

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE *TP 53* EM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

**Dissertação de Mestrado**

**Roberto Chiumeo do Nascimento**

**Porto Alegre, 2006**

**ROBERTO CHIUMEO DO NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE *TP 53* EM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Dissertação de Mestrado como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre.  
Programa de Pós-Graduação: Ciências em  
Gastroenterologia.  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul.

Orientadores: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luise Meurer

Porto Alegre, 2006

**N244a** Nascimento, Roberto Chiumeo

Avaliação da mutação do gene TP53 em carcinoma epidermóide de esôfago/Roberto Chiumeo Nascimento; orient Cleber Dario Pinto Kruel; Luise Meurer. – 2006.

85 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Carcinoma de células escamosas 2. Esôfago 3. Genes p53 4. Imunohistoquímica I. Kruel, Cleber Dario Pinto II. Meurer, Luise III. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA



*À Deus que durante todos os passos desta caminhada sempre me acompanhou e iluminou com a sua presença.*

*À minha esposa Roberta, que me dedica o seu amor e companheirismo necessário para cumprir com nossos objetivos e porque juntos vencemos mais um desafio em nossas vidas. Sem ela, este esforço não teria sentido e nem seria alcançado.*

*Aos meus pais Celso e Rosa pelas preocupações que passaram por minha causa, por terem dedicado seu carinho, esforço e estímulo no alcance desta conquista.*

*À minha família (Márcia, Fernanda, Fernando, Gustavo, Eduardo, Maria Eduarda, Regina, Paulo e Fernanda), pois também sempre estão junto comigo.*

*Obrigado também àqueles que mesmo distantes me acompanharam e sonharam viver este dia e que agora, em algum lugar muito bonito estão felizes pela minha trajetória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Cleber Dario Pinto KrueI, pela orientação e amizade demonstrados ao longo de nossa experiência, e pelo incentivo durante a realização do trabalho.

À Professora Doutora Luise Meurer, pela orientação e dedicação ao longo da pesquisa e pelo interesse na melhor execução deste trabalho. Em especial pelo seu trabalho na realização da avaliação imunohistoquímica.

Ao Professor Doutor Luís Felipe Ribeiro Pinto, pelo carinho e amizade ao ter me acolhido no Rio de Janeiro, e por seu conhecimento e entusiasmo demonstrados pela arte em ser um grande pesquisador.

À Professora Doutora Ana Rossini e à doutoranda Tatiana Simão, pelo trabalho por ambas exercido no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, e pela disponibilidade demonstrada.



Ao Professor Doutor Sérgio Barros, pela aposta e colaboração ao longo de minha trajetória no Curso de Mestrado e pela compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, em especial à Moema Goulart pela sua dedicação aos alunos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela imensa estrutura e organização e por estar sempre vinculado à pesquisa científica.

Ao Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos médicos contratados Helenice Pankowski Breyer, Ilton Vicente Stella, Cristina Flores e Cristina Antonini Arruda, pela colaboração demonstrados na realização das endoscopias digestivas.

Ao Serviço de Patologia e Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela contribuição nas análises histopatológicas e imunohistoquímica.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ, pela participação conjunta no decorrer desta pesquisa.

Ao FIPE, pelo apoio e incentivo financeiro proporcionados para a realização desta pesquisa científica.

Aos pacientes, pela sua compreensão e participação nesta pesquisa, mesmo em um momento tão delicado de suas vidas, pois sem eles este trabalho não se realizaria.

À Professora Daniela Benzano da UFRGS pela orientação estatística.

Aos Bolsistas de Iniciação Científica, particularmente ao aluno Antônio Carlos Zucco pela aplicação e empenho ao longo da pesquisa.

Ao amigo e incentivador Professor Doutor Luiz Edmundo Mazzoleni, pelo exemplo e inspiração dentro da Gastroenterologia, desde os tempos da Faculdade de Medicina da PUCRS.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XVI
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 Fatores Etiológicos.....	3
2.2 Alterações Genéticas no Câncer.....	4
2.3 Desenvolvimento das Mutações .....	5
2.4 Gene <i>Tp53</i> .....	7
2.5 Mutações no Gene <i>Tp53</i> .....	8
2.6 Imunohistoquímica.....	11
2.7 Análise Molecular.....	11
2.7.1 Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	12
2.7.2 Seqüenciamento de DNA.....	12
2.7.3 SSCP- <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> .....	13
3 OBJETIVOS .....	14
3.1 Objetivo Geral .....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 População e Delineamento .....	15
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	15
4.3 Procedimento.....	16
4.4 Extração de DNA de Sangue .....	18
4.5 Extração de DNA de Tecido.....	19
4.6 Quantificação do DNA.....	20
4.7 Eletroforese em Gel de Agarose.....	20
4.8 Técnicas para Análise das Mutações no Gene <i>Tp53</i> .....	21
4.8.1 Reações de PCR.....	21
4.8.2 PCR-SSCP.....	22
4.8.3 Reações de Seqüenciamento.....	24
4.9 Imunohistoquímica.....	25
4.10 Tamanho Amostral.....	27
4.11 Análise dos Dados e Estatística.....	28
4.12 Relação Risco-Benefício.....	29
4.13 Considerações Éticas.....	30
5 RESULTADOS.....	31
6 DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÕES .....	50
8 ANEXOS .....	51

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Gráfico de barras com demonstração da idade média e do desvio-padrão.....	31
<b>Figura 2</b> – Gráfico de barras com a distribuição entre os sexos (em percentual)..	32
<b>Figura 3</b> – Gráfico de barras ilustrando a porcentagem de pacientes com disfagia. .....	32
<b>Figura 4</b> - Gráfico de barras com a porcentagem de pacientes com pirose.....	33
<b>Figura 5</b> - Gráfico de barras com a porcentagem de pacientes com regurgitação .....	33
<b>Figura 6</b> - Gráfico de barras ilustra a frequência de emagrecimento na amostra (em percentual).....	34
<b>Figura 7</b> - Gráfico de barras com a porcentagem de fumantes.....	34.
<b>Figura 8</b> - Gráfico de barras com a porcentagem do uso de álcool.....	35
<b>Figura 9</b> - Gráfico de barras com a porcentagem de indivíduos com o hábito de chimarrão.....	35
<b>Figura 10</b> -Gráfico de barras com a localização da neoplasia (em percentual).....	36

<b>Figura 11</b> - Gráfico de barras ilustra a porcentagem de mutações observadas em <i>Tp53</i> .....	36
<b>Figura 12</b> - Gráfico de barras com a porcentagem de mutações nos exons 8.....	37
<b>Figura 13</b> - Gráfico de barras com os tipos de mutações observadas (em percentual).....	37
<b>Figura 14</b> - Gráfico de barras ilustra os resultados da imunohistoquímica (em percentual).....	39
<b>Figura 15</b> - Gráfico de barras demonstra o índice de positividade da imunohistoquímica (em porcentagem).....	39
<b>Figura 16</b> - Gráfico de barras ilustra o tempo médio e o desvio-padrão dos sintomas estudados (expressos em meses).....	40
<b>Figura 17</b> - Gráfico de barras ilustra o tempo médio e o desvio-padrão dos hábitos de tabaco e álcool (expressos em anos).....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Primers utilizados e condições de reação de PCR para amplificação do gene <i>TP53</i> .....	24
<b>Tabela 2</b> - Perfil das mutações encontradas.....	38
<b>Tabela 3</b> – Resultados integrados entre presença de mutação / Imunohistoquímica .....	42
<b>Tabela 4</b> – Comparação entre a incidência de mutações do estudo (RS 1) com diferentes populações.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**IARC** - International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional para Pesquisa do Câncer)

**INCA** - Instituto Nacional de Câncer

**RNA** - Ácido Ribonucléico

**PCR** - Polymerase Chain Reaction ( Reação em Cadeia da Polimerase)

**SSCP** - Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

**UERJ** – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## RESUMO

O câncer de esôfago tem sido apontado como a sexta causa mais freqüente de morte por câncer no mundo. O presente estudo tem o objetivo de verificar a prevalência das mutações presentes nos exons 5 a 8 do gene *TP53* em biópsias esofágicas de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago e avaliar a expressão da proteína p53 por imunohistoquímica. Fizeram parte do estudo 39 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago. O estudo apresentou caráter transversal e prospectivo. Os pacientes responderam a um questionário epidemiológico que teve por finalidade coletar informações sobre tabagismo, uso de álcool e chimarrão e comorbidades associadas. Foram realizadas biópsias endoscópicas de tecido tumoral e tecido normal adjacente à neoplasia. O material coletado foi submetido à técnica de PCR-SSCP com reação seqüenciamento nos exons 5,6,7 e 8 do DNA. Além disso foi feita avaliação imunohistoquímica em 30 pacientes para se avaliar a expressão da proteína p53. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio-padrão. Para a análise das variáveis qualitativas em estudo foi realizada a análise pelo teste exato de Fisher. Em seis pacientes observou-se mutação no gene *Tp53* (16,6%), sendo que quatro delas foram no exon 5. Cinco das seis mutações foram do tipo missense (83,3%). Em dezoito pacientes observou-se imunohistoquímica com expressão aumentada da proteína p53 (60%). Nos seis pacientes que apresentaram mutação no gene *TP 53*, quatro apresentaram imunohistoquímica positiva. A prevalência de mutações no gene *Tp53* nos exons 5 a 8 no presente estudo foi de 16,6 %. Não houve associação estatisticamente significativa entre os fatores de risco estudados

(tabaco, álcool e chimarrão) com as mutações encontradas. A análise imunohistoquímica evidenciou expressão aumentada da proteína p53 na maioria dos casos.

