

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs7903146 C>T, DO GENE *TCF7L2*, COM O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DO AGRESTE ALAGOANO.

Israel F. dos Santos^{1*}, Paulo P. de Freitas¹, Silmara F. de Santana², Edilson L. de Moura³, Denise M. da Silva³, Abel B. L. Neto³, Natanael de Souza¹, Aline C. P. e Silva⁴, Cristiane A. Nascimento^{5*}, Elaine V. M. de S. Figueiredo^{5*}, Karol F. de Farias^{5**}

1. Estudante da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
2. Estudante da Faculdade de Ciências Biológicas da UFAL
3. Pesquisador(a) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL
4. Professora da Faculdade Regional da Bahia – UNIRB
5. Professora da Faculdade de Enfermagem da UFAL/*Coorientadora/**Orientadora

Resumo

O câncer cervical é a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo, sendo um problema de saúde pública nacional e internacional. O *Fator de Transcrição 7 tipo 2* (*TCF7L2*) possui importante papel no controle da proliferação e diferenciação celular, evasão da apoptose e invasão tecidual. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar a relação do polimorfismo *TCF7L2* (rs7903146) C>T com a progressão para o câncer cervical em mulheres do Agreste Alagoano. Este estudo é uma revisão sistemática com metanálise acompanhada por um estudo do tipo caso-controle. Em nossa metanálise, o alelo T apresentou efeito de risco aumentado para o câncer de mama, em todos os modelos genéticos. Em nosso estudo do tipo caso-controle, não encontramos associação significativa deste polimorfismo com o câncer cervical. Conclui-se que, embora não tenha sido encontrada associação significativa do polimorfismo rs7903146 C>T com o câncer cervical, a hipótese proposta não pode ser descartada.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pelo CEP/UFAL, sob o parecer de número 739.340.

Palavras-chave: Câncer de colo uterino; HPV; Polimorfismos de nucleotídeo Único.

Apoio financeiro: UFAL.

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

Introdução

O câncer cervical é a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo, sendo responsável por mais de 310 mil mortes no ano de 2018 (IARC, 2018). No Brasil, esse câncer levou ao óbito de 6.385 mulheres, apenas em 2017 (INCA, 2020). Logo, este é um problema de saúde pública local, nacional e internacional.

Esse câncer acomete principalmente classes socioeconômicas mais baixas e relaciona-se a diversos cofatores como infecções sexualmente transmissíveis (IST's), multiplicidade de parceiros e alcoolismo (LOURENÇO et al., 2012; MEIJERS & DE BOER, 2019; OPAS/OMS, 2018). Destaca-se, como o principal agente etiológico para o câncer de colo uterino, a infecção persistente por HPV de tipos com maior potencial oncogênico, sendo um fator necessário, porém não suficiente para o desenvolvimento da neoplasia (HASHIM et al., 2020; INCA, 2020; DE CARVALHO, COSTA & FRANÇA, 2019). Além disso, a susceptibilidade genética é um fator preponderante no desenvolvimento de câncer (MEIJERS & DE BOER, 2020; OPAS/OMS, 2018).

Estudos vêm trazendo evidências sobre a relação do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e o risco para o desenvolvimento de câncer, assim como trazem que variações genéticas já relacionadas ao risco de desenvolver DM2 podem estar relacionadas ao desenvolvimento de câncer, independentemente da presença de DM2 (FALSOM et al., 2008; KURUMA et al., 2014).

O *Fator de Transcrição 7 tipo 2* (*TCF7L2*) é o gene mais relacionado na literatura ao DM2, localizado no braço longo do cromossomo 10q25.2 (CHEN et al., 2018; NAIDU, YIP e TAIB, 2012), e codifica a proteína TCF4, associada à via de sinalização *WNT/β-catenina*, com importante papel na expressão de genes chave no controle da proliferação e diferenciação celular, evasão da apoptose e invasão tecidual (WRZOSEK et al., 2019; DA MOTA et al, 2012; CHEN, 2013). Destacam-se os oncogenes *ciclina D1* e *c-myc*, cuja expressão aberrante é comum nos cânceres humanos (NAIDU, YIP e TAIB, 2012). Isso demonstra que a relação deste gene com processos fisiopatológicos que favorecem o desenvolvimento de câncer é biologicamente possível.

