mendelian randomization: Genetic variants as instruments for circulating levels. **International journal of cancer**, v. 139, n. 7, p. 1520-1533, 2016.

GIOVANNUCCI, Edward. Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 51, n. Suppl. 3, p. 34-41, 1999.

HUANG, Yu-Fang et al. Clinical implications of insulin-like growth factor 1 system in early-stage cervical cancer. **British journal of cancer**, v. 99, n. 7, p. 1096, 2008.

HE, Yong-Han et al. Association of the insulin-like growth factor binding protein 3 (*IGFBP3*) polymorphism with longevity in Chinese nonagenarians and centenarians. **Ageing (Albany NY)**, v. 6, n. 11, p. 944, 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tipos de câncer: Câncer do Colo do útero.** – Rio de Janeiro, 2020.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. **Folha informativa - HPV e câncer do colo do útero.** - Brasília, DF, Brasil. 2020.

PICKARD, Adam et al. The IGF axis in HPV associated cancers. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 67-77, 2017.

MANNHARDT, Boris et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 17, p. 6483-6495, 2000.

MURPHY, Neil et al. Circulating levels of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 3 associate with risk of colorectal cancer based on serologic and mendelian randomization analyses. **Gastroenterology**, v. 158, n. 5, p. 1300-1312. e20, 2020.