## ABSTRACT

Esophageal cancer has been appointed as the sixth most frequent cause of death by cancer in the world. The aim of the present study is to verify the prevalence of the mutations present in the exons 5 to 8 of the *TP53* gene in esophageal biopsies in patients with esophageal squamous cell carcinoma and to assess the expression of the p53 protein through immunohistochemistry. Thirty-nine patients with esophageal squamous cell carcinoma took part in the study. The study had a transversal and prospective character. The patients answered an epidemiological questionnaire that had the purpose of collecting information on smoking, use of alcohol and “mate” tea and associated comorbidities. Endoscopic biopsies of tumoral tissue and normal tissue were taken adjacent to the neoplasm. The collected material was submitted to the technique of PCR-SSCP with sequencing reaction in the exons 5,6,7 and 8 of DNA. Besides, an immunohistochemical assessment was made in 30 patients to evaluate the expression of the p53 protein. The quantitative variables were described through average and deviation-pattern. For the analysis of the qualitative variables being studied the analysis was accomplished through Fisher’s exact test. Mutation was observed in the *Tp53* gene in six patients (16,6%), and four of them were in the exon 5. Five of the six mutations were of the missense type (83,3%). In eighteen patients, immunohistochemistry was observed with increased expression of the p53 protein (60%). In the six patients that presented mutation in the *TP 53* gene, four presented positive immunohistochemistry. The prevalence of mutations in the *Tp53* gene in exons 5 to 8 in the present study was of 16,6%. There was no significant

statistical association among the risk factors studied (tobacco, alcohol and “mate” tea) with the mutations found. The immunohistochemical analysis evidenced increased expression of the p53 protein in most cases.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago tem sido colocado na nona posição em frequência entre os tipos de neoplasia e a sexta causa mais freqüente de morte por câncer no mundo (KUMANO ET AL, 2005).

Apresenta uma alta taxa de incidência em países como a China, Japão, Cingapura e Porto Rico. No Brasil consta entre os dez tipos de câncer mais incidentes. No ano 2000 foi o sexto em índice de mortalidade, com 5.307 óbitos (INCA, 2006).

O carcinoma epidermóide de esôfago corresponde a 95 % dos tumores de esôfago. A localização preferencial deste tipo de neoplasia é o esôfago médio e distal (CECCONELLO ET AL, 2004).

De acordo com a estimativa de incidência de câncer no Brasil para 2006, devem ocorrer cerca de 10.580 casos novos deste câncer (7.970 entre os homens e 2.610 entre as mulheres (INCA, 2006).

Assim como ocorre em outras partes do mundo, existe uma acentuada variação regional quanto à incidência do câncer de esôfago no Brasil, com as regiões Sul e Sudeste apresentando as maiores taxas de incidência desta neoplasia.No Rio Grande do Sul a taxa estimada para o ano de 2006 é de 21,17 casos novos de câncer de esôfago para cada 100.000 habitantes (INCA, 2006).

A detecção precoce do câncer de esôfago torna-se muito difícil, pois no momento do diagnóstico mais de 50 % dos pacientes apresentam tumores irresssecáveis ou doença metastática, fazendo com que a taxa de sobrevida após cinco anos do diagnóstico seja de somente 10 a 15% (ENZINGER & MAYER, 2003).

Devido à esta significativa morbi-mortalidade, informações sobre a biologia molecular em associação com dados epidemiológicos e clínicos poderão contribuir para a proposição de novos testes diagnósticos, para uma estimativa mais fidedigna do risco de se desenvolver a doença e o tipo de tratamento mais adequado e prognóstico.

O isolamento de novos marcadores que levem a melhores prognósticos, que possibilitem a tipagem molecular dos tumores e que identifiquem novas áreas que apresentem alterações genéticas e epigenéticas se torna primordial para o avanço do conhecimento sobre esta patologia.

Atualmente ainda faltam evidências de que as informações sobre a biologia molecular dos tumores de esôfago possam modificar a prática clínica diária.

Reconhecendo a importância de se estudar a biologia molecular do câncer de esôfago, o presente estudo tem o objetivo de determinar o perfil de mutações do gene *Tp53* no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de esôfago. Além disso, pretende-se identificar as mutações do *Tp53* mais freqüentemente

encontradas no nosso meio, bem como avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína p53.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Fatores Etiológicos**

O desenvolvimento de um tumor sólido é um processo multifatorial, onde ocorre a interação de agentes genéticos e ambientais.

Diferentes fatores etiológicos foram associados ao desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago. Há evidências epidemiológicas consideráveis que apontam o tabaco e o álcool como principais fatores de risco, especialmente quando em associação (CASTELLSAGUÉ ET AL, 1999; KUWANO ET AL, 2005).

O tabagismo é associado ao carcinoma epidermóide e adenocarcinoma, com uma relação direta entre a quantidade de cigarros e o tempo de tabagismo com o desenvolvimento do câncer. O tabaco contém nitrosaminas, que são compostos mutagênicos e carcinogênicos (CASTELLSAGUÉ ET AL, 1999).

Nitrosaminas são pré-carcinógenos, estáveis em pH fisiológico, sendo então incapazes de reagir com macromoléculas celulares. Após seu metabolismo, que visa a transformar estes compostos lipofílicos em compostos mais hidrossolúveis, tornando-os mais passíveis de excreção, ocorre a formação de compostos extremamente instáveis, com uma meia-vida bastante curta e

altamente reativos. Estes compostos reativos não conseguem escapar do local em que são formados e reagem com várias macromoléculas, dentre elas o Ácido Desoxirribonucléico (DNA) (LIJINSKY, 1992).

Existem diferentes posições no DNA capazes de sofrer ataques pelos produtos do metabolismo de nitrosaminas, mas a principal base pré-mutagênica formada é a  $O^6$ -alquilguanina, que, durante a divisão celular leva a incorporação errônea de timidina, ao invés de citosina, gerando assim uma mutação transicional de G-C para A-T (LIJINSKY, 1992).

Outros fatores de risco conhecidos incluem nutrição deficiente em vitaminas e minerais, lesão cáustica esofágica, acalasia, radioterapia mediastinal, síndrome de Plummer–Vinson e tilose (hiperceratose palmoplantar), que é doença autossômica dominante rara (LAM, 2000).

Há indícios de que o chimarrão quando ingerido em temperaturas muito quentes apresenta elevação no risco do desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago (CASTELLSAGUÉ ET AL, 2000; LAM, 2000). Este efeito ocorre em virtude da irritação hipertérmica crônica e inflamação da mucosa esofágica, com formação endógena de radicais livres e agentes carcinogênicos que podem levar ao desenvolvimento de mutações (PUTZ ET AL, 2002).

## **2.2 Alterações Genéticas no Câncer**

Divisão e diferenciação celular são processos fundamentais para o desenvolvimento de um organismo. A divisão celular é responsável pela geração



de células que formam o organismo, enquanto a diferenciação celular resulta na especialização destas células. Estes dois processos, portanto, devem ser cuidadosamente regulados e coordenados para que um crescimento normal possa ocorrer (HUNTER, 1993).

Gene é um segmento de DNA que contém o arquivo completo da seqüência de aminoácidos para fabricar uma cadeia polipeptídica específica, como uma proteína(LOURO,2000).

Uma alteração gênica leva a formação de uma seqüência desordenada de clones celulares com DNA alterado, com maior capacidade de crescimento e produção de uma massa tumoral.

Todos os tipos de câncer são resultado da transformação de uma célula normal em um tumor maligno, um processo que, em geral, leva décadas para ocorrer em seres humanos e está associado a uma série de eventos genéticos que culminam em crescimento e proliferação celular descontrolados. Portanto, o conhecimento de alguns aspectos dos mecanismos envolvidos no crescimento celular e diferenciação, o que se deve principalmente a identificação de moléculas essenciais a coordenação dos eventos do ciclo celular, é de extrema importância para se estabelecer as bases moleculares do desenvolvimento de câncer (LANDBERG & ROOS, 1997; SHERR, 1994; HUNTER, 1993).

## **2.3 Desenvolvimento das mutações**

O aparecimento de um tumor está associado com a ocorrência de alterações genéticas que se acumulam progressivamente no material genético (DNA) de uma célula normal.

Certas mutações ativam genes que regulam positivamente a divisão celular ou inibem a diferenciação, podendo levar a um crescimento celular desordenado; os chamados proto-oncogenes. Outras mutações promovem a desativação de genes que regulam negativamente o crescimento celular ou induzem a diferenciação, podendo levar ao mesmo efeito. São os chamados genes supressores tumorais, considerados recessivos em relação aos anteriores, pois é necessária a desativação do par para que seja perdida a função. Estes fenômenos podem induzir uma perda do controle da proliferação celular (SILVA, 2004).

O desenvolvimento de mutações é significativamente aumentado pela ação de diversos agentes, que são capazes de lesar o DNA com tamanha intensidade que lhe escapam os mecanismos de controle e reparo do DNA. Estes agentes podem ser de natureza física, química ou biológica, e potencialmente podem levar a transformação maligna, induzindo alterações moleculares que envolvam diretamente os proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, lesando genes de reparo do DNA (BEVILACQUA, 1997).

Os tumores resultam de múltiplas alterações genéticas, cujo produto final é responsável pela regulação do crescimento e diferenciação celular. Essas

alterações moleculares são consideradas a base da carcinogênese em múltiplas etapas.

## **2.4 Gene *Tp53***

O gene *Tp53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17, na região 17, p.13.1, codificando uma fosfoproteína nuclear de 53 kD que contém 393 aminoácidos(KLUMB & CAVALCANTI,2002).

A proteína p53 desempenha um papel central na regulação das diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos ao DNA causados por diferentes agentes(KLUMB & CAVALCANTI,2002; ÉTIENNE,2003).

O gene *Tp53* pode levar a uma parada no ciclo celular para reparar o DNA ou induzir apoptose em resposta a depleção de metabólitos, ao choque térmico, à hipóxia, a oncoproteínas virais e a oncogenes celulares ativados. Caso o dano persista, a célula é eliminada da população por apoptose(SILVA, 2004).

Em condições normais p53 é uma proteína com meia-vida bastante curta, porém é estabilizada e acumulada em células que estejam sofrendo danos ao seu DNA ou durante a resposta a certos tipos de estresse. A proteína p53 funciona como um fator de transcrição, e as mutações encontradas em cânceres se concentram no domínio de ligação ao DNA.

A perda de atividade da proteína p53 pode ocorrer de duas maneiras básicas: através de alterações no gene *Tp53*, determinando a ocorrência de proteína alterada ou pela inativação funcional da proteína p53. Estas alterações predispõem as células a amplificação genética induzida por drogas e diminuem a fidelidade de transmissão mitótica de cromossomas (BEVILACQUA, 1997).

O *Tp53* tem como objetivo manter intacto o genoma através do aprisionamento do ciclo celular nos pontos de restrição (checkpoints) G1 / S e G2 / M de células lesadas ou sob efeito inibitório sobre o ciclo celular (SILVA, 2004).

### **2.5 Mutações no Gene *Tp53***

O gene supressor tumoral *Tp53* é o gene mais freqüentemente mutado em cânceres humanos (SHIMADA ET AL., 1997; DONG ET AL, 1997). A prevalência de mutações em *Tp53* na literatura varia entre 10 a 85 % (LAM, 1995). Na maioria das publicações o índice de mutações encontra-se ao redor de 50 %. A freqüência de mutações é maior nas áreas com incidência mais elevada (LAM, 2000).

Embora não seja essencial para o desenvolvimento normal, um de seus papéis é assegurar que, em resposta a um dano genotóxico, as células interrompam o ciclo celular na fase G1, antes da síntese de DNA, numa tentativa de repararem seus DNAs antes que sejam replicados (LEHRBACH ET AL, 2003).

A duplicação do centrossoma normalmente se inicia entre as fases do ciclo celular G1-S (G1 – Síntese do DNA) e na ausência de *Tp53*, múltiplos centrossomas parecem ser gerados num único ciclo celular, resultando em segregação cromossomal aberrante durante a mitose. A instabilidade genética resultante leva a mudanças no número de cromossomas e ploidia, aumentando ainda mais a probabilidade daquelas células atingirem a malignidade por escaparem da resposta imune, por tolerarem hipóxia, por se tornarem angiogênicas, invasivas, metastásicas e, por fim, resistentes à quimioterapia.

As mutações em *Tp53* são em sua maioria do tipo *missense* (troca de nucleotídeo), alterando a função normal da proteína p53. Como resultado destas mutações, a proteína pode ter sua meia-vida aumentada e se acumula nas células tumorais. As mutações estão localizadas, em sua maioria, na região altamente conservada da molécula, que no gene encontram-se na região correspondente aos exons 5 a 8, que correspondem ao domínio de ligação da proteína com o DNA (KUWANO ET AL, 2005).

Em estudos ocidentais e japoneses as mutações em *Tp53* são mais freqüentemente encontradas nos exons 5, 6 e 8. Na China as mutações são mais comuns no exon 5, ao passo que em Taiwan estão mais presentes nos exons 6 e 7. Em um estudo realizado em Hong Kong com 70 pacientes, observou-se incidência elevada de mutação nos exons 7 e 8. Diferenças étnicas nos perfis de mutação no gene *Tp53* podem refletir o impacto de diferentes fatores genéticos e ambientais (WANG,1998).

Em menor frequência as mutações podem ser do tipo *nonsense* em virtude de deleções de porções do gene ou inserção de nucleotídeos. Esta alteração pode levar a ocorrência de uma proteína truncada.

Portanto, mutações no gene *Tp53* podem levar a célula a um aumento da instabilidade do seu genoma, resultando no acúmulo de múltiplas alterações genéticas ou dificultando sua entrada em apoptose, o que tornaria esta célula mais resistente a quimo e radioterapia. Adicionalmente, a análise das mutações do gene *Tp53* pode revelar informações sobre o agente genotóxico responsável pela agressão ao DNA (MONTESANO ET AL., 1996).

Em um estudo com 240 casos de carcinoma epidermóide, 45.8% apresentavam mutações, sendo que destes, 8% estavam no exon 5 (códon 175), 3% no exon 8(códons 248 e 273) e 4% no códon 270 do mesmo exon. Outras mutações estão localizadas nos códons 193, 194 e 195, perfazendo um total de 8% (MONTESANO ET AL., 1996).

Mutações nos codons 270, 193, 194 e 195 são eventos raros nos outros tipos de câncer, sugerindo o envolvimento de compostos genotóxicos específicos para este tecido (MONTESANO ET AL., 1996).

Um grande número de mutações (31%) no gene *Tp53* em carcinoma epidermóide humano são em bases A:T, sugerindo a ação de compostos genotóxicos de origem externa. Comparativamente, em adenocarcinoma as mutações são na sua grande maioria (69%) transições em dinucleotídeos CpG, sendo o câncer que apresenta a maior quantidade destas mutações. Estas

mutações possivelmente surgem espontaneamente, a partir de desaminação hidrolítica da 5-metilcitosina, influenciada ou não por compostos oxidantes, ou da desaminação enzimática e metilação catalisada por metiltransferases, sugerindo assim a perda da homeostase normal do tecido (MONTESANO ET AL., 1996).

A análise de mutações no gene *Tp53* pode, portanto, trazer diversas informações quanto ao dano genotóxico e à seqüência genética dos eventos que levam ao aparecimento de células tumorais, bem como auxiliar no diagnóstico e prognóstico, uma vez que, além da mutação no gene *Tp53* ser um evento precoce na transformação celular, certas mutações presentes neste gene parecem conferir uma agressividade maior ao tumor (LAM, 2000).

## **2.6 Imunohistoquímica**

O estudo de proteínas alteradas foi muito simplificado com o desenvolvimento da imunohistoquímica, técnica que emprega anticorpos policlonais ou monoclonais e se aplica ao estudo de oncogenes (KRISHNADATH,1995).

Anticorpos anti-p53 detectam o acúmulo da proteína, e têm sido relacionados com um comportamento mais agressivo dos tumores, quando hiperexpresso no núcleo celular (SHIMADA, 2002).

Os resultados da análise imunohistoquímica de *Tp53* variam entre níveis de 13 a 50 % (STEMMERMANN ET AL, 1994). As mutações do tipo *missense* são mais prováveis de serem identificadas por imunohistoquímica do que as mutações

não-*missense*. A imunohistoquímica identifica apenas as mutações em *Tp53* do tipo *missense* que aumentam a meia-vida da proteína p53.

Portanto, a imunodeteção para p53 não se correlaciona exatamente com as mutações em *Tp53* por análise molecular e sub-representa o número de tumores contendo anormalidades em *Tp53* (STEMMERMANN ET AL, 1994).

## **2.7 Análise molecular**

### **2.7.1 Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)**

A principal técnica de genética molecular para a detecção de mutações foi o método de PCR (Polymerase Chain Reaction), Reação em Cadeia da DNA Polimerase. O método consiste na amplificação *in vitro* de trechos específicos do genoma de um organismo. Por meio desta técnica, pode-se obter uma grande quantidade de massa de DNA de um gene específico e utilizá-la na busca de mutações por seqüenciamento de DNA (SEUÁNEZ ET AL, 2004).

Para uma reação de PCR a presença dos seguintes reagentes é essencial: os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , uma DNA polimerase e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers* ) (SEUÁNEZ ET AL, 2004).

### **2.7.2 Seqüenciamento de DNA**



A metodologia mais utilizada para seqüenciamento de DNA foi estabelecida durante a década de 1970 por Frederick Sanger e , juntamente com a metodologia de PCR , permitiu a rápida obtenção de seqüências em laboratórios de genética molecular. O método consiste na inibição da síntese de uma molécula de DNA a partir de um DNA molde, não permitindo que a DNA polimerase continue a extensão incorporando novos nucleotídeos (SEUÁNEZ ET AL, 2004).

### **2.7.3 SSCP – *Single Strand Conformation Polymorphism***

Diversos métodos indiretos de detecção de mutações têm sido utilizados para uma busca preliminar por alterações e posterior seqüenciamento de DNA para confirmar a presença de mutações.

A técnica de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism) é a mais utilizada devido à sua simplicidade, pois baseia-se no fato de que após a desnaturação do DNA, em condições que inibem a renaturação, as fitas simples geradas formam estruturas tridimensionais devido à complementaridade entre bases de uma mesma fita. Fitas simples com seqüências diferentes formam estruturas tridimensionais diferentes com mobilidades eletroforéticas diferentes em géis de poliacrilamida (SEUÁNEZ ET AL, 2004).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Verificar a prevalência das mutações presentes nos exons 5 a 8 do gene *TP53* nas biópsias esofágicas dos pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar as mutações encontradas nos exons 5 a 8 do gene *TP53* quanto ao seu tipo e localização, pela técnica de PCR-SSCP com seqüenciamento;

- Relacionar as mutações encontradas com os principais fatores de risco estudados: o tabaco, o álcool e uso de chimarrão;
- Avaliar a expressão da proteína p53 pela técnica de imunohistoquímica.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 População e Delineamento**

Foram incluídos pacientes adultos que procuraram o Hospital de Clínicas de Porto Alegre com história clínica sugestiva de lesão neoplásica esofágica ou com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma epidermóide de esôfago. Esses indivíduos foram submetidos à endoscopia digestiva alta conforme rotina do atendimento médico realizado no HCPA.

O estudo apresentou caráter transversal e prospectivo, não havendo qualquer cegamento. Os pacientes responderam a um questionário epidemiológico (anexo1) que teve por finalidade coletar informações sobre tabagismo, uso de álcool e chimarrão, e comorbidades associadas. O questionário era apresentado ao paciente juntamente com o termo de consentimento informado (anexo 2).

## **4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Fizeram parte do estudo os pacientes que apresentaram diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma epidermóide de esôfago, independente do tratamento que foi realizado e que concordaram com os requisitos da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento informado.

Foram excluídos os pacientes que não tiveram confirmação histológica de carcinoma epidermóide de esôfago, que tiveram sido submetidos a tratamentos anteriores com quimio ou radioterapia devido ao dano genômico resultante após o uso dessas terapêuticas, e que não concordaram com a assinatura do termo de consentimento informado.

## **4.3 Procedimento**

Biópsias dos tumores ou das áreas suspeitas de neoplasia foram realizadas e enviadas para exame anátomo-patológico no HCPA. Além da quantidade habitual de material que é enviada ao Laboratório de Patologia, foram coletados mais quatro fragmentos tumorais e quatro fragmentos de mucosa normal (do mesmo terço da lesão neoplásica). Os oito fragmentos de biópsia por cada paciente foram armazenados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em frascos especiais para conservação desse material biológico (04 fragmentos em reagente TRIZOL e 04 fragmentos em frascos vazios). O reagente TRIZOL é uma mistura de fenol e

guanidina, que tem por finalidade preservar o Ácido Ribonucléico (RNA) mensageiro do material celular.

Uma coleta de 10 ml de sangue em EDTA foi necessária para extração do DNA genômico.

Posteriormente este material foi enviado por via aérea para o Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), armazenado em gelo seco para mantê-lo na temperatura apropriada, onde foi realizada a análise do DNA por PCR-SSCP.

A avaliação da mutação genômica da proteína p53 foi realizada pela equipe do Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) sob o comando do Prof. Luis Felipe Ribeiro Pinto. O material foi submetido à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise de polimorfismo de conformação de fita única (PCR-SSCP) nos exons 5,6,7 e 8 do DNA. O valor de referência foi negativo (ausência de mutações detectáveis) e positivo (presença de mutações), bem como a análise de qual tipo de mutação, por reação de seqüenciamento.

Os achados decorrentes da análise do DNA tumoral desses pacientes foram analisados conjuntamente com as informações obtidas através do questionário epidemiológico.

Este estudo vem dar continuidade a uma colaboração efetiva entre o setor de Cirurgia Esofágica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com a equipe do

Prof. Cleber Dario Pinto Krueel e o Grupo de Toxicologia e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

**Equipes envolvidas:**

- Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular – Departamento de Bioquímica – UERJ

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto, Professor Adjunto

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano, Professor Adjunto

Profa. Dra. Ana Maria Teixeira Rossini, Professora Adjunta

MSc. Tatiana de Almeida Simão, Doutoranda

- Serviço de Cirurgia Geral do HCPA

Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, Professor Orientador

- Serviço de Gastroenterologia do HCPA

Prof. Dr. Sérgio G. S. de Barros, Chefe do Serviço e Professor Colaborador

Dr. Roberto Chiumeo do Nascimento, Mestrando

- Serviço de Patologia do HCPA

Profa. Dra. Luise Meurer, Professora Orientadora

#### **4.4 Extração de DNA de sangue**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA para evitar a coagulação e preservar o DNA. A extração do DNA foi realizada da seguinte maneira: a cada 5  $\mu\text{L}$  de sangue coletado, adicionávamos 17,5  $\mu\text{L}$  de tampão de lise de sangue ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM e EDTA 1 mM, pH 7,4), homogeneizávamos lentamente e deixávamos a 4  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos. A mistura era então centrifugada a 8.000 x g por 15 minutos e o depósito lavado com o mesmo tampão. Após lavagem, o depósito resultante era então ressuspenso em 3  $\mu\text{L}$  de tampão de lise de núcleo (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM e EDTA 2 mM, pH 7,5). Após a adição de proteinase K e SDS (concentrações finais de 0,7 mg/mL e 10 mg/ml, respectivamente) a mistura era incubada a 56  $^\circ\text{C}$  overnight. Posteriormente, adicionávamos NaCl 6 M para a concentração final de 1,5 M e centrifugávamos a 8.000 x g por 15 minutos. Para a precipitação do DNA, acrescentávamos 3 volumes de etanol absoluto ao sobrenadante. Após retirar o DNA precipitado, este era ressuspenso em 300  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). Para a solubilização completa do DNA, incubávamos a 37  $^\circ\text{C}$  por aproximadamente 4 horas. A quantificação da concentração de DNA era feita espectrofotometricamente pela absorção de luz a 260/280 nm e o DNA era então guardado a 4  $^\circ\text{C}$ .

#### **4.5 Extração de DNA de tecido**

Para cada 0,1 g de tecido adicionávamos 1,2 mL de solução de digestão (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%, pH 8,0) e picotávamos o tecido o máximo possível. Após acrescentarmos proteinase K para uma concentração final de 0,2 mg/ml, incubávamos a 56 °C overnight. A mistura era então centrifugada a 8.000 x g por 10 minutos para a retirada dos pedaços não digeridos e ao sobrenadante era adicionado NaCl para a concentração final de 1,5 M, e procedíamos a centrifugação da suspensão a 8.000 x g por 5 minutos. Acrescentávamos três volumes de etanol absoluto ao sobrenadante e a partir desta etapa todo o procedimento era idêntico ao descrito para a solubilização e quantificação das amostras de DNA de sangue, com exceção do tratamento com Rnase 0,1 mg/ml por 30 minutos após a completa solubilização do DNA em TE (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

#### **4.6 Quantificação do DNA**

Uma alíquota do material extraído foi diluída 100 vezes e quantificada através de leitura em espectrofotômetro (SHIMADSU Mod. UV-160<sup>A</sup>) usando comprimento de onda igual a 260 nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280 nm, que detecta preferencialmente proteínas. Quando a relação das densidades óticas, 260/280, foi igual ou maior que 1,7 o material foi considerado puro. Para a obtenção da concentração de DNA foi considerada a relação de que uma unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde a 50 µg/mL de DNA. A



integridade do DNA era observada posteriormente em gel de agarose 1,0% (GIBCO BRL, Brasil) (SAMBROOK , 1989).

#### **4.7 Eletroforese em gel de agarose**

A eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) foi realizada com a finalidade de verificar a qualidade do DNA genômico extraído. A eletroforese em agarose 2% (p/v) foi utilizada verificar a amplificação do gene *TP53*.

Aproximadamente 500 ng de DNA genômico foram utilizados para verificar a qualidade do DNA extraído. Em todos os casos as amostras foram misturadas com 1/10 do volume de tampão de carregamento (50% (v/v) de glicerol, 0,25% (p/v) de azul de bromo fenol e 0,25%(p/v) de xileno cianol). Após aplicação em gel de agarose nas concentrações 1, 2 ou 2,5% (p/v), dissolvida em TAE 1X (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA – pH 8,5), as amostras foram separadas por eletroforese a 6 V/cm em cuba horizontal (GIBCO BRL-HORIZON-58, USA).

O DNA foi visualizado após coloração realizada por imersão em solução de brometo de etídeo (5 µg/mL - MERK, USA), e o resultado visualizado em transluminador de luz UV (mod. TM-20, UVP, USA). Os resultados foram fotografados por sistema de fotodocumentação (sistema Kodak Digital Science ID, KODAK, USA) e arquivados.

#### **4.8 Técnicas para análise das mutações no gene *TP53***

#### **4.8.1- Reações de PCR**

As reações de PCR para a amplificação dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* foram realizadas segundo Ahomadegbe e colaboradores (AHOMADEGBE ET AL , 1995), com modificações. Em um volume final de 25 ml, utilizávamos cerca de 50 ng de DNA de tecido normal ou de tumor de esôfago e 8 pmol de cada um dos primers descritos na Tabela 12. A concentração final de dNTPs era de 0,04 mM. As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão para as reações de PCR de cada um dos exons estão demonstradas na Tabela 1. Quando necessário, procedíamos a reamplificação do fragmento, utilizando 5 ml do produto da primeira reação de PCR em 50 ml de volume final de reação com os demais reagentes nas mesmas concentrações finais da primeira PCR.

Os produtos das reações de PCR dos exons 5, 6, 7 e 8 eram visualizados em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos dos exons 5, 6, 7 e 8 amplificados nas condições acima apresentavam 303 pb, 233 pb, 202 pb e 255 pb, respectivamente.

#### **4.8.2- PCR-SSCP**

A análise de mutações por SSCP (single-strand conformational polymorphism) é um dos métodos mais rápidos de detecção de polimorfismos, deleções e/ou substituições de nucleotídeos em moldes de DNA ou cDNA (Orita *et al.*, 1989). Neste método os produtos de amplificação de PCR de alelos selvagens e mutantes são desnaturados e separados devido às diferenças na mobilidade

eletroforética de suas fitas simples durante a eletroforese em gel em condições não desnaturantes (PERUCHO ET AL, 1994). Para o estudo de mutações no gene *Tp53* em tumores humanos serão utilizados primers que amplificam os exons 5 a 8, correspondendo ao respectivo domínio de ligação da proteína com o DNA.

As técnicas originais de SSCP envolviam marcação radioativa dos produtos de PCR. No entanto, outros métodos não radioativos vêm sendo desenvolvidos (LAW ET AL., 1996; BINDER ET AL., 1995), o que aumenta a aplicabilidade desta metodologia na detecção de mutação de rotina. A técnica de coloração com prata tem sido empregada com sucesso, seguindo protocolo de SANGUINETTI ET AL. (1994) com algumas modificações, eliminando o uso de radioatividade.

Para o screening de possíveis mutações no gene *TP53*, realizávamos a técnica de PCR-SSCP, na qual os produtos da reação de PCR eram tratados com uma solução de formamida (formamida 95%, EDTA 100 mM, e corante contendo azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 50%) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A proporção produto de PCR: solução de formamida era de 1:2 e antes da aplicação da amostra no gel, a mistura era incubada por 5 minutos a 95 °C para a desnaturação da dupla fita do fragmento de DNA. Dessa maneira, podíamos visualizar, após a coloração pela prata, o padrão migratório de cada uma das amostras e comparar com uma amostra padrão, que comprovadamente, através de seqüenciamento prévio, não apresenta mutação no exon em análise. Qualquer alteração no padrão de migração poderia ser indicativa

de mutação no gene e, após confirmação do resultado pela repetição da técnica, procedíamos ao seqüenciamento do éxon em questão.

**TABELA 1: Primers utilizados e condições de reação de PCR para amplificação do gene *TP53*.**

Exon	Primer	Seqüência	desnaturação	anelamento	extensão	No de ciclos	Extensão final	Referência
5	5 senso	5'TGTTTGTTTCTTTGCTGCCGTGT3'	94 °C	61 °C	72 °C	35	72 °C	Ahomadegbe <i>et al</i> , 1995
	5 anti-senso	5'CCCTGTCGTCTCTCCAGCCC3'	30 seg	60 seg	60 seg		10 min	
6	6 senso	5'GGGGCTGGAGAGACGACAGG3'	94 °C	61 °C	72 °C	35	72 °C	Ahomadegbe <i>et al</i> , 1995
	6 anti-senso	5'AACCACCCTTAACCCCTCCT3'	30 seg	60 seg	60 seg		10 min	
7	7 senso	5'CTCATCTTGGGCCTGTGTT3'	94 °C	61 °C	72 °C	35	72 °C	Ahomadegbe <i>et al</i> , 1995
	7 anti-senso	5'GGGTCAGCGGCAAGCAGAG3'	30 seg	60 seg	60 seg		10 min	
8	8 senso	5'CTGCCTCTTGCTTCTCTTTT3'	94 °C	58 °C	72 °C	35	72 °C	Ahomadegbe <i>et al</i> , 1995
	8 anti-senso	5'GAGGCAAGGAAAGGTGATAA3'	30 seg	60 seg	60 seg		10 min	

#### 4.8.3- Reações de seqüenciamento

Os produtos das reações de PCR dos éxons de interesse foram purificados e posteriormente submetidos a reação de seqüenciamento. A purificação do DNA foi feita utilizando-se polietilenoglicol (PEG<sub>8000</sub>) na presença de NaCl (LIS, 1980). Acrescentávamos NaCl 5 M na proporção de 1 µL de NaCl para cada 4 µL de produto de PCR, de tal forma que a concentração final do sal fosse de 1 M. Após misturarmos por inversão, acrescentávamos PEG<sub>8000</sub> para uma concentração final de 11% e misturávamos em vórtex. Nas concentrações utilizadas, o PEG<sub>8000</sub> é capaz de precipitar seqüências de oligonucleotídeos maiores do que 180 pb, permitindo que restos de primers que porventura formassem dímeros fossem retirados da mistura que continha o fragmento a ser seqüenciado. A mistura era então deixada a 4°C overnight. Posteriormente, centrifugávamos por 5 a 10 minutos, descartávamos o sobrenadante e o precipitado era lavado com 250 µL de etanol a 70%. Após descartar o sobrenadante, o precipitado era ressuspenso em água e guardado em freezer a – 20 °C.

As reações de seqüenciamento foram feitas seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante do seqüenciador automático MegaBace. Estas reações foram realizadas utilizando-se o kit “*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Megabace*”, com 2 µL do DNA purificado com PEG<sub>8000</sub> e o primer senso ou anti-senso do éxon a ser seqüenciado. Foram feitas pelo menos oito reações de seqüenciamento para cada amostra de DNA (senso ou anti-senso).

#### **4.9 Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína p53 foi realizada no Laboratório de Patologia e no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As seguintes etapas se sucediam na elaboração das lâminas:

##### **ETAPA 1: Peróxido de Hidrogênio**

Após a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica do tecido, era removido o excesso de tampão ou água e enxaguado cuidadosamente ao redor do corte. Aplicava-se Peróxido de Hidrogênio a 3% em quantidade suficiente para cobrir a amostra. Incubava-se por 5 minutos. Enxaguava-se suavemente com água destilada ou solução de lavagem e colocado em um banho de tampão fresco.

##### **ETAPA 2: Anticorpo Primário e Reagente Controle Negativo**

O excesso de tampão era removido e as lâminas enxaguadas. Aplicava-se o anticorpo primário preparado ou o reagente controle negativo o suficiente para cobrir a amostra. Era incubado por 30 minutos e enxaguado suavemente com solução de lavagem e colocado em um banho de tampão.

##### **ETAPA 3: Anticorpo de Ligação**

Removia –se o excesso do tampão e enxugava-se a lâmina. Eram aplicadas gotas amarelas do anticorpo de ligação o suficiente para cobrir a amostra. Incubava-se por 30 minutos e enxaguá-va-se a lâmina .

**ETAPA 4: Estreptavidina Peroxidase**

Aplicava-se gotas vermelhas de estreptavidina o suficiente para cobrir a amostra. Incubava-se por 30 minutos e enxaguáva-se a lâmina.

**ETAPA 5: Solução Substrato-Cromógeno = DAB**

Aplicava-se o suficiente de solução preparada de substrato-cromógeno para cobrir a amostra. Incubava-se de acordo com as recomendações fornecidas com o substrato-cromógeno e enxaguáva-se suavemente com água destilada.

**ETAPA 6: Contra-Coloração**

As amostras eram cobertas com hematoxilina e incubadas por 2 a 5 minutos, dependendo da concentração da hematoxilina usada. Enxaguáva-se suavemente com água destilada e mergulhada brevemente 10 vezes em um banho de lavagem contendo água amoniacal. Colocava-se em água destilada ou deionizada por 2 minutos.

**ETAPA 7: Montagem das lâminas**

As amostras eram montadas e cobertas com lamínula utilizando meio de montagem aquoso, como o bálsamo Entellan.

O Kit empregado para imunohistoquímica é o Kit LSAB + Peroxidase DakoCytomation volume grande, Universal – 110 ml , código K 0690.

A análise da imunohistoquímica foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Luíse Meurer, tendo como possibilidades a expressão negativa ou positiva da proteína p53 .

Quando positiva era graduada em fraca, moderada ou forte e expressa em porcentagem.

#### **4.10 Tamanho Amostral**

Na literatura, foram descritas em torno de 700 diferentes mutações no gene *Tp53* para o carcinoma epidermóide de esôfago. Há evidências na literatura de que a prevalência de mutações em *Tp53* varia entre 10 a 85 % (Lam, 1995). Na maioria das publicações o índice de mutações encontra-se ao redor de 50 %, sendo que a freqüência é maior nas áreas com maior incidência (Lam, 2000).

Como as prevalências de mutação do gene *Tp53* em carcinoma epidermóide de esôfago apresentam índices diferentes, especialmente em razão da localização geográfica, calculou-se uma amostra maximizando a variância (assumindo proporção de 0,5 que maximiza a amostra), com um intervalo de confiança de 95% e um erro máximo de 15 %, obtendo-se um número de 43 pacientes.

#### **4.11 Análise dos dados e Estatística**

Os dados categóricos (qualitativos) foram descritos através de freqüência absoluta e porcentagem. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio-padrão quando apresentaram curva de distribuição normal (simétricas) ou por meio de mediana e amplitude interquartil quando foram assimétricas.



Para a análise das variáveis qualitativas em estudo foi realizada a análise pelo teste exato de Fisher.

As análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (Statistic Packway for Social Sciences) versão 11.0, para Windows. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### **4.12 Relação Risco-Benefício**

A opção do paciente em participar do estudo não modificou o tipo de tratamento que é feito rotineiramente nos pacientes com câncer de esôfago no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os participantes não obtiveram, num primeiro momento, nenhum benefício direto pela colaboração com o trabalho. Ainda não existem dados suficientes em biologia molecular de câncer de esôfago que possam indicar prognóstico ou influenciar no tipo de tratamento. As informações referentes ao tipo e número de mutações poderão, no futuro, ser utilizadas para auxiliar no tratamento de outras neoplasias que o indivíduo venha a desenvolver. Essas informações ficarão disponíveis para pacientes ou para os familiares em caso de morte do doente.

Os riscos desse tipo de estudo são referentes a preservação e aos cuidados com as informações obtidas. Os dados não poderão ser revelados a terceiros ou a outras instituições. As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados e só serão utilizadas para fins científicos, sem a identificação do

indivíduo. O paciente também tem o direito de não querer saber dos seus resultados, caso julgue inconveniente essa informação.

Além disso, existia o risco do maior tempo de exame endoscópico pela necessidade de se obter maior número de fragmentos tumorais. Essas exigências na coleta do material podem gerar maior desconforto e maior risco ao exame (ex: sangramento).

#### **4.13 Considerações Éticas**

Os dados dos pacientes são de uso exclusivo dos participantes do programa, sendo exigido destes total discrição quanto a informações específicas de cada caso, de acordo com as normas que permeiam o exercício da medicina e das outras profissões na área da saúde. A integração dos dados foi feita pela equipe do Hospital de Clínicas que conduziu o estudo. Os dados referentes à biologia molecular dos tumores estão armazenados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia da UERJ.

Os pacientes desta pesquisa foram informados da voluntariedade de sua participação, bem como dos objetivos propostos e a justificativa da pesquisa, recebendo informações sobre cada procedimento em que foram envolvidos, através do termo de consentimento informado.

Foram assegurados o anonimato e confidencialidade das informações obtidas durante e após o término da pesquisa, e o direito de liberdade de opção de

retirar-se da pesquisa, se assim o desejasse, sem que isto implicasse em nenhum dano ou prejuízo ao pesquisado.

O presente estudo foi aprovado pelo GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no dia 12 de abril de 2004, com o número 02-223.

## 5 RESULTADOS

Foram estudados 40 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, sendo um excluído por não apresentar confirmação histológica.

Em 3 dos 39 pacientes não se conseguiu amplificar o DNA das amostras para avaliação por PCR-SSCP da mutação no gene *TP 53*. Desta forma, 36 pacientes foram estudados por PCR-SSCP e seqüenciamento.

Em 30 dos 39 pacientes foi realizada avaliação imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína p53.

As variáveis descritivas a seguir serão analisadas utilizando a média e o desvio-padrão, e apresentadas sob forma de gráfico.

Verifica-se na figura 1 que na população estudada a idade variou de 36 a 88 anos (média = 59,5; desvio padrão = 10,6).

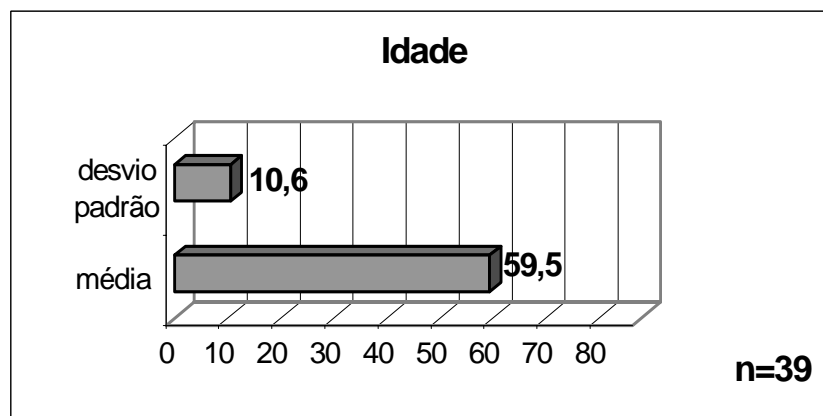


FIGURA 1: Gráfico de barras demonstra a idade média e o desvio-padrão

Quanto ao sexo, observa-se maior número de homens (74,4%) em comparação às mulheres (25,6%), como demonstrado na figura 2.

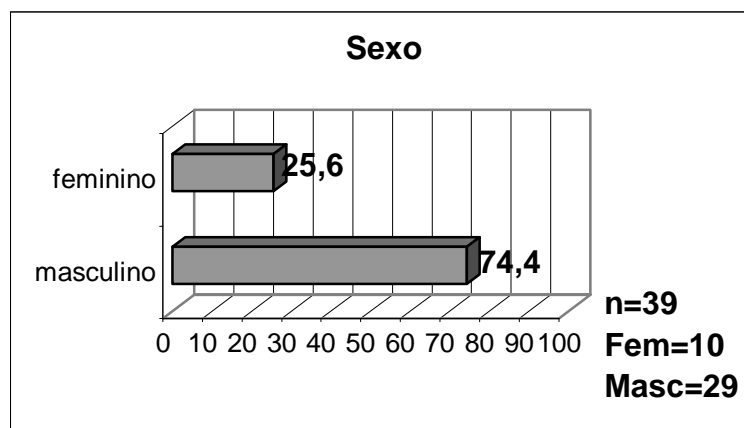


FIGURA 2: Gráfico de barras com a distribuição entre os sexos (em percentual)

Em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes, conforme o estudo percebe-se que a maior parte dos pacientes apresentaram disfagia (94,9%), como expressa a figura 3.

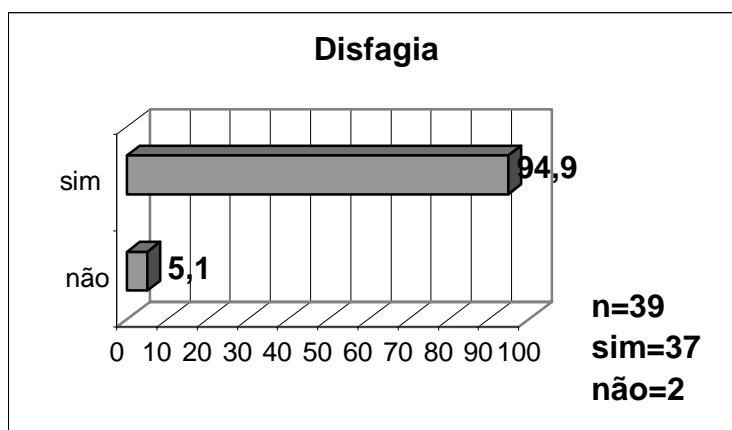


FIGURA 3: Gráfico de barras ilustrando a porcentagem de pacientes com disfagia

Observa-se na figura 4 que 53,8% dos pacientes não apresentaram pirose.

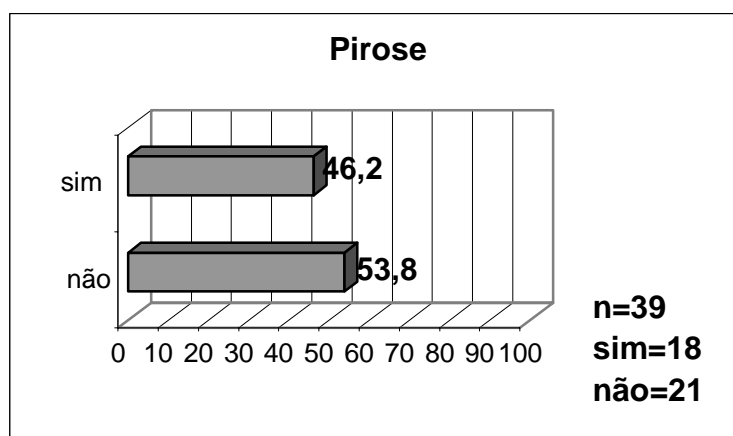
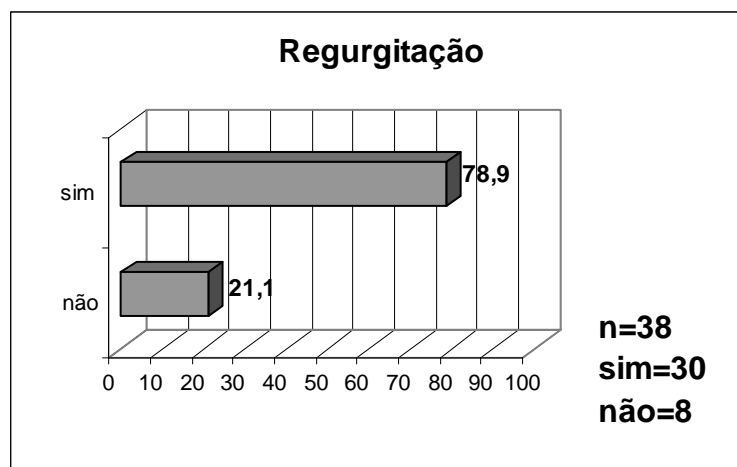


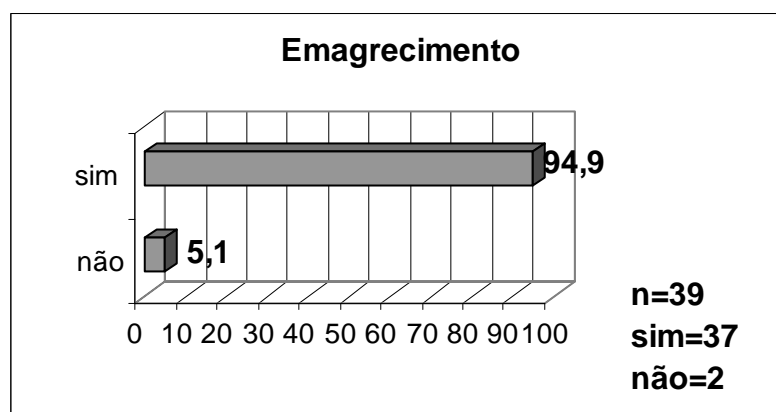
FIGURA 4: Gráfico de barras com a porcentagem de pacientes com pirose

Quanto ao sintoma de regurgitação, 78,9% dos participantes apresentaram esta queixa clínica, como mostra a figura 5.



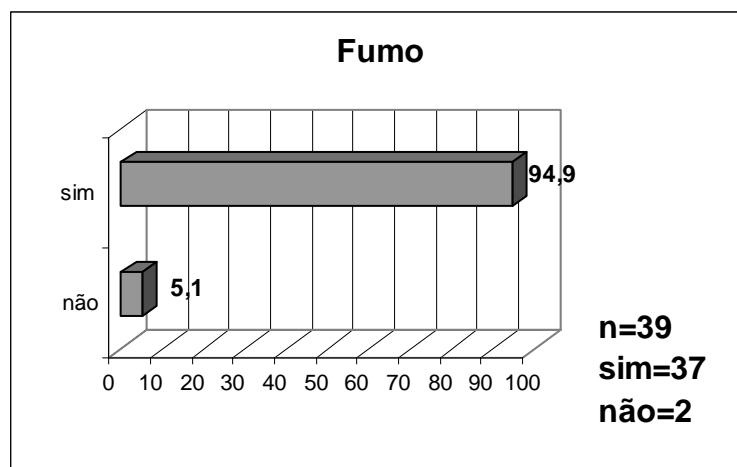
**FIGURA 5:** Gráfico de barras mostra a porcentagem de pacientes com regurgitação

Na amostra estudada, constatou-se que a maioria dos pacientes perdeu peso (94,9%), como ilustra a figura 6.



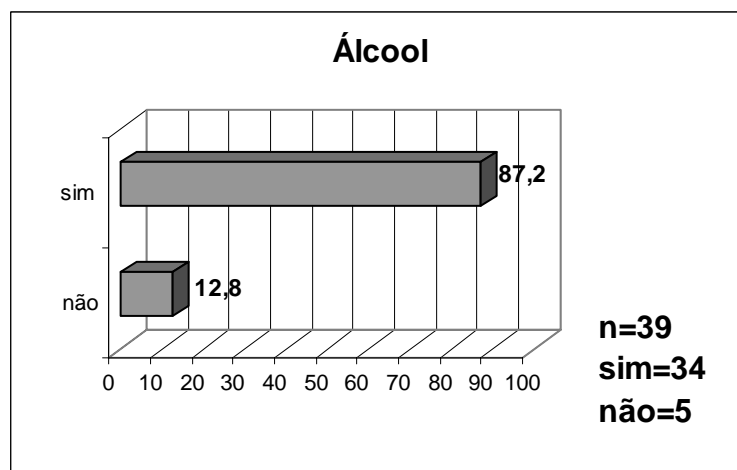
**FIGURA 6:**Gráfico de barras ilustra o índice de emagrecimento na amostra (em percentual)

Quanto aos fatores de risco estudados, verificou-se que 94,9% dos pacientes eram fumantes, como mostra a figura 7.



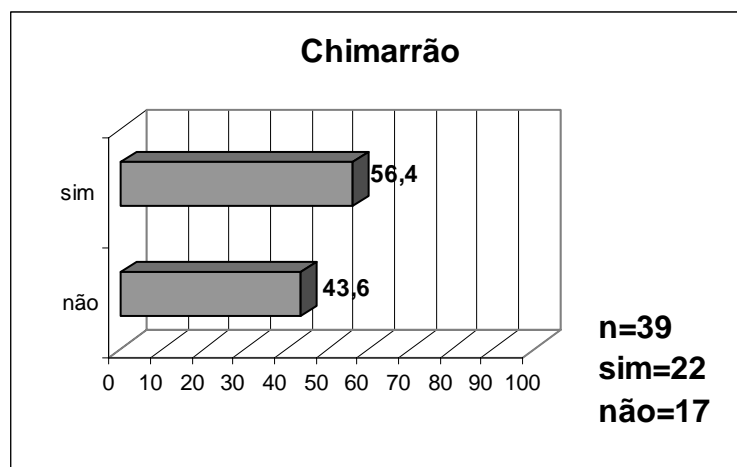
**FIGURA7: Gráfico de barras com a porcentagem de fumantes**

Sobre o uso de bebidas alcólicas, observa-se conforme a figura 8 que 87,2% dos pacientes eram usuários de álcool.



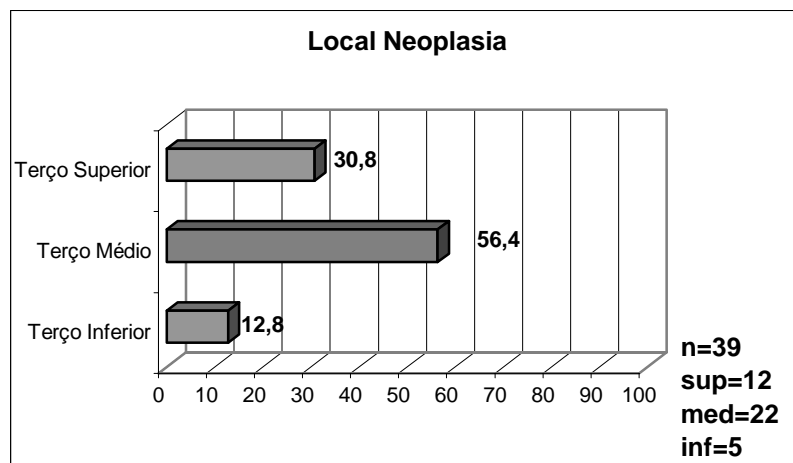
**FIGURA 8: Gráfico de barras com a porcentagem do uso de álcool**

Verificou-se que 56,4% dos pacientes tinham o hábito de ingerir chimarrão, como demonstra a figura 9.



**FIGURA 9:** Gráfico de barras ilustra a porcentagem de indivíduos com o hábito de chimarrão

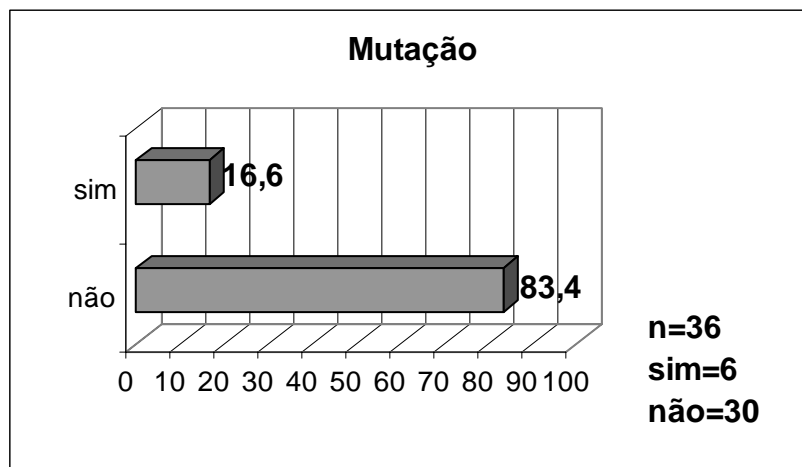
No estudo foi avaliada a localização da neoplasia, tendo-se observado que 56,4% dos pacientes apresentaram tumor no terço médio do esôfago. Outros 30,8% em terço superior e 12,8%, no terço inferior. A figura 10 ilustra estes resultados.



**FIGURA 10:** Gráfico de barras demonstra a distribuição conforme a localização da neoplasia (em percentual)

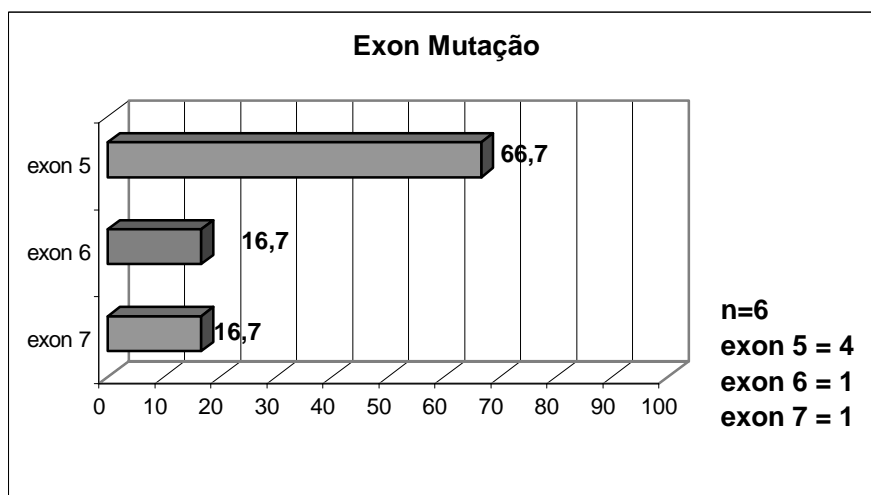


Quanto ao índice de mutações, dos 36 pacientes em que foram avaliados para esta finalidade, observaram-se seis mutações (16,6%) em *Tp53* avaliada por PCR-SSCP. A figura 11 demonstra os resultados.



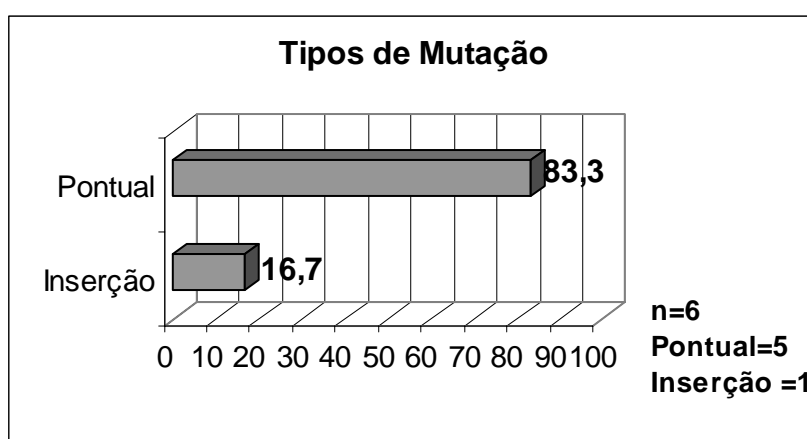
**FIGURA 11:** Gráfico de barras ilustra a porcentagem de mutações observadas em *Tp53*

Dos seis casos de mutação, constatou-se que quatro pacientes apresentavam-na no exon 5 (66,7%) , um no exon 6 (16,7%) e um no exon 7 (16,7%). Não foram encontradas mutações no exon 8 nesta amostra. A figura 12 explica sob forma de gráfico estes resultados.



**FIGURA 12: Gráfico de barras demonstra a porcentagem de mutações dentre os exons 5 a 8**

A mutação do tipo pontual foi encontrada em cinco pacientes (83,3%), tendo um paciente apresentado uma mutação do tipo inserção (16,7%), avaliadas por PCR-SSCP com seqüenciamento. A figura 13 ilustra estes resultados.



**FIGURA 13: Gráfico de barras demonstra os tipos de mutações observadas (em percentual)**

A tabela 2 descreve as características das mutações encontradas, com os tipos de mutação, localização de exon e codon e conseqüência fenotípica.

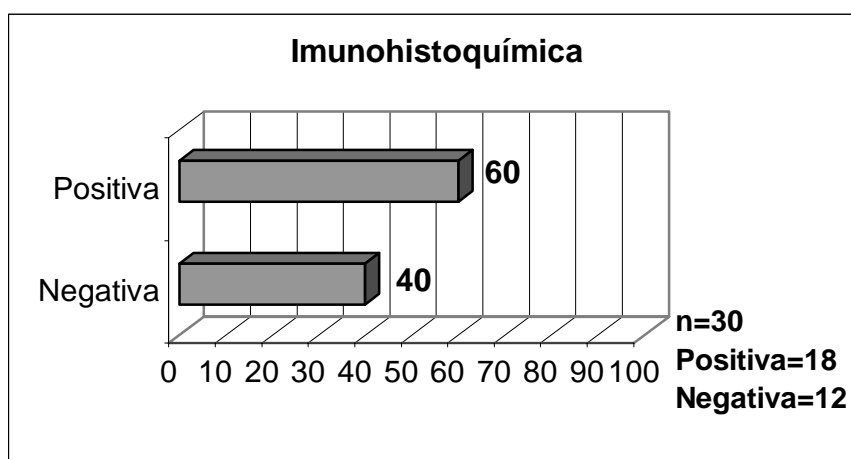
**TABELA 2: Perfil das mutações encontradas**

MUTAÇÃO	TIPO DE MUTAÇÃO	DESCRIÇÃO	AMINOÁCIDO SELVAGEM	AMINOÁCIDO MUTANTE	EFEITO DA MUTAÇÃO

ATC>TGC Codon 254 Exon 7 (tecido normal)	complexa	ATC para TGC	ile	cys	Missense
GGC>AGC Codon 154 Exon 5 (tecido tumoral)	G:C>A:T	G para A	gly	ser	Missense
CAT>CTT Codon 179 Exon 5 (tecido tumoral)	A:T>T:A	A para T	his	leu	Missense
CGA>CGG Codon 213 Exon 6 (tecido normal)	A:T >G:C	A para G	arg	arg	Silenciosa
GTC>TTC Codon 157	G:C >T:A, sítio CpG	G para T	val	phe	Missense

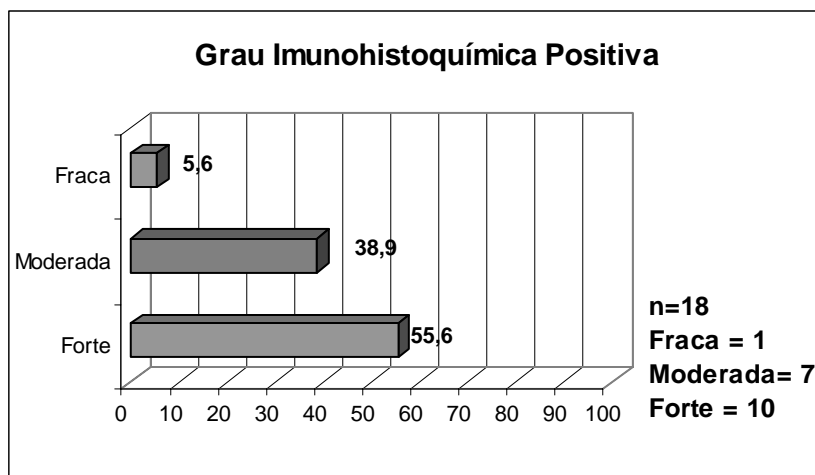
Exon 5 (tecido normal)					
Inserção+1 Codon 169 Exon 5 (tecido tumoral)	Inserção	+1	met	-----	Frameshift

Em relação a análise imunohistoquímica para a expressão da proteína p53, constatou-se que 60% dos pacientes apresentaram imunohistoquímica positiva. A figura 14 ilustra estes achados.



**FIGURA 14:** Gráfico de barras ilustra os resultados da imunohistoquímica (em percentual)

Também foi avaliada a intensidade da positividade da imunohistoquímica, tendo-se encontrado 55,6 % com graduação forte. Graduação moderada foi visto em 38,9 % enquanto que a intensidade fraca em 5,6%. A figura 15 apresenta estes achados.

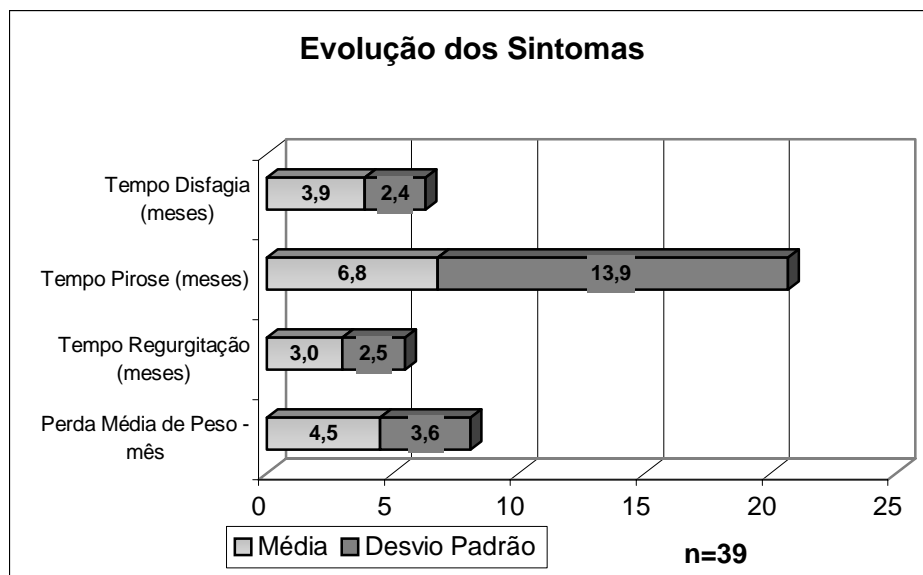


**FIGURA 15:** Gráfico de barras demonstra o índice de positividade da imunohistoquímica (em porcentagem)

Em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes em decorrência do carcinoma epidermóide de esôfago, procurou-se avaliar o tempo médio e o desvio-padrão da evolução dos sintomas estudados. Os resultados estão expressos em meses, na figura 16. Percebeu-se que o tempo de disfagia no momento do diagnóstico apresenta uma média de 3,9 meses com desvio-padrão de 2,4 meses.

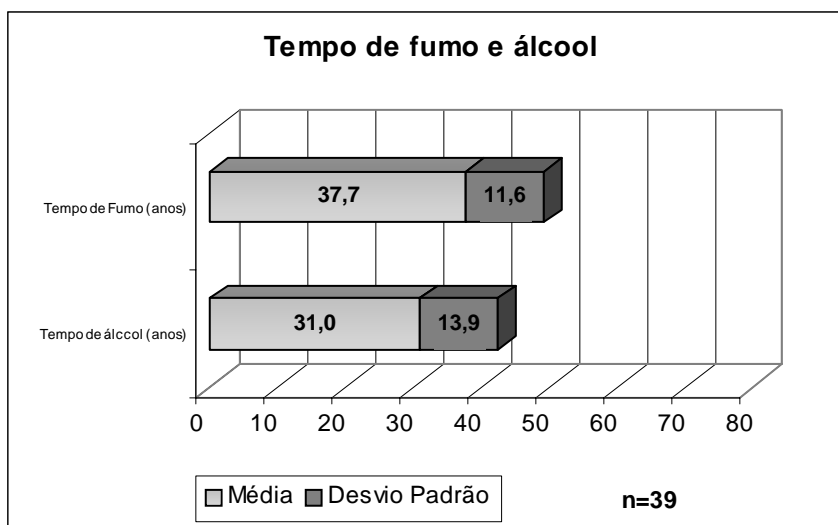
Quanto à queixa de pirose constatou-se que os pacientes que apresentavam este sintoma o tinham em média há 6,8 meses no momento do diagnóstico, com um desvio-padrão 13,9 meses. O tempo médio de regurgitação foi de 3,0 meses com um desvio-padrão de 2,5 meses. Para finalizar a explanação

da figura 16, nota-se que a perda média de peso ao mês foi de 4,5 quilos com desvio-padrão de 3,6 quilos.



**FIGURA 16:** Gráfico de barras ilustra o tempo médio e o desvio-padrão dos sintomas estudados (expressos em meses)

O tempo médio de tabagismo e uso de álcool também foram estudados, observando-se que o tempo médio de tabagismo foi 37,7 anos com desvio-padrão de 11,6 anos. Quanto ao hábito do álcool, a média foi de 31,0 anos e o desvio-padrão de 13,9 anos. A figura 17 mostra os resultados.



**FIGURA 17:** Gