

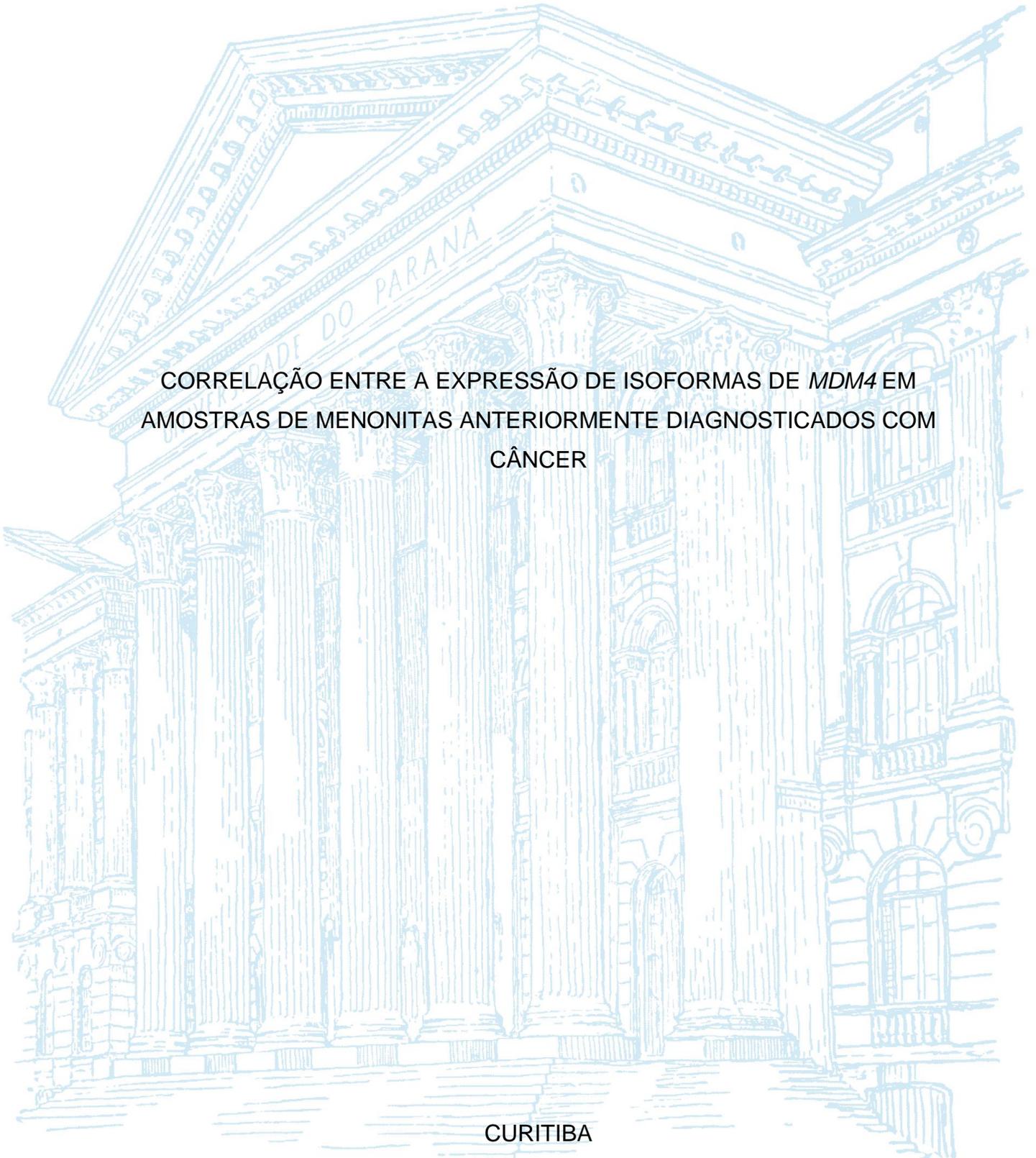
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEILA CAROLINE ZIMMERMANN

CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *MDM4* EM
AMOSTRAS DE MENONITAS ANTERIORMENTE DIAGNOSTICADOS COM
CÂNCER

CURITIBA

2023



Keila Caroline Zimmermann

CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE MDM4 EM
AMOSTRAS DE MENONITAS ANTERIORMENTE DIAGNOSTICADOS COM
CÂNCER

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Profa. Dra. Karin Braun Prado

CURITIBA

2023

*Dedico este trabalho aos gigantes
que me cederam os ombros para que eu
enxergasse mais alto.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, desde antes do meu nascimento até o momento atual, me estenderam a mão e permitiram que hoje eu estivesse escrevendo essa pequena homenagem.

Agradeço ao que eu ainda não compreendo, pela permissão de a cada dia dar um passo, perto o suficiente para que eu adquirisse sagacidade e sabedoria, mas longe o bastante para sempre permanecer em segurança e integridade. Talvez o acaso me proteja.

Agradeço aos meus amigos Felipe Matias, Ricardo Gomes e Larissa Rabelo, por terem sido meus amigos e anjos da guarda, terem estado comigo nos melhores e piores momentos, iluminado meu caminho e me mostrado amor e amizade verdadeiros.

Agradeço a todos os professores, desde a creche até a universidade, que acreditaram, lutaram, e me mostraram que eu era capaz de muito mais do que imaginei. Me deram conhecimento e forças para seguir em frente, além de limpar meus olhos para que eu enxergasse o mundo de possibilidades ao meu redor.

Agradeço à professora Karin, minha orientadora, por ter me recebido tão bem e me acompanhado nessa jornada. Agradeço ainda a todos do LGMH por terem me ensinado, acompanhado e até mesmo por rirem das minhas piadas.

Sou grata também pelas ações que se tornam cotidianas e quando olhadas sem atenção passam despercebidas, pois passar o café da manhã e se atentar a cada mancha do meu jaleco pode parecer pouco, mas um organismo complexo como o ser humano também surge do pouco que duas células podem fazer.

Agradeço a mim mesma por ter persistido e ressignificado muitas coisas, aprendendo a viver e nascendo para si mesma. Por a cada dia ter levantado e lutado por aquilo que sempre sonhou, por ser racional o suficiente para ver através das dificuldades, mas sensível o suficiente para aproveitar a vista do caminho que foi trilhado.

Os desafios começaram muito antes do que posso ter consciência e se mantém além do que minha mente é capaz de imaginar. Mas a vida não se resume a cicatrizes, na verdade as cicatrizes são apenas lembranças do que já foi vivido e não devem sozinhas falar por nós. Não posso deixar de agradecer às tardes com bolo de cenoura e cartas, aos correios entregando mais do que correspondência, ao

guaraná que acompanha as jantas no RU, à espada que nos protegeu em nossas aventuras pela Vila Pelicanos, e tantos outros momentos que trouxeram paz, alegria e sonhos.

Até o momento, pontuar essas lembranças é o que posso fazer para mostrar que lembro, no futuro espero poder retribuir o que me foi feito. De qualquer forma, saibam que essa conquista se deve também a vocês.

Pra que amanhã não seja só um ontem com um novo nome
Capulanas, catanas, buscar nirvana é o recurso
É um mundo cão pra nós, perder não é opção, certo?

Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Elas são coadjuvantes, não, melhor, figurantes
Que nem devia tá aqui
Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Tanta dor rouba nossa voz, sabe o que resta de nós?
Alvos passeando por aí
Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Se isso é sobre vivência, me resumir à sobrevivência
É roubar o pouco de bom que vivi
Por fim, permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Achar que essas mazelas me definem é o pior dos crimes
É dar o troféu pro nosso algoz e fazer nós sumir

Tenho sangrado demais
Tenho chorado pra cachorro
Ano passado eu morri
Mas esse ano eu não morro

(Emicida, Majur, Pablo, 2019)

“Existem mais mistérios entre o céu e a terra do
que a filosofia dos homens possa imaginar”
(SHAKESPEARE, William)

RESUMO

A proteína MDM4, em conjunto com sua homóloga, MDM2, tem como função principal a regulação negativa de p53. Então, tendo influência direta sobre o reparo celular, quando a expressão do gene *MDM4* apresenta problemas, a via MDM4-MDM2-p53 é prejudicada, afetando a supressão de tumores. A bibliografia sugere que as isoformas FL e S de *MDM4* tem relação com o surgimento e evolução do câncer em humanos. Os Menonitas são uma população cristã de origem europeia com 500 anos de isolamento genético que estabeleceu comunidades no Brasil. A fim de testar a razão entre as duas isoformas, este trabalho comparou a expressão média destas isoformas em amostras de sangue periférico extraídos de 15 menonitas que apresentaram diagnóstico de câncer em algum momento da vida. Os testes foram feitos a partir de mRNA convertido em cDNA. Posteriormente, por meio de RT-qPCR, a expressão média de *MDM4* não específico para alguma isoforma, além das isoformas *MDM4-FL* e *MDM4-S* foram determinadas. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism. Quando comparadas aos outros subgrupos de amostras pelo teste de Kruskal-Wallis, as amostras FL, *MDM4+*, FL+ e S+ apresentaram significativa diferença ($p < 0,05$). FL+ e S+ ainda apresentaram maior diferença ($p < 0,01$) quando foram comparadas a outras amostras do mesmo teste. O teste de correlação de Spearman apontou fortíssima correlação entre FL+ e *MDM4-*, forte entre S+ e FL-, moderada entre *MDM4* e FL+, *MDM4+* e S, *MDM4* e S. Por fim, conclui-se que os dados encontrados correspondem aos achados na bibliografia, indicando que S está mais expresso, principalmente em tumores de mama, mas também de forma geral nas outras amostras. Amostras com mais de um tipo tumoral tem a isoforma S mais expressa, com uma provável indicação do efeito maior de inibição da proteína p53.

Palavras-chave: MDM4; Isoformas; Full-length; Short; Tumor.

ABSTRACT

MDM4 protein with his homologous MDM2 has as major function the p53 negative regulation. It interferes directly in the cellular repair and when the MDM4 gene expression has some problem the MDM4-MDM2-p53 is impaired affecting tumour suppression. The articles suggest that the FL and S MDM4 isoforms have a relation with human cancers development and its evolution. The Mennonites are a Christian population of European origin with 500 years of genetic isolation who established communities in Brazil.

In order to test the ratio between these isoforms, this work compared the isoforms mean expression in the peripheric blood samples obtained from 15 Mennonites who presented some cancer diagnosis in some time of their lives. All tests were made using cDNA obtained from mRNA. Subsequently, using RT-qPCR approach the general MDM4 mean expression and its isoforms MDM4-FL and MDM4-S were determined. The data were analysed by GraphPad Prism program. The comparison between the sample subgroups by the Kruskal-Wallis test, showed that the samples with FL, *MDM4+*, FL+, and S+ were statistically significant ($p < 0.05$), as well as the subgroup FL+ and S+ in comparison with other samples ($p < 0.01$). The Spearman's rank correlation showed that subgroups FL+ and MDM4- were strongly correlated; a strong correlation between S+ and FL-; a moderate correlation between MDM4 and FL+ and, MDM4+ and S as well as MDM4 and S. The literature data were corroborated in this work especially in the breast cancer with high MDM4-S isoform expression and, also in the other tumor types. Interestingly it was observed that the samples with more than one cancer type had the MDM4-S isoform high expressed, suggesting that the presence of more than one cancer type could be related with its p53 greater inhibition effect than the other MDM4 isoforms.

Keywords: MDM4; Isoforms; Full-length; Short; Tumor

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1–ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DE MDM2 E MDM4.....	6
FIGURA 2 – INTERAÇÃO DE MDM4 COM p53	9

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR SEXO E IDADE	13
GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DO GENE <i>MDM4</i>	21
GRÁFICO 3– EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS FL E S	21
GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À MÉDIA	22
GRÁFICO 5 – EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS COM BASE NA MÉDIA GERAL DE CADA SUBGRUPO.....	23
GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE OS SUBGRUPOS	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPORÇÃO DOS TIPOS DE TUMORES APRESENTADOS.....	14
TABELA 2 – QUANTIDADES PARA MIX DA SÍNTESE DE cDNA	15
TABELA 3 – PROGRAMA DO TERMOCICLADOR	16
TABELA 4– REAGENTES DA PCR	17
TABELA 5– PROGRAMA PARA CADA TERMOCICLADOR.....	17
TABELA 6– REAGENTES DA RT-qPCR PARA 1 AMOSTRA.....	18
TABELA 7– PROGRAMA PARA RT-qPCR NO VIIA7	19
TABELA 8 – RELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE CÂNCER E A EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACTB	- Beta-actina
CON	- Colônia Nova
CT	- Cycle threshold
CWB	- Colônia de Curitiba
CWI	- Colônia Witmarsum
E2F1	- E2F transcription factor 1
E2F3	- E2F transcription factor 3
FL	- Full-length
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
MDM	- Mouse Double Minute
MDM4	- Mouse Double Minute 2
MDM2	- Mouse Double Minute 4
PCR	- Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	- Reverse Transcriptase Quantitative PCR
S	- Short
TBE	- Tris/Borato/EDTA
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TPM	- Transcritos por milhão
UTR	- Untranslated region

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
1.1 OBJETIVO.....	5
1.1.1 Objetivo específico	5
1.2 JUSTIFICATIVA	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 MDM4.....	6
2.1.1 Isoformas do gene MDM4	10
2.2 POPULAÇÃO MENONITA	11
2.2.1 População de estudo.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	13
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	14
3.2.1 Termo de consentimento.....	14
3.2.2 Coleta do sangue e processamento de amostras	15
3.2.3 Extração e quantificação do mRNA.....	15
3.2.4 Conversão em cDNA.....	15
3.2.5 PCR.....	16
3.2.6 Eletroforese	18
3.2.7 RT-qPCR.....	18
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	20
4.1 CÁLCULO DE EXPRESSÃO	20
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A proteína MDM4 faz parte da família das proteínas MDM (do inglês “mouse double minute”) é composta pela MDM2 e pela sua homóloga estrutural MDM4 (Toledo; Wahl, 2007). A maior semelhança entre as duas proteínas está no domínio amino-terminal (Fig. 1), uma região que abrange o domínio de ligação ao p53 (Marine *et al.*, 2007). Os resíduos necessários para a interação com p53 são muito conservados nas proteínas MDM2 e MDM4 (Shvarts *et al.*, 1996), bem como os mesmos resíduos em p53 que são necessários para as interações com ambas proteínas (Bottger *et al.*, 1999).

Devido à sua semelhança estrutural com MDM2 e à sua capacidade de inibir a transcrição induzida por p53, supôs-se que MDM4 tivesse função reguladora de p53 (Shvarts *et al.*, 1996; Migliorini *et al.*, 2002). Esta hipótese foi confirmada por estudos de perda de função em duas linhagens de camundongos mutantes.

O *TP53* é um gene supressor de tumor que atua na proteção à integridade do genoma. A proteína p53 é um fator de transcrição do DNA que é mantido em baixos níveis na célula, para manter a integridade celular em condições normais. Esse gene está mutado ou tem seu circuito regulador inativado em boa parte dos cânceres (Jin, 2001). Esse controle acontece por meio da interação do p53 com outras proteínas, entre elas a MDM2, a reguladora central desta via, no entanto, MDM4 participa da regulação do nível de p53 de diferentes maneiras (Almeida, 2022). A importância do MDM4 em cânceres surgiu após ser encontrado amplificado ou superexpresso em 10-20% de mais de 800 tumores diversos.

O MDM4 possui 16 transcritos com diferentes combinações de éxons, sendo 11 transcritos codificantes e 5 que não codificam para alguma proteína, como foi observado por Almeida e colaboradores (2023) na plataforma Ensembl. Cada isoforma apresenta diferentes níveis de expressão em diferentes tumores (Almeida *et al.*, 2023).

Dentre as isoformas conhecidas, tem-se FL e S, que são, respectivamente, o maior e menor transcritos. A isoforma FL é a mais longa e a mais expressa em humanos. A isoforma S é a mais curta e contribui para a regulação da função da MDM4 juntamente com FL (Wu, Lu & Wang, 2021). Essa forma mais curta foi observada primariamente em células de crescimento rápido (Wu, Lu & Wang, 2021).

Para entender melhor essa possível razão entre as isoformas, foi utilizado amostras de sangue de indivíduos menonitas oriundos de colônias brasileiras. A população menonita tem origem europeia, formados a partir do movimento anabatistas. Devido à sua história de migração e grandes reduções populacionais, os menonitas sofreram do efeito gargalo de garrafa por três vezes, além disso, passaram pelo efeito fundador ao estabelecerem colônias isoladas das populações que já habitavam os locais de ocupação, ao todo, os anos de isolamento somam quase 500 anos. Esses “fundadores” não possuem toda a variação genética da população original, o que reduz a variação da nova população a ser fundada. Com isso, a expressão de fenótipos não frequentes na população original pode acontecer, pois, com o isolamento, tende-se a casamentos consanguíneos, aumentando a probabilidade de mais indivíduos com genótipos semelhantes terem filhos com fenótipos que anteriormente eram pouco frequentes. Com isso, a prevalência de doenças pode aumentar, como é o caso de diversos tipos de tumores que são observados nesses indivíduos.

1.1 OBJETIVO

Quantificar a expressão do gene *MDM4* em amostras de sangue oriundas de menonitas.

1.1.1 Objetivo específico

Quantificar a expressão do gene *MDM4* através de amostras de RNA oriundas do sangue de menonitas que apresentaram algum tipo de câncer durante a vida e estabelecer uma correlação com a expressão e a presença de câncer nesses voluntários.

1.2 JUSTIFICATIVA

O gene *MDM4* (mouse double minute 4) tem chamado a atenção nos últimos tempos pela sua grande relevância sobre o controle da via supressora de tumor por meio da proteína de mesmo nome. Esta proteína, por diferentes mecanismos, tem ação supressora da p53, que é uma proteína fundamental para o reparo celular e

supressão de tumores. A superexpressão do *MDM4* e seu homólogo *MDM2*, podem resultar numa alta expressão de proteínas, impedindo que p53 atue reparando os danos celulares e, por consequência, facilitar o surgimento do câncer. A falta de conhecimento sobre a atuação de *MDM4* na tumorigênese dificulta o entendimento dos fatores genéticos que impactam este processo.

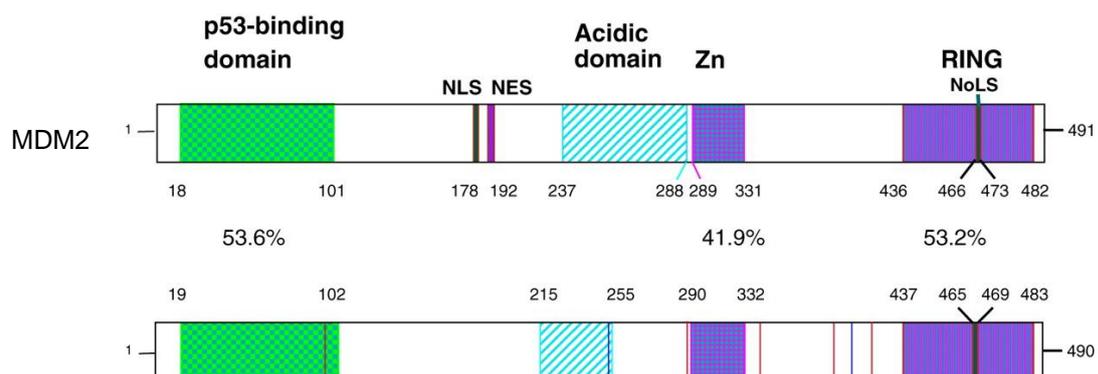
Os avanços descritos na literatura mostram uma correlação entre alterações na expressão da proteína MDM4 e a prevalência de cânceres. Entender quais isoformas, níveis de expressão e em quais tecidos cada isoforma tem maior probabilidade de facilitar o surgimento de um tumor auxiliariam a investigação do avanço da doença, e assim, seria possível apresentar diagnósticos, prognósticos e tratamentos mais eficientes. Por isso, esse estudo busca quantificar a expressão do gene *MDM4* em menonitas que apresentaram câncer em algum momento da vida, a fim de estabelecer uma correlação entre o *MDM4*, suas isoformas *MDM4 -FL* e *MDM4 -S* e o câncer, e observar se há ligação entre a expressão das isoformas e a prevalência do câncer e seus tipos na população menonita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MDM4

A família das proteínas MDM (do inglês “mouse double minute”) é composta pela MDM2 (também chamada de HDM2) e pela sua homóloga estrutural, MDM4, também referida como MDMX ou HDMX (Toledo; Wahl, 2007). A maior semelhança entre as duas proteínas está no domínio amino-terminal (Fig. 1), uma região que abrange o domínio de ligação ao p53 (Marine *et al.*, 2007).

FIGURA 1—ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DE MDM2 E MDM4



MDM4

AUTOR: Marinha e Jochemsen, 2007 (adaptado)

LEGENDA: Comparação entre as estruturas primárias de MDM2 e MDM4. Tendo como destaque em verde o domínio de ligação à p53. Em azul claro o domínio ácido. Em roxo estão o *Zn finger* e o *Ring-finger* (que contém o sinal de localização nuclear – NoLS), respectivamente.

Segundo Linares *et al.* (2003), o gene *MDM2* está localizado no cromossomo 12q14.3-q15 e sua proteína apresenta 491 aminoácidos, enquanto o gene *MDM4* está localizado no cromossomo 1q32 e sua proteína tem 490 aminoácidos, e ambas as proteínas apresentam 31% de similaridade entre seus resíduos de aminoácidos.

Os resíduos necessários para a interação com p53 são estritamente conservados nas proteínas MDM2 e MDM4 (Shvarts *et al.*, 1996), bem como os mesmos resíduos em p53 que são necessários para as interações com ambas proteínas, MDM4-p53 e MDM2-p53 (Bottger *et al.*, 1999). Outra região bem conservada comum às proteínas MDM4 e MDM2 é um domínio RING-finger, localizado no C-terminal dessas proteínas. A integridade do domínio RING-finger é essencial para a heterodimerização MDM4-MDM2 (Sharp *et al.*, 1999; Tanimura *et al.*, 1999). Tanto o MDM2 quanto o MDM4 contêm um domínio adicional de dedo de zinco. As regiões centrais de MDM2 e MDM4 não apresentam semelhança significativa, mas ambas as regiões são ricas em resíduos ácidos.

Experimentos genéticos demonstraram a importância da interação entre MDM2 com p53. Camundongos deficientes em MDM2 apresentam morte prematura, antes mesmo de haver a implantação no útero, enquanto camundongos com deficiência de MDM2, mas que também apresentavam ausência de p53 são viáveis e indistinguíveis de camundongos sem p53 (Montes de Oca Luna *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995).

MDM4 foi originalmente isolada como uma nova proteína que interage com p53 a partir de uma biblioteca de expressão de cDNA de camundongo, enquanto em humanos, seu ortólogo, MDM4, foi identificado apenas mais tarde (Shvarts *et al.*, 1996; Shvarts *et al.*, 1997).

Devido à sua semelhança estrutural com MDM2 e à sua capacidade de inibir a transcrição induzida por p53, supôs-se que MDM4 tivesse função reguladora de p53 (Shvarts *et al.*, 1996; Migliorini *et al.*, 2002). Esta hipótese foi confirmada por

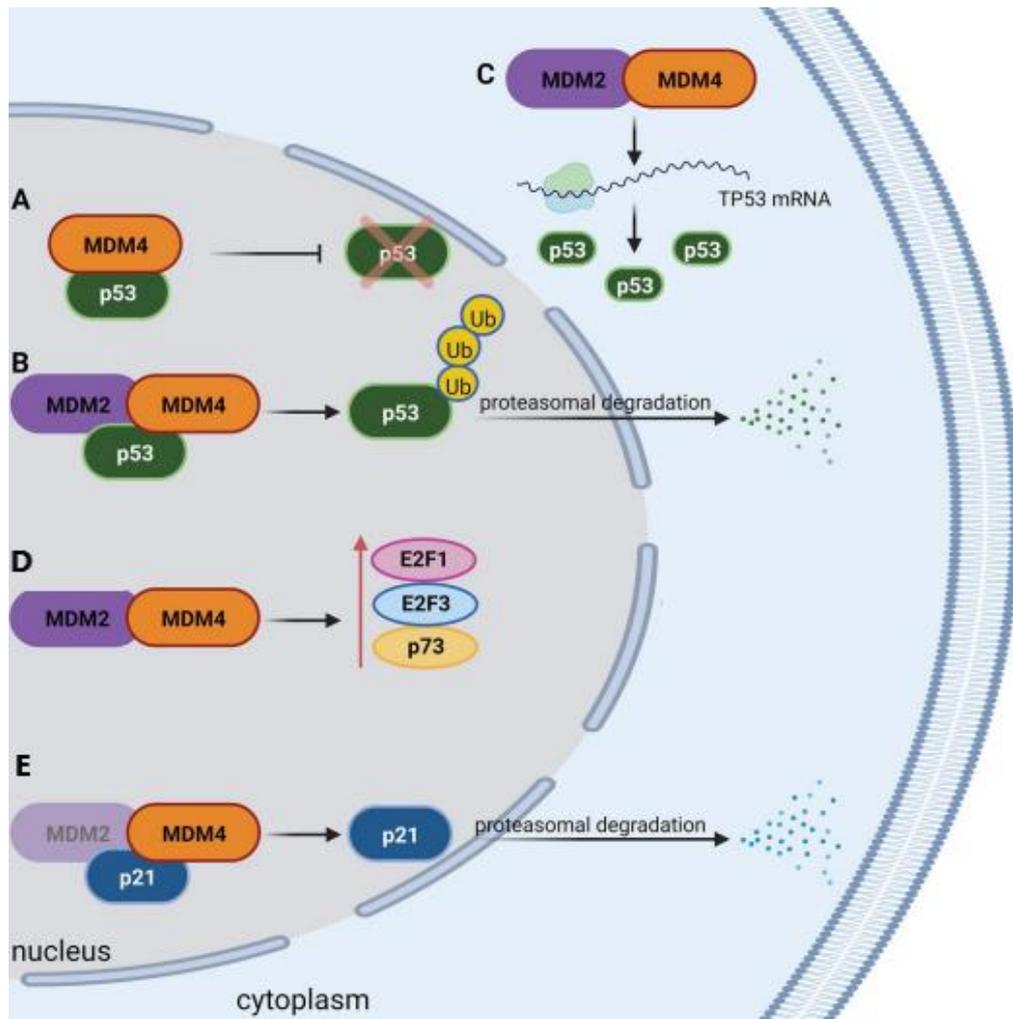
estudos de perda de função em duas linhagens de camundongos mutantes, que concluíram que, semelhantemente à MDM2, a MDM4 atua *in vivo* como um regulador negativo essencial, não redundante à função da MDM2, do p53 durante o desenvolvimento embrionário.

O *TP53* é um gene supressor de tumor que atua na proteção à integridade do genoma. A proteína p53 é um fator de transcrição do DNA que é mantido em baixos níveis na célula, para manter a integridade celular em condições normais. Esse gene está mutado ou tem seu circuito regulador inativado em boa parte dos cânceres (Jin, 2001). Sinais de estresse celular podem estabilizar e ativar a transcrição do p53, danos ao DNA são um exemplo de sinal. Assim que é ativado, o gene supressor é expresso em proteína e inicia a sinalização de reparo celular ou apoptose (Jin, 2001).

A regulação da função da p53 é de suma importância para o crescimento e desenvolvimento normal da célula, para isso existem mecanismos de controle de atuação. Esse controle acontece por meio da interação do p53 com outras proteínas, entre elas a MDM2, a reguladora central desta via, no entanto, MDM4 participa da regulação do nível de p53 de diferentes maneiras (Almeida, 2022).

A inibição da p53 pela MDM4 acontece de algumas formas diferentes (Fig. 2). Uma forma é pela ligação direta da MDM4 à p53 (Fig.2A), que revoga a supressão tumoral de sua função e bloqueia sua atividade transcricional promotora de reparos ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose. Outro jeito é a estabilização de MDM2 pela MDM4 (Fig.2B), aumentando a ubiquitinação de p53 e sua degradação proteossomal pelo heterodímero MDM2-MDM4 (Wang; Jiang, 2011). Esse heterodímero pode ainda promover a síntese de p53 durante o estresse genotóxico, ativando fatores de transcrição do mRNA do p53 (Fig. 2C) e atuar como um promotor do ciclo celular mantendo altos níveis de fatores de transcrição E2F1, E2F3 e p73 quando o p53 do tipo selvagem está ausente (Fig.2D). Por fim, MDM4 sozinho ou em cooperação com MDM2, pode promover a transição da fase G1 do ciclo celular para a fase S inicial, ligando-se diretamente a p21 para mediar sua degradação proteossômica (Fig.2E) (Almeida *et al*, 2022).

FIGURA 2 – INTERAÇÃO DE MDM4 COM p53



AUTORA: Almeida, 2022 (adaptado)

LEGENDA: **A** - MDM4 se ligando diretamente ao p53 e inibindo-o; **B** - Inativação por ubiquitinação e degradação proteossomal sinalizados pelo heterodímero MDM2-MDM4; **C** – O heterodímero MDM2-MDM4 estimula o fator de transcrição para produzir p53; **D** – O heterodímero MDM2-MDM4 promove o ciclo celular ao manter fatores de transcrição a altos níveis; **E** – MDM4 somente ou associado a MDM2 induz progressão no ciclo celular pela degradação de p21.

Em condições normais, essas duas proteínas possuem feedback autorregulatório, mecanismo no qual a p53 pode ativar a transcrição de MDM2 (Picksley; Lane, 1993), e a atividade regulatória do heterodímero MDM2-MDM4 é responsável por manter baixos os níveis de p53 quando esta proteína não é necessária (Toledo *et al.*, 2006). Como já visto, durante o estresse celular, MDM2 promove a autodegradação e degradação da MDM4, deixando p53 livre para ativar fatores de transcrição, promovendo o reparo do DNA, parada do ciclo celular e apoptose. Devido a essa importante regulação e autoregulação, alterações na

regulação de p53-MDM2-MDM4 são conhecidas pela sua presença em diversos tipos de câncer (Yu *et al.*, 2020).

A importância do MDM4 em cânceres humanos emergiu no início do terceiro milênio, pois foi encontrado amplificado ou superexpresso em 10-20% de mais de 800 tumores diversos, incluindo câncer de pulmão, cólon, estômago e mama (Toledo e Wahl, 2006) e chamou a atenção pela presença em 65% dos retinoblastomas (Laurie *et al.*, 2006).

2.1.1 Isoformas do gene MDM4

No genoma humano o gene *MDM4* possui 46.742 pares de base com 11 éxons principais e 2 alternativos. A porção 5'UTR (untranslated region) inclui o éxon 1, enquanto o códon de início AUG encontra-se no éxon 2. O códon de parada está no éxon 11, o qual possui uma parte significativa não traduzida (3'UTR). O MDM4 possui 16 transcritos com diferentes combinações de éxons, sendo 11 transcritos codificantes e 5 que não codificam para alguma proteína, como foi observado por Almeida (2023) na plataforma Ensembl. Ainda observado por Almeida (2023), na base de dados GTEx, alguns tecidos possuem expressão relativamente elevada deste gene em transcritos por milhão (TPM), como é o caso do ovário, útero, pele, pulmão, próstata, cérebro e mama. Porém, não existem evidências de que os valores basais influenciam o desenvolvimento de câncer.

O transcrito que contém todos os éxons principais (11) do gene corresponde à isoforma MDM4-FL (*full-length*). Quando codificada, esta proteína possuirá todos os domínios conservados evolutivamente: a porção N-terminal com o domínio de ligação a p53, seguido pelos domínios ácido, de zinco (*Zn finger*) e o C-terminal em anel (*Ring finger*) (Shvarts *et al.*, 1996; Shvarts *et al.*, 1997). Outras isoformas de MDM4 já foram descritas, elas são formadas durante a transcrição pelo mecanismo de *splicing* alternativo, e possuem diversas combinações de éxons nos transcritos e de domínios presentes nas isoformas, o que afeta de forma direta a estabilidade e funcionalidade da proteína MDM4 nas células (Mancini; Conza; Moretti, 2009). Dentre as isoformas conhecidas estão a MDM4-FL, MDM4-S, MDM4-G, MDM4-A, MDM4-211, MDM4-ALT1 e MDM4-ALT2. (Maximiano, 2022).

A isoforma *full-length* é a mais longa e predominante. A isoforma MDM4-A ocorre quando há remoção do éxon 9, codificando para uma proteína sem boa parte

da região ácida (Wu, Lu & Wang, 2021). Além de estar mais expresso do que FL em casos de melanoma, também tem correlação com baixa sobrevivência do paciente. O *splicing* alternativo entre os éxons 2 e 11 resulta na isoforma MDM4-211, que forma uma proteína sem domínio de ligação à p53, portando apenas o *ring-finger*, que se liga como estabilizador de MDM2, e é altamente expresso em tumor de tireoide. Se removido o éxon 6 e adicionado um códon de parada se forma o MDM4-S (short). Essa isoforma é encontrada superexpressa em diversos tipos de câncer em humanos e está relacionada a um pior prognóstico para o paciente. Porém, de acordo com (Bardot; Toledo, 2015), o aumento nos níveis do mRNA dessa isoforma não garante a elevação da expressão da proteína MDM4-S, mas acaba tendo como consequência a redução da expressão da proteína MDM4-FL. A razão entre MDM4-S/MDM4-FL pode se tornar um importante biomarcador de prognóstico. A isoforma MDM4-G resulta da deleção dos éxons 3, 4, 5 e parte do éxon 6. Essa proteína possui tanto o domínio N-terminal quanto o C-terminal, mas não possui o domínio de ligação a p53. Ainda assim tem capacidade de regular negativamente p53 pela estabilização de MDM2 (Wu; Lu; Wang, 2021), juntamente com MDM4-A, foi encontrado em linhagens de câncer de ovário. A isoforma MDM4-ALT1 possui 24 aminoácidos a mais do que a isoforma S, possui deleção dos éxons 6, 7, 8 e 9 e adição de um códon de parada no éxon 10 (Wu; Lu; Wang, 2021) e é descrito em cânceres de mama. Por fim, a variante MDM4-ALT2 deriva de uma deleção consecutiva entre os éxons 4 a 9. A proteína resultante não possui o domínio de ligação a p53, mas apresenta o domínio RING-finger (Maximiano, 2022). Essa isoforma está associada a um alto risco de metástase em casos de rabdomiossarcoma.

2.2 POPULAÇÃO MENONITA

Os menonitas, como são conhecidos os pertencentes de um grupo religioso cristão protestante, que surgiu no século XVI durante o movimento Anabatista na Europa, iniciaram o movimento migratório na primeira metade do século XX para diversos países. Antes dessa onda migratória, os menonitas já haviam passado por pelo menos três gargalos na europa e vivem em comunidades isoladas há mais de 20 gerações (Oliveira *et al.*, 2023).

No Brasil, 200 famílias (ao todo aproximadamente 1200 pessoas) desembarcaram em Santa Catarina no ano de 1930. A partir do estado catarinense, diversas famílias se mudaram para Curitiba, e 86 foram para o Rio Grande do Sul, fundando a Colônia Nova (CON). Em 1951, 455 pessoas de 74 famílias, formaram a Colônia Witmarsum (CWI), em Palmeira, Paraná (Lopes *et al.*, 2016).

Ainda na Europa, a maioria dos casamentos era aleatório no início das comunidades, porém após 5 séculos de isolamento a consanguinidade se tornou inevitável. A endogamia dos menonitas foi um forte fator para o aumento da homozigotidade acima do previsto pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, levando à expressão de fenótipos recessivos específicos devido ao compartilhamento dos alelos dentro das famílias (Hou *et al.*, 2017; Pardo-Seco *et al.*, 2016; Toscanini *et al.*, 2016). Dentre esses fenótipos, o surgimento de doenças nas quais os fatores genéticos são muito influentes acaba sendo comum nessa população, como é com o câncer. Essa doença tem alta prevalência nas colônias menonitas brasileiras.

Por apresentar em sua história diversos “gargalos de garrafa”, efeito fundador e registros genealógicos precisos, os menonitas oferecem um bom modelo para estudo de doenças complexas (Jaworski *et al.*, 1988), como o câncer, que é o foco deste trabalho, pois pode-se avaliar diversos fatores e tipos de tumores de forma facilitada, observando esses indivíduos.

2.2.1 População de estudo

O grupo selecionado para a pesquisa são de 15 menonitas de três colônias diferentes, são elas Colônia Nova (CON), Colônia Witmarsum (CWI) e Colônia de Curitiba (CWB) que em algum momento da vida apresentaram alguma forma de câncer em órgão sólido.

Pode-se subdividir o grupo amostral total pela variedade de sítios primários do câncer (qual o local inicial da doença, ou seja, não considerando metástase) que cada doador da amostra apresentou durante a vida até o momento da coleta. O grupo que possuiu apenas um diagnóstico de câncer até o momento referido contempla 13 amostras, já o grupo que durante a vida teve mais de um diagnóstico de câncer compreende 2 amostras.

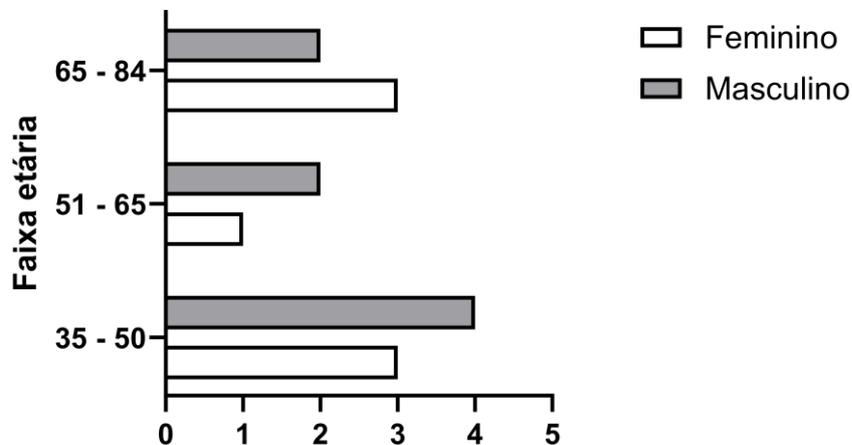
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O material coletado para a obtenção das amostras utilizadas foi o sangue de menonitas que possuíam diagnóstico de tumor sólido. O grupo selecionado para a pesquisa foram 15 amostras, previamente coletadas, processadas e registradas no banco de dados do laboratório, escolhidas aleatoriamente dentre outras amostras de voluntários, o único critério utilizado foi que as amostras já tivessem passado pelos processamentos necessários para se obter o RNA e ao fim o cDNA.

Dentre os voluntários que doaram sangue, 8 eram do sexo masculino e 7 do sexo feminino (GRÁFICO 1). Os doadores também informaram a idade ao serem diagnosticados pela primeira vez com câncer, a faixa etária variou dos 35 aos 84 anos.

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR SEXO E IDADE



Autora: Zimmermann, 2023

Dentre o grupo estudado, duas amostras eram de menonitas que foram diagnosticados duas vezes com câncer, uma amostra do sexo masculino e a outra amostra era do sexo feminino, ambos tiveram seu primeiro diagnóstico de câncer aos 35 anos.

Ao todo, 6 tipos de cânceres acometeram esse grupo (TABELA 1).

TABELA 1 – PROPORÇÃO DOS TIPOS DE TUMORES APRESENTADOS

Tipos de tumor	Total bruto	Total %
Carcinoma Basocelular (CBC)	6	35,29
Câncer de mama	5	29,41
Melanoma	3	17,65
Câncer de próstata	2	11,76
Carcinoma de Células Renais (CCR)	1	5,88
Tumor benigno em osso craniano	1	5,88

FONTE: Zimmmermann, 2023

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o estudo foram utilizadas amostras de RNA já extraído e quantificado previamente pelo grupo de estudos. O material inicial para que se obtivesse o RNA foi o sangue coletado dos menonitas em tubo próprio para a conservação do mRNA, o tubo PAXGENE®, estes foram armazenados em freezer de -20°C até o momento de extração. A extração do RNA foi feita por meio de protocolo adaptado previamente pelos pesquisadores do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) – departamento de genética. Após a extração a quantificação foi realizada imediatamente para se confirmar o sucesso do procedimento ou indicar a necessidade de nova extração com outra amostra do mesmo voluntário. Em caso de extração bem sucedida, o RNA era armazenado em freezer a -80°C até o momento de utilização.

Após a seleção das amostras, estas foram convertidas em cDNA por protocolo adaptado previamente e armazenado em freezer a -20°C. A confirmação do sucesso da conversão e garantia de não contaminação foi feita pela reação de PCR com primers do gene alvo e controle. Posteriormente, os produtos da PCR foram visualizados por meio de eletroforese e revelação do gel em fotodocumentador.

Quando não houveram sinais de contaminação e o gene alvo foi amplificado foi possível seguir para a próxima etapa, que compreendeu a realização de uma PCR em tempo real para obter os dados de expressão e análise destes dados.

3.2.1 Termo de consentimento

Os voluntários que doaram o sangue são menonitas das colônias CWI, CBW e CON. Estes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) número 55528222.9.0000.0102, onde foi explicitado o objetivo da coleta e do estudo, o motivo para a seleção dos menonitas para a etapa de coleta, informados sobre um possível desconforto ao fornecer dados pessoais e amostras biológicas, e apontado o benefício para o voluntário ao participar da pesquisa. Sendo assim, as informações aqui contidas respeitam o TCLE, pois mantém o sigilo ao não indicar identificação pessoal, apenas por códigos, e estuda uma das doenças informadas no termo.

3.2.2 Coleta do sangue e processamento de amostras

As amostras de sangue foram coletadas em tubos PAXGENE® e armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração do RNA.

3.2.3 Extração e quantificação do mRNA

A extração do RNA em tubos PAXGENE® ocorreu conforma instruções do fabricante com adaptações previamente feitas pelos colaboradores do LGMH.

Após a extração, foi feita a quantificação das amostras de RNA no equipamento Quantus Fluorimeter®. Após a leitura, o RNA foi armazenado a -80°C.

3.2.4 Conversão em cDNA

Para a quantificação da expressão do gene MDM4 nas amostras foi necessário converter o mRNA em cDNA, pois o segundo é mais estável e menos suscetível à degradação pela manipulação e ambiente. A conversão foi feita com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® usando o seguinte protocolo para 1 amostra com volume final de 20µL (TABELA 2):

TABELA 2 – QUANTIDADES PARA MIX DA SÍNTESE DE cDNA

Componentes	Volume (µL)
10X RT buffer	2,0
100nM dNTP	0,8
10X Random primers	2,0
MultiScribe® Reverse Transcriptase	1,0

Componentes	Volume (µL)
RNAse inhibitor	0,5
RNA	13,7
Total	20

FONTE: Zimmermann, 2023

Para cada amostra de RNA foi feita um mix com a enzima MultiScribe® Reverse Transcriptase e um mix sem a enzima, como forma de controle para conferir se não havia contaminação por DNA externo na amostra. Os dois mixes foram feitos em paralelo sem a adição do RNA, que foi adicionado individualmente em cada microtubo de reação.

Após a adição do mix e do RNA aos microtubos, a reação foi levada ao termociclador para completar a síntese de cDNA. A ciclagem no equipamento foi a seguinte (TABELA 3):

TABELA 3 – PROGRAMA DO TERMOCICLADOR

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
10	25
120	37
5	85

FONTE: Zimmermann, 2023

Após a ciclagem os tubos de cDNA e controle foram armazenados em freezer a -20°C até o momento de uso.

3.2.5 PCR

Para confirmar que não houve contaminação do RNA e cDNA foi feita uma *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tanto com as amostras de reação como com as controle. A PCR foi feita com dois mixes, cada um com *primer* para um gene, o *MDM4* e o *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), o primeiro para testar se as amostras possuíam o gene estudado, de maneira não específica quanto às isoformas do gene, já o segundo foi utilizado como controle do sucesso da reação de cDNA, pois sabia-se que esse gene está expresso de forma constitutiva na espécie humana.

Para os mixes da reação, foram utilizados os reagentes apresentados na TABELA 4 (valores para reação de um microtubo), sendo feitos paralelamente até o

momento de adicionar o cDNA, esse último componente foi colocado individualmente em cada microtubo da reação para PCR.

TABELA 4– REAGENTES DA PCR

Reagentes	[] estoque	[] de uso	Volume (µL)
Tampão	10X	1X	1,0
dNTP	2mM	0,2mM	1,0
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,3
<i>Primer forward</i>	20 µL	0,5mM	0,25
<i>Primer reverse</i>	20 µL	0,5mM	0,25
GoTaq® Polymerase	5U/ µL	1U/ µL	0,2
cDNA	200mg	200mg	1
H ₂ O	-	-	6
Total	-	-	10

FONTE: Zimmermann, 2023

Após a conclusão da mistura dos reagentes da reação os microtubos foram levados ao termociclador. Devido à temperatura de anelamento ser levemente diferente para os dois genes, cada um foi ciclado em uma máquina, para que fosse possível utilizar a temperatura de anelamento ideal de cada primer (TABELA 5).

TABELA 5– PROGRAMA PARA CADA TERMOCICLADOR

Repetições	Tempo	Temperatura (°C) GAPDH	Temperatura (°C) MDM4
1x	5 minutos	95	95
35x	30 segundos	94	94
	45 segundos	60	65
	45 segundos	72	72
1x	5 minutos	72	72
∞		4	4

FONTE: Zimmermann, 2023

Após o termino da ciclagem da PCR as amostras seguiram para a eletroforese.

3.2.6 Eletroforese

Para observar o resultado da PCR foi utilizado o método da eletroforese em gel de agarose. O gel foi feito com agarose e TBE 0,5X, na concentração de 1% de agarose. Para a visualização posterior, foi adicionado 2 µL do revelador UnySafe Dye com o gel ainda líquido em temperatura morna. Foi utilizado todo o produto da PCR (10 µL) na eletroforese, cada amostra sendo acrescida de 2 µL de Gel Loading Buffer, para acompanhar o processo no gel, que “correu” por 45 minutos com uma voltagem de 80V.

Após o término do tempo, o gel foi levado para ser revelado em um fotodocumentador de luz UV, onde foi possível observar as bandas nos poços onde a amostra era de reação (tanto *MDM4* quanto *GAPDH*) e a ausência de bandas nos poços onde estava o controle do cDNA.

3.2.7 RT-qPCR

Após a confirmação pela PCR e eletroforese, as 15 amostras passaram pela quantificação via RT-qPCR. Para a realização dessa etapa, foi utilizado o gene Beta-actina (*ACTB*) como controle, pois é de expressão constitutiva nos humanos. Cada amostra foi feita em duplicata para os dois genes, e cada gene possuiu 2 reações branco, onde no lugar do cDNA iria H₂O RNase Free.

Como se tratavam de dois genes, foram feitos dois mixes em paralelo (TABELA 6) diferindo apenas nos primers, um levou os de *MDM4* e o outro os de *ACTB*. Os cDNA foram diluídos previamente com H₂O na proporção 1:5, e foram adicionados individualmente a cada poço da placa.

TABELA 6– REAGENTES DA RT-qPCR PARA 1 AMOSTRA

Reagentes	[] de uso	Volume (µL)
GoTaq® Polymerase	2X	5,0
Primer forward	10mM	0,25
Primer reverse	10mM	0,25
cDNA	-	1
H ₂ O RNase Free	-	1,5
Total	-	8

FONTE: Zimmermann, 2023

Após a adição do mix e do cDNA aos poços, a placa foi selada, centrifugada e levada ao equipamento Vii7[®] para que a reação ocorresse (TABELA 7).

TABELA 7– PROGRAMA PARA RT-qPCR NO VIIA7

Repetições	Tempo	Temperatura (°C)
1x	2 minutos	50
	10 minutos	95
40x	15 segundos	95
	1 minuto	60
1x	1 minuto	60
	15 segundos	95

FONTE: Zimmermann, 2023

Após o termino da reação, a placa foi armazenada em freezer e os dados salvos em planilha.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 10.1.1. Com base sempre nas médias das amostras para cada forma de expressão, os dados passaram pela ferramenta do próprio programa para a normalização, mas ao não normalizarem, foram então utilizados no teste de Kruskal-Wallis, para determinar se a diferença entre os dados era significativa, e o teste de correlação de Spearman, para observar uma possível ligação entre duas formas de expressão distintas.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 CÁLCULO DE EXPRESSÃO

A partir dos dados obtidos pelo processo da RT-qPCR (CT- cycle threshold, ou seja, valor máximo de expressão que foi possível alcançar), foi feito o cálculo da expressão de *MDM4* para se definir as próximas etapas. Os dados das duplicatas de cada amostra foram transformados em média. A partir desse valor, foi calculada a média geral da expressão daquelas amostras (Média de cada amostra/15), a fim de utilizar este valor como referência do teste.

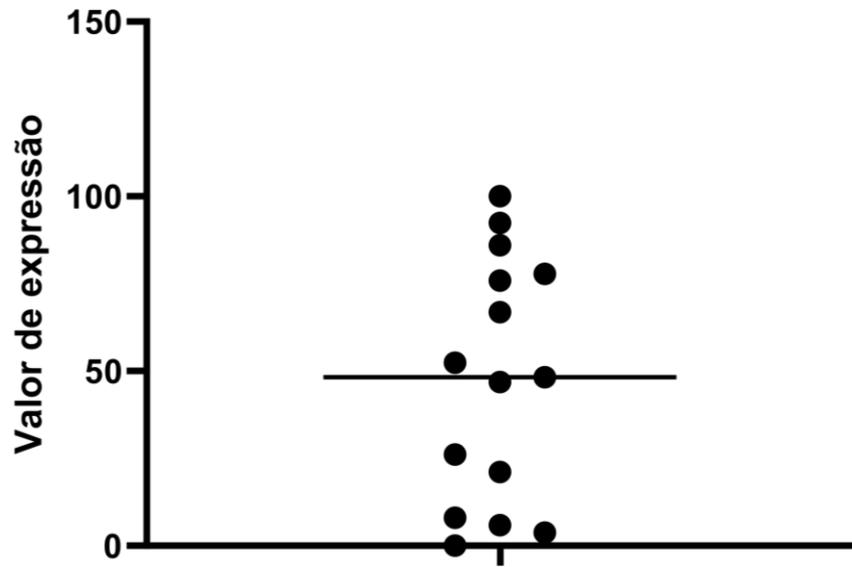
Com esse valor referência determinado, foi calculado o ΔCT , que é a média da amostra menos o valor referência. Após obter o ΔCT de cada amostra, foi novamente feita uma média, agora com estes valores, a fim de estabelecer um valor de referência para a análise. Esse último dado, chamado de $\Delta\Delta CT$, foi obtido pela subtração do ΔCT individual pela média dos ΔCT , estabelecendo assim qual a proporção de expressão do gene na amostra em relação à referência, se maior ou menor do que a média geral das amostras.

Após se observar uma alta expressão geral do *MDM4*, a pesquisa seguiu adiante com o objetivo de determinar qual isoforma estava mais presente, se a FL ou a S. Os dados obtidos por essas amostras foram trabalhados da forma descrita neste tópico

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

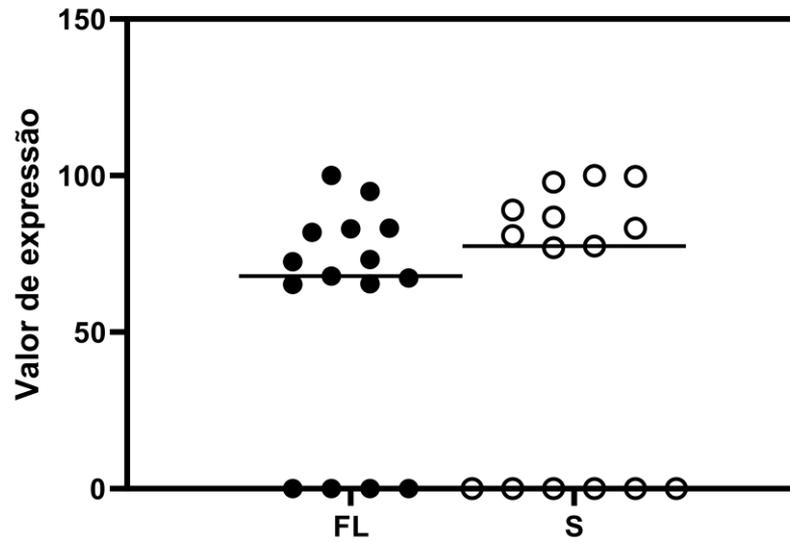
Das 15 amostras estudadas, em relação à média, 7 tiveram a expressão do *MDM4* elevada, 6 apresentaram baixa e 2 permaneceram na média (GRÁFICO 2). Quando se avaliou a expressão das isoformas FL e S no total de amostras, foi possível observar que a maioria se manteve acima da média ou próximo dela, 11 amostras FL e 9 S (GRÁFICO 3). No GRÁFICO 4, é possível observar a expressão de cada isoforma do gene nas amostras estudadas e compará-las com a média geral de cada.

GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DO GENE *MDM4*



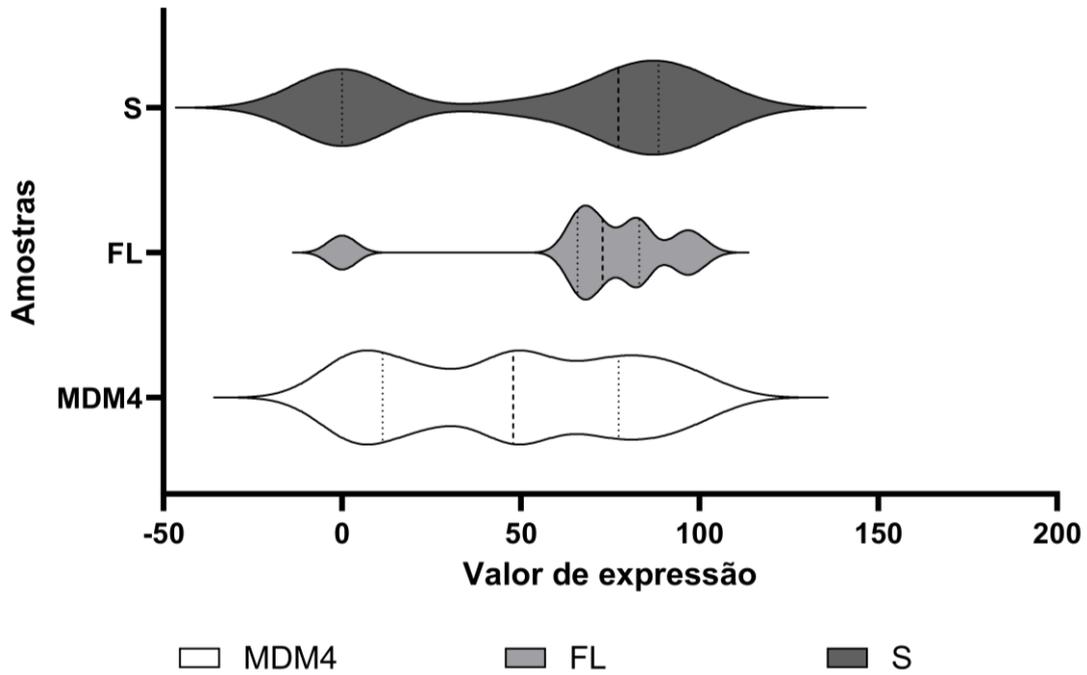
FONTE: Zimmermann, 2023

GRÁFICO 3– EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS FL E S



FONTE: Zimmermann, 2023

GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À MÉDIA

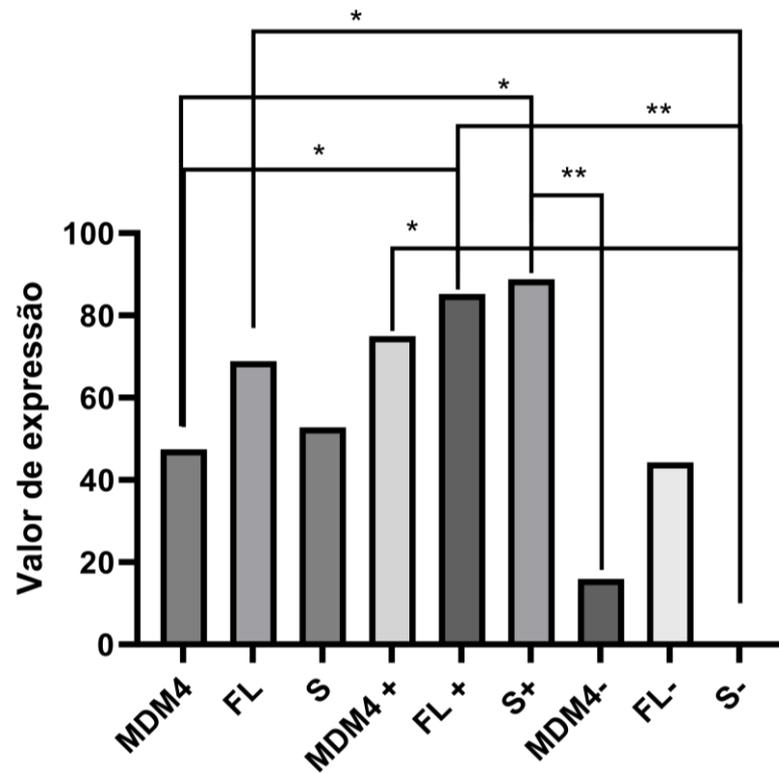


FONTE: Zimmermann, 2023

Após a avaliação da expressão das isoformas de modo geral, as amostras foram divididas em três subgrupos: alta, baixa e expressão geral. Assim que agrupados, os dados passaram pelo teste de Kruskal-Wallis, a fim de identificar diferenças significativas entre os diferentes subgrupos (GRÁFICO 5).

Por último, foi realizado um teste de correlação de Spearman, com os mesmos três subgrupos anteriores, com o objetivo de observar uma possível relação estatística entre as amostras (GRÁFICO 6).

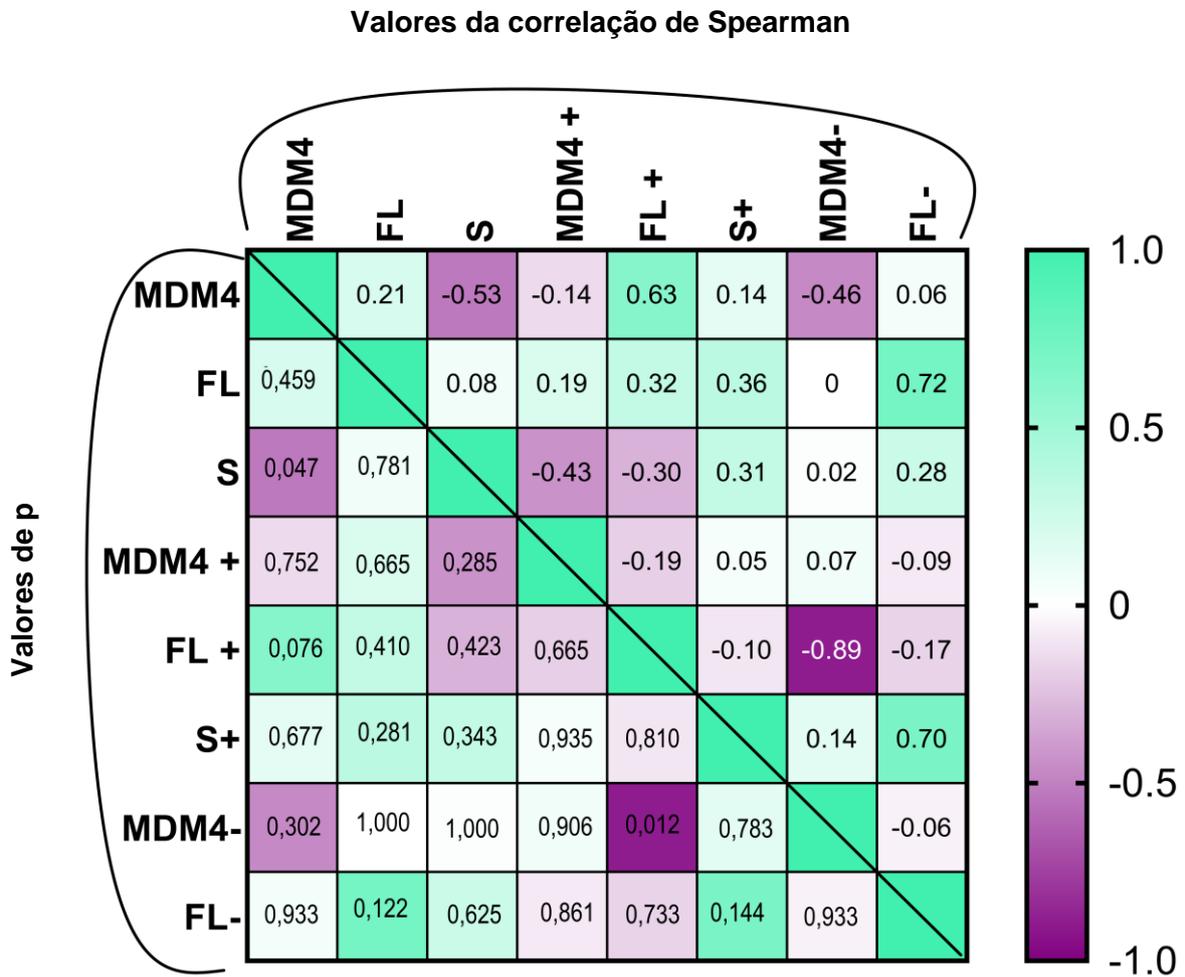
GRÁFICO 5 – EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS COM BASE NA MÉDIA GERAL DE CADA SUBGRUPO



FONTE: Zimmermann, 2023.

Legenda: *MDM4*, *FL* e *S* compreendem as médias gerais. *MDM4+*, *FL+* e *S+* são de alta expressão. *MDM4-*, *FL-* e *S-* são de baixa expressão. As barras sinalizadas com asterisco (*) apresentaram diferença significativa (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE OS SUBGRUPOS



FONTE: Zimmermann, 2023.

4.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

É notável a diferença entre as amostras avaliadas para o gene *MDM4* sem a especificação entre as isoformas (GRÁFICO 2), as médias se espalharam indo de uma superexpressão (amostra 13) até uma expressão considerada estatisticamente não relevante (amostra 8).

Porém, como mostrado no gráfico 3, quando as isoformas são especificadas elas apresentam um comportamento “extremo”, pois ou estão acima da média, ou muito próximo, ou estão completamente ausentes. Levantam-se duas hipóteses sobre a causa dessas ausências: há a exclusiva (ou muito mais relevante estatisticamente) expressão de alguma outra isoforma não testada nesta pesquisa

ou pode haver uma correlação entre a expressão elevada de uma isoforma testada em detrimento da outra.

No gráfico 4, é possível visualizar o motivo do levantamento das duas hipóteses. A primeira pode ser aplicada às amostras 12 e 13, pois, apesar da elevadíssima expressão de *MDM4*, não houveram resquícios da presença de FL ou S. A segunda hipótese se baseia no fato de que nas amostras que expressaram as três formas do *MDM4*, todas tiveram a expressão da isoforma S com mais intensidade, sendo sempre maior que a sua média geral. Também tende a essa suposição o observado nas amostras ausentes de S, pois há alta expressão de *MDM4* geral e FL.

A fim de saber se a diferença apresentada entre as isoformas é significativa, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado a todos os subgrupos de expressão das isoformas (GRÁFICO 5). Houveram quatro subgrupos que apresentaram significância ($P < 0,05$) quando comparado a outro subgrupo. A forma FL teve significativa diferença quando comparada à forma S-, assim como a forma *MDM4+* e FL+, sendo esta última a de maior significância. Da mesma maneira, S+ e FL+ apresentaram significância em relação a *MDM4-*, sendo S+ mais significativo. Ainda S+, este foi significativo em relação a *MDM4*.

Para observar uma possível correlação entre essas diferenças, o gráfico 6 apresenta todos os subgrupos estudados e os compara entre todos, possibilitando aferir se há correlação entre as amostras e, quando existem, se são de natureza positiva (aumenta quando a outra aumenta) ou negativa (diminui quando a outra aumenta). Deve-se ignorar os valores repetidos. A forma S- não aparece pois teve expressão não significativa (próximo de zero). Para fins de referência, pode-se assumir que, independentemente do sinal do coeficiente de correlação (r), se o valor está: é igual a 1, a correlação é perfeita; acima de 0,70 há forte correlação; entre 0,69 e 0,40 é moderada; abaixo de 0,40 é fraca.

Iniciando pela primeira linha, onde compara *MDM4* aos outros subgrupos, há uma correlação negativa moderada com S, sugerindo que quando há expressão média de um, o outro terá elevação ou redução significativa. Já com FL+ a relação é moderada e positiva, apontando que em amostras de *MDM4* médio é mais comum a alta expressão de FL.

Em FL, apesar de não haver r maior do que 0,40, há um valor próximo em S+, indicando que existe uma correlação positiva fraca tendendo a moderada,

sugerindo que a alta expressão de S acontece em amostras de expressão média de FL.

Observando S, no valor com *MDM4*⁺ há uma correlação moderada negativa, que pode significar que na alta expressão de *MDM4* a expressão de S fugirá da média, assim como em caso de S estar mediano o *MDM4* não estaria alto.

Já em FL⁺, há uma correlação negativa muito forte com a baixa expressão de *MDM4*, indicando que altas expressões de FL não acontecem em baixas expressões de *MDM4*. Dessa forma, é correto afirmar que numa amostra *MDM4*⁻ não haverá alta expressão de FL.

Com foco em S⁺, *r* é positivo e alto, supondo que há correlação direta entre a alta expressão de S quando há baixa de FL, pode-se afirmar que nesses casos a isoforma S será a maioria do *MDM4* expresso nessa amostra.

Com essas informações, tenta-se estabelecer uma correlação entre a isoforma e sua expressão com o tipo de câncer apresentado por cada voluntário (TABELA 8).

Das seis amostras de CBC, três apresentaram alta de *MDM4* (3,4 e 7), acompanhada de alta expressão de FL e baixa de S. Nas que tiveram baixa expressão de *MDM4* (6,8 e 15), não houve consenso quanto aos níveis de FL, mas todos apresentaram alta em S.

Dentre as cinco amostras de câncer de mama, observando apenas o *MDM4*, duas tiveram alta (5 e 12), duas igual (1 e 14) e uma baixa (9). Em relação a FL, quatro tiveram alta, apenas a amostra 12 mostrou baixa expressão, também foi vista na forma S desta, mas chama a atenção para a alta expressão do *MDM4*. Quanto às outras amostras, apenas a 5 teve baixa expressão de S, as três restantes apresentaram alta.

Nas amostras de melanoma, todas as amostras (2, 8 e 9) apresentaram baixa expressão de *MDM4* e alta de S. Cada uma apresentou uma quantidade diferente de expressão de FL.

As amostras 10 e 11 são de câncer de próstata. Não houve consenso entre a expressão de *MDM4* e FL, mas S esteve elevado em ambos.

A única amostra de tumor em osso (9) teve baixa expressão de *MDM4* e alta das isoformas FL e S.

No CCR, houve alta expressão de *MDM4*, mas baixa nas isoformas estudadas.

É interessante observar que nas amostras com mais de um tipo de câncer (8 e 9), a expressão de *MDM4* foi considerada abaixo da média geral, mas a isoforma S esteve altamente presente. Outro ponto semelhante é o tipo de tumor apresentado, ambos voluntários apresentaram melanoma em algum momento da vida. A amostra 8, fugindo do padrão das outras amostras de CBC, apresenta baixa FL. A amostra 9, em relação ao câncer de mama, seguiu a tendência da maioria das outras amostras de mesmo tipo e teve alta em S e FL, apesar da baixa expressão de *MDM4*.

Outro ponto relevante é a existência de amostras de alta expressão de *MDM4*, mas que não apresentaram FL ou S (12 e 13). Nesses casos, pode ser que outra isoforma, que não foi avaliada nesse estudo, esteja presente e seja responsável pela expressão do *MDM4* nessas amostras.

Conforme observado em bancos de dados por Almeida (2023), pele, próstata e mama são tecidos de expressão relativa elevada para *MDM4*. Esses dados conversam parcialmente com os resultados encontrados neste estudo, pois das 16 vezes onde esses foram os sítios iniciais do câncer, seis tiveram alta, oito baixa e duas na média. Porém, deve-se atentar que os dados apresentados por Almeida (2023) são de amostras de expressão normal, sendo assim, a presença de alterações na expressão pode estar ligada ao diagnóstico de câncer.

De acordo com a literatura (Toledo; Wahl, 2006), alta da expressão de *MDM4* está presente em 10-20% de mais de 800 tumores diversos, incluindo câncer de pulmão, cólon, estômago e mama. O observado nos resultados deste trabalho foi de que essa relação está presente em 40% das amostras de sangue com diagnóstico anterior de tumores de mama e 40% tiveram expressão média.

Rallapalli e colaboradores (2003) estudaram a isoforma S com mais afinco e propuseram que, após a codificação em proteína, esta se liga com mais afinidade a p53 para suprimi-lo do que FL e MDM2. Porém, nem toda a alta expressão de S se tornará proteína, mas a elevada expressão desta reduz a de FL (Bardot; Toledo, 2015). Este achado conversa diretamente com o visto no gráfico 6, onde é mostrado que a alta expressão de S tem forte relação com a baixa expressão de FL.

TABELA 8 – RELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE CÂNCER E A EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS

Amostra	Tipo de câncer	Expressão em relação à média – <i>MDM4</i>	Expressão em relação à média – <i>FL</i>	Expressão em relação à média – <i>S</i>
1	Mama	Igual	Alta	Alta
5	Mama	Alta	Alta	Baixa
12	Mama	Alta	Baixa	Baixa
14	Mama	Igual	Alta	Alta
2	Melanoma	Baixa	Igual	Alta
3	Carcinoma Basocelular	Alta	Alta	Baixa
4	Carcinoma Basocelular	Alta	Alta	Baixa
6	Carcinoma Basocelular	Baixa	Baixa	Alta
7	Carcinoma Basocelular	Alta	Alta	Baixa
15	Carcinoma Basocelular	Baixa	Alta	Alta
10	Próstata	Baixa	Baixa	Alta
11	Próstata	Alta	Alta	Alta
13	Carcinoma de Células Renais	Alta	Baixa	Baixa
8	Carcinoma Basocelular	Baixa	Baixa	Alta
9	Melanoma			
	Melanoma	Baixa	Alta	Alta
	Mama (Carcinoma ductal in situ)			
	Tumor no osso do crânio			

FONTE: Zimmermann, 2023

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração sua importância na regulação da p53, a expressão da proteína MDM4 é fundamental para o bom funcionamento do ciclo celular. Dessa forma, estudar a relação de sua expressão com as chances de se desenvolver um tumor, o tipo de tumor e o prognóstico da expressão, é relevante para a saúde humana, pois abre novas possibilidades de diagnóstico e tratamento mais específicos para cada manifestação de câncer.

Com os resultados aqui discutidos, confirma-se a relação entre alta expressão da isoforma *MDM4-S* com a baixa de *MDM4-FL*. Destacando a proporção elevada de S em relação a FL principalmente em amostras onde os indivíduos apresentaram tumores de mama anteriormente, pois mesmo quando S estava na média, sua expressão ainda era maior do que a de FL. Além disso, a isoforma S está elevada nas amostras que apresentam mais de um tipo de tumor, o que pode ser decorrente de que essa isoforma tem um efeito repressor mais acentuado em p53 do que as outras isoformas de MDM4 e do gene MDM2.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para melhor compreender a evolução da doença em seres humanos, seria interessante observar a correlação entre amostras de tumores e amostras de tecidos saudáveis dos mesmos indivíduos, a fim de propor se a diferença é significativa. Caso a correlação entre isoformas que têm relação com surgimento de tumores seja forte, pode ser utilizado como rastreio para a possibilidade de surgimento de novos sítios primários de câncer.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G.M.; CASTILHO, A.C.; ADAMOSKI, D.; PRADO, K.B. MDM4: What do we know about the association between its polymorphisms and cancer?. **Med Oncol** 40, 61, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01929-z>.
- BARDOT, B.; TOLEDO, F. Mdm4: don't judge an isoform by its mRNA levels!. *AgING*, v. 7(10), p. 744-745. 2015.
- BOTTGER, V.; BOTTGER, A.; GARCIA-ECHEVERRIA, C RAMOS, Y.F.; VAN DER EB, A.J.; JOCHEMSEN, A. G.; LANE, D. P. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. **Oncogene** 18, 189-199, 1999.
- HOU, L.; KEMBER, R.L.; ROACH, J.C.; O'CONNELI, J.R.; CRAIG, D.W; BUCAN, M.; SCOTT, W.K.; PERICAK-VANCE, M.; HAINES, J.L.; CRAWFORD, M.H.; SHULDINER, A.R.; McMAHON, F.J. A population-specific reference panel empowers genetic studies of Anabaptist populations. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1. 2017.
- JAWORSKI, M. A.; SLATER, J. D.; SEVERINI, A.; HENNIG, K.R.; MANSOUR, G.; MEHTA, J.G.; SCHLAUT, J.; PAK, C.Y.; YOON, J.W. Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. **CMAJ**. 1988. 138:1017–1025.
- JIN, S.; LEVINE, A. J. The p53 functional circuit. **Journal of cell Science**, v. 114, n. 23, p. 4139–4140. 2001.
- JONES, S. N.; ROE, A. E.; DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. **Nature** 378, 206-208. 1995.
- LINARES, L. K.; HENGSTERMANN, A.; CIECHANOVER, A.; MULLER, S; SCHEFFNER, M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12009–12014, 2003.
- LOPES, F.L.; HOU, L.; BOLDT, A.B.W.; KASSEM, L.; ALVES, V.M.; NARDI, A.E.; McMAHON, F.J. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. **Hum. Biol.** 2016. 88:109–120. DOI: [10.13110/humanbiology.88.2.0109](https://doi.org/10.13110/humanbiology.88.2.0109).
- MANCINI, F.; CONZA, G.; MORETTI, F. MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Current Genomics*, v. 10, n. 1, p. 42–50. 2009. DOI: <https://doi.org/10.2174/138920209787581280>.
- MARINE, J.c.; DYER, M. A.; JOCHEMSEN, A. G. MDMX: from bench to bedside, **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 3, p. 371–378, 2007.

MAXIMIANO, J.N. **O papel do MIR-1257 no câncer de mama.** 2022. 79f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2022.

MIGLIORINI, D.; DANOVI, D.; COLOMBO, E.; CARBONE, R.; PELICCI, P.G.; MARINE, J.C. Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. **J. Biol. Chem.** 277, 7318-7323. 2002.

MONTES DE OCA LUNA, R.; WAGNER, D. S.; LOZANO, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by absence of p53. **Nature** 378, 203-206. 1995.

OLIVEIRA, L.C.; DORNELLES, A.C.; NISIHARA, R.M.; BRUGINSKI, E.R.D.; SANTOS, P.I.; CIPOLLA, G.A.; BOSCHMANN, S.E.; MESSIAS-REASON, I.J.; CAMPOS, F.R.; PETZL-ERLER, M.L.; BOLDT, A.B.W. The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. **Genes**, v. 14, n. 5, p. 1026–1026. 2023.

PARDO-SECO, J.; LLULL, C.; BERARDI, G.; GÓMEZ, A.; ANDREATTA, F.; MARTINÓN-TORRES, F.; TOSCANINI, U.; SALAS, A. Genomic continuity of Argentinean Mennonites. **Sci. Rep.** 2016. 6:36392. DOI: 10.1038/srep36392.

PICKSLEY, S.M.; LANE, D.P. What the papers say: the p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?. **BioEssays.** 1993. 15:689–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.950151008>.

RALLAPALLI, R.; STRACHAN, G.; TUAN, R.S.; HALL, D.J. Identification of a Domain Within MDMX-S That is Responsible for its High Affinity Interaction With p53 and High-Level Expression in Mammalian Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89(3), p. 563-575, 2003.

SHARP, D. A.; KRATOWICZ, S. A.; SANK, M. J.; GEORGE, D. L. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. **J. Biol. Chem.** 274, 38189-38196, 1999.

SHVARTS, A.; BAZUINE, M.; DEKKER, P.; RAMOS, Y.F.; STEEGENGA, W. T.; MERCKX, G.; VAN HAM, R.C.; VAN DER HOUVEN VAN OORDT, W.; VAN DER EB, A.J.; JOCHEMSEN, A.G. Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. **Genomics** 43, 34-42, 1997.

SHVARTS, A.; STEEGENGA, W. T.; RITECO, N.; VAN LAAR, T.; DEKKER, P.; BAZUINE, M.; VAN HAM, R.C.; VAN DER HOUVEN VAN OORDT, W.; HATEBOER, G.; VAN DER EB, A.J.; JOCHEMSEN, A.G. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. **The EMBO journal**, v. 15, n. 19, p. 5349–57, 1996.

TANIMURA, S.; OHTSUKA, S.; MITSUI, K.; SHIROUZU, K.; YOUSHIKAWA, A.; OHTSUBO, M. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. **FEBS Lett.** 447, 5-9. 1999.

TOLEDO, F.; KRUMMEL, K. A.; LEE, C.J.; LIU, C.W.; RODEWALD, L.W.; TANG, M.; WAHL, G.M. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. **Cancer Cell**. 2006; 9:273– 85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.014>.

TOLEDO, F.; WAHL, G.M. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39(7-8), p. 1476-1482, 2007.

TOSCANINI, U.; BRISIGHELLI, F.; LLULL, C.; BERARDI, G.; GÓMEZ, A.; ANDREATTA, F.; PARDO-SECO, J.; GÓMEZ-CARBALLA, A.; MARTINÓN-TORRES, F.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, V. Charting the Y-chromosome ancestry of present-day Argentinean Mennonites. **J. Hum. Genet.** 2016. 61:507–513. DOI: [10.1038/jhg.2016.3](https://doi.org/10.1038/jhg.2016.3).

WU, J.; LU, G.; WANG, X. MDM4 alternative splicing and implication in MDM4 targeted cancer therapies. *American journal of cancer research*, v. 11, n. 12, p. 5864-5880. 2021.

YU, D. H.; XU, Z.Y.; MO, S.; YUAN, L.; CHENG, X.D.; QIN, J.J. Targeting MDMX for Cancer Therapy: Rationale, Strategies, and Challenges. **Frontiers in Oncology**, v. 10. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01389>.