Diante desse cenário, o objetivo geral deste trabalho foi analisar a relação do polimorfismo *TCF7L2* (rs7903146) C>T com a progressão para o câncer do colo do útero em mulheres do Agreste Alagoano.

Metodologia

Revisão sistemática com metanálise

O protocolo de revisão foi inscrito no *International Prospective Register of Systematic Reviews* – PROSPERO e aceito sob o número de registro CRD42020187903. A estratégia de busca foi construída com base no acrônimo PECOS para responder à pergunta “Polimorfismos de nucleotídeo único no gene *TCF7L2* estão relacionados ao desenvolvimento de câncer?”. A *string* resultante foi aplicada em maio de 2020, nas bases de dados *Pubmed*, *Web of Science*, *ScienceDirect* e *Scopus* para retorno de artigos publicados de 2010 a 2020 sem restrição de idioma. A identificação de estudos elegíveis para esta revisão seguiu as recomendações do

Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA).

A metanálise foi realizada através do software *Review Manager* (RevMan) 5.3, onde foram incluídos *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, e análise de heterogeneidade, I² e Q² (Higgins et al., 2003; Higgins & Thompson, 2002). O teste de Egger's foi utilizado para investigação de potencial viés (Egger et al., 1997).

Estudo do tipo caso-control

As pacientes foram oriundas do SUS do Agreste Alagoano. O grupo-control foi composto por participantes saudáveis, sem alterações do epitélio cervical, selecionadas a partir do resultado de exame citopatológico com laudo de esfregaço normal e negativas para o HPV. O grupo-caso foi composto por mulheres diagnosticadas com câncer cervical, confirmado por exame histopatológico e HPV positivo. As amostras do grupo caso foram obtidas no Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Arapiraca-AL, sendo provenientes de mulheres diagnosticadas com câncer cervical entre 2015 e 2017. Todas as amostras coletadas foram acondicionadas a -20 °C.

A extração do DNA foi a partir de amostras do esfregaço cervical e do tecido parafinado, de acordo com as instruções do fabricante do kit "*Wizard® Genomic DNA Purification kit*" (PROMEGA). Posteriormente, foram armazenadas a -20 °C. As amostras com concentração satisfatória (>20 ng/μL) e estado adequado de DNA no gel foram submetidas à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* específico para o gene da *β-actina humana*, para verificar a qualidade do DNA e como controle interno da reação. As amostras elegidas foram encaminhadas à PCR com os *primers* MY09 e GP5+/GP6+ para amplificação do gene *L1* do vírus HPV e submetidas à técnica de *nested-PCR*. A detecção dos polimorfismos foi por PCR em tempo real com a solução *TaqMan Genotyping Master Mix* e sonda referente ao SNP *TCF7L2 (rs7903146)*. Em todas as reações foram usados controles negativos.

A análise estatística foi realizada no programa *STATA13*, e o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado através do Teste Qui-quadrado (χ^2). Em relação à proteção e à susceptibilidade/risco, foi calculado o valor de OR com Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%), e o OR>1 foi associado à susceptibilidade/risco. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Revisão sistemática com metanálise

Foram encontrados 66 resultados na busca nas bases de dados. Ao final da seleção, foram elegidos 5 artigos para síntese qualitativa, dos quais 3 foram selecionados para síntese quantitativa por avaliarem o mesmo tipo de câncer (câncer de mama). Os estudos que passaram pela fase de leitura integral do texto, e não foram excluídos por outros critérios, foram avaliados segundo o *check list Downs and Black*, e lhes foram atribuídos níveis de qualidade (ruim, razoável, bom ou excelente). Nesta fase, apenas dois estudos não alcançaram o nível de qualidade esperado, sendo excluídos.

Dos 5 estudos incluídos 3 foram publicados em 2016 e 2 em 2012. Seus países de origem foram: Venezuela, México, Malásia, China e EUA. O método de genotipagem mais frequente foi a PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*). Os tipos de câncer avaliados nos estudos selecionados foram: câncer gástrico-intestinal, câncer colorretal e câncer de mama.

Ao observar os resultados e conclusões dos artigos incluídos nesta revisão, identificou-se que existe associação entre o polimorfismo rs7903146 C>T e o risco de câncer gástrico-intestinal, em uma população venezuelana, onde a pessoa portadora do genótipo recessivo T/T possui em média 3,4 vezes mais chances de desenvolver esse tipo de câncer (TORRES et al., 2016). Essa relação não foi significativamente identificada ao serem avaliadas amostras de câncer colorretal em uma população mexicana e amostras de câncer de mama em uma população chinesa (ROSALES-REYNOSO et al., 2016; MIN et al., 2016). Entretanto, ao serem observadas populações da Malásia e dos EUA, as pessoas que apresentaram variante rs7903146 T possuem risco aumentado de, em média, 1,3 vezes mais chances de desenvolver o câncer de mama (NAIDU, YIP e TAIB, 2012; CONNOR et al., 2012), demonstrando uma possível relação do efeito deste polimorfismo, no processo de carcinogênese, tendo em vista que, em diferentes locais do mundo, ao avaliar-se diferentes etnias, estudos divergem em suas conclusões.

Uma limitação detectada nos estudos selecionados para esta revisão é a ausência dos resultados dos testes estatísticos em diferentes modelos genéticos. Da mesma forma, alguns não trouxeram o resultado da comparação entre os alelos e nem o poder da amostra avaliada, o que pode ter comprometido possíveis conclusões mais concretas a serem estabelecidas.

Com relação à metanálise, obtivemos um total de 4.371 casos e 4.961 controles, à nível alélico, a variante rs7903146 T apresentou efeito de risco aumentado para o câncer de mama (T vs C: OR [IC 95%] = 1.14 [1.06, 1.22], $Z = 3.69$, $p = 0.0002$; I² = 0% [$p = 0.37$]). Os genótipos T/T e C/T mostraram um risco aumentado de câncer de mama quando comparados ao genótipo selvagem C/C (T/T vs C/C: OR [IC 95%] = 1.32 [1.11, 1.57], $Z = 3.14$, $p = 0.002$; I² = 0% [$p = 0.67$]; C/T vs C/C: OR [IC 95%] = 1.12 [1.03, 1.23], $Z = 2.54$, $p = 0.01$; I² = 0% [$p = 0.49$]). O efeito de risco também foi observado ao se avaliar os modelos genéticos dominante e recessivo (C/T+T/T vs. C/C: OR [IC 95%] = 1.15 [1.06, 1.25], $Z = 3.21$, $p = 0.001$; I² = 0% [$p = 0.37$]; T/T vs. C/C+C/T: OR [IC 95%] = 1.26 [1.06, 1.49], $Z = 2.64$, $p = 0.0008$; I² = 0% [$p = 0.78$]).

O *funnel plot*, em todos os modelos genéticos, apresentou assimetria, o que indica a presença de viés de publicação entre os estudos selecionados, o que pode ser reforçado pelo teste de Egger ($p < 0.05$) em todos os modelos genéticos. Porém o baixo número de artigos incluídos nesta metanálise comprometem o poder da avaliação do viés de publicação, podendo estes resultados serem decorrentes da baixa abrangência de estudos

selecionados (HTANALYZE, 2020). Porém nossos resultados corroboram com uma metanálise semelhante, onde a variante *rs7903146 T* apresentou risco elevado para o desenvolvimento de câncer de mama em todos os modelos genéticos (LU et al., 2015). Outra metanálise evidenciou que esta relação também é verdadeira ao serem observados os cânceres de próstata e cólon (CHEN et al., 2013), evidenciando, assim, que o polimorfismo estudado está relacionado à presença de câncer, embora os mecanismos moleculares associados a isso não estejam efetivamente elucidados.

Estudo do tipo caso-control

Foram submetidas 111 amostras a PCR em tempo real, destas 92,80% (n = 103) tiveram genotipagem satisfatória (37 casos e 66 controles), e em 7,20% (n = 8) a genotipagem foi inconclusiva (2 casos e 6 controles), sendo estas últimas inviáveis para análise estatística. Em relação à frequência alélica, foi encontrada, na amostra total, uma proporção de 67,96% (n = 140) para o alelo C e 32,04% (n = 66) para o alelo T, semelhante ao esperado para a população americana, segundo consta no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA, em 2020. A distribuição da frequência genotípica não apresentou diferença significativa entre os grupos caso e controle. Os resultados obtidos também foram estratificados para os modelos genéticos dominante, recessivo e sobredominante. Não foi observada relação significativa do polimorfismo *rs7903146 C>T* com o câncer cervical em nenhum dos modelos genéticos (Tabela 1).

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas, por modelo genético, do polimorfismo *rs7903146 C>T* e a associação com Câncer Cervical na população do Agreste Alagoano.

Modelo Genético		N (%)	Controles N (%)	Casos N (%)	OR (95% IC)	p
Codominante	C/C	49 (47.57)	34 (69.39)	15 (30.61)	Referência	
	C/T	42 (40.77)	25 (59.52)	17 (40.48)	1.54 (0.64 – 3.67)	0.329
	T/T	12 (11.66)	7 (58.33)	5 (41.67)	1.61 (0.43 – 5.69)	0.469
Dominante	C/C	49 (47.57%)	34 (69.39%)	15 (30.61%)	Referência	
	C/T + T/T	54 (52.43%)	32 (59.26%)	22 (40.74%)	1.55 (0.68 – 3.53)	0.288
Recessivo	C/C + C/T	91 (88.34%)	59 (64.84%)	32 (35.16%)	Referência	
	T/T	12 (11.66%)	7 (58.33%)	5 (41.67%)	1.31 (0.38 – 4.51)	0.661
Sobredominante	C/C + T/T	61 (59.22%)	41 (67.21%)	20 (32.79%)	Referência	
	C/T	42 (40.78%)	25 (59.52%)	17 (40.48%)	1.39 (0.61 – 3.16)	0.427
Alelos	C	140 (67.96)	93 (66.43)	47 (33.57)	Referência	
	T	66 (32.04)	39 (59.09)	27 (40.91)	1.36 (0.74 – 2.50)	0.308

Equilíbrio de Hardy Weiberg = 0,5; Power=20%;
Fonte: Próprio autor, 2021.

Em nosso estudo, não houve relação significativa do polimorfismo *rs7903146 C>T*, em nenhum dos modelos genéticos, com a progressão para o câncer cervical, porém esta mesma variante foi relacionada ao câncer gástrico em estudo realizado em 2019, onde foi constatado que o alelo T está relacionado ao grau de diferenciação em células tumorais (TORRES et al., 2016). Ainda em 2019, esse mesmo polimorfismo foi relacionado ao risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma da junção esofagogástrica, onde o alelo T foi associado ao aumento do risco de desenvolvimento da doença em indivíduos do sexo masculino com menos de 64 anos, não fumantes e não etilistas (TANG et al., 2019).

Estudos demonstram que os genótipos C/T e T/T mostraram grande poder de predição para o DM2 (OR = 1,58, IC95% 1,38-1,81, P <0,0001), estando o alelo T relacionado à diminuição da secreção de insulina (KURUMA et al., 2014; LYSSSENKO et al., 2007). Porém, independentemente do DM2, os genótipos que contêm o alelo de risco T foram relacionados à susceptibilidade aumentada para o câncer de cólon (C/T: OR = 1,25 [0,85-1,83], p = 0,009; T/T: OR = 2,15 [1,27-3,64], p = 0,009) (FOLSOM et al., 2008).

Assim, é perceptível que a desregulação da via de sinalização *WNT/β-catenina* efetivada pela proteína TCF4 é um importante fator para a progressão da carcinogênese, embora seu mecanismo não esteja completamente elucidado e pode potencializar os efeitos carcinogênicos do vírus HPV na cérvix uterina, o que tornam necessários novos estudos que avaliem a relação do polimorfismo *TCF7L2 rs7903146 C>T* com a progressão do câncer de colo uterino.

Conclusões

Conclui-se que, embora não tenha sido encontrada associação significativa do polimorfismo *rs7903146 C>T* neste estudo, a hipótese de que ele esteja relacionado ao câncer de colo uterino não pode ser descartada devido ao baixo poder amostral (power = 20%) e aos resultados de nossa metanálise, que mostram que o alelo *rs7903146 T* apresenta efeito de risco aumentado para o câncer de mama em todos os modelos genéticos avaliados neste trabalho), assim como para outros cânceres, demonstrando ser um possível biomarcador eficaz na determinação do risco de câncer. Novos estudos são necessários acerca dos mecanismos de atuação do gene *TCF7L2*, em algumas doenças, como o câncer de colo uterino.

Referências bibliográficas

CHEN, Jingxiang et al. Association between TCF7L2 gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71730, 2013.

CHEN, Xi et al. The diabetes gene and Wnt pathway effector TCF7L2 regulates adipocyte development and function. **Diabetes**, v. 67, n. 4, p. 554-568, 2018.

- CONNOR, Avonne E. et al. Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: the Breast Cancer Health Disparities Study. **Breast cancer research and treatment**, v. 136, n. 2, p. 593-602, 2012.
- DA MOTA, Licia Maria Henrique et al. Ausência de associação entre o genótipo CC do polimorfismo *rs7903146* no gene *TCF7L2* e artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 4, p. 518-528, 2012.
- DE CARVALHO, Karine Faria; COSTA, Liliame Marinho Ottoni; FRANÇA, Rafaela Ferreira. **A relação entre HPV e Câncer de Colo de Útero: um panorama a partir da produção bibliográfica da área.** 2019.
- EGGER, Matthias; SMITH, George Davey; PHILLIPS, Andrew N. Meta-analysis: principles and procedures. **Bmj**, v. 315, n. 7121, p. 1533-1537, 1997.
- FOLSOM, Aaron R. et al. Variation in TCF7L2 and increased risk of colon cancer: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 905-909, 2008.
- HASHIM, Dana et al. Real-world data on cervical cancer risk stratification by cytology and HPV genotype to inform the management of HPV-positive women in routine cervical screening. **British journal of cancer**, v. 122, n. 11, p. 1715-1723, 2020.
- HIGGINS, Julian PT et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. **Bmj**, v. 327, n. 7414, p. 557-560, 2003.
- HIGGINS, Julian PT; THOMPSON, Simon G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in medicine**, v. 21, n. 11, p. 1539-1558, 2002.
- HTANALYZE, HTAnalyze Economia e Gestão em saúde. **Viés de Publicação** (2020). Disponível em: <https://www.htanalyze.com/metanalise/vies-de-publicacao/>. Acesso em: 25 abr. 2020.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. **Cancer today: Estimated number of deaths in 2018, worldwide, both sexes, all ages.** (2018). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>. Acesso em: 26 jul. 2020.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Câncer do colo do útero: Fatores de Risco** (2020). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>. Acesso em: 22 abr. 2021.
- KURUMA, Sawako et al. Case-control study of diabetes-related genetic variants and pancreatic cancer risk in Japan. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 46, p. 17456, 2014.
- LOURENÇO, Andrezza Viviany et al. Why are women with cervical cancer not being diagnosed in preinvasive phase? An analysis of risk factors using a hierarchical model. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 22, n. 4, p. 645-653, 2012.
- LU, X. P. et al. TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 2860-7, 2015.
- LYSSENKO, Valeriya et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 8, p. 2155-2163, 2007.
- MEIJERS, Wouter C.; DE BOER, Rudolf A. Common risk factors for heart failure and cancer. **Cardiovascular research**, v. 115, n. 5, p. 844-853, 2019.
- MIN, Weili et al. Association of transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms with breast cancer risk in northwest Chinese women. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77175, 2016.
- NAIDU, Rakesh; YIP, C. H.; TAIB, N. A. M. Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 *rs12255372* (G/T) or *rs7903146* (C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. **Medical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 411-417, 2012.
- OPAS/OMS, Organização Pan-Americana De Saúde/Organização Mundial Da Saúde. **Folha informativa – Câncer** (2018). Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acesso em: 25 abr. 2021.
- ROSALES-REYNOSO, M. A. et al. TCF7L2 and CCND1 polymorphisms and its association with colorectal cancer in Mexican patients. **Cellular and molecular biology**, v. 62, n. 11, p. 13-20, 2016.
- TANG, Weifeng et al. Association of metabolism-related genes polymorphisms with adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: Evidence from 2261 subjects. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 11, p. 18689-18701, 2019.
- TORRES, Keila et al. TCF7L2 *rs7903146* polymorphism is associated with gastric cancer: A case-control study in the Venezuelan population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 28, p. 6520, 2016.
- WRZOSEK, Małgorzata et al. Age at onset of obesity, transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) *rs7903146* polymorphism, adiponectin levels and the risk of type 2 diabetes in obese patients. **Archives of medical science: AMS**, v. 15, n. 2, p. 321, 2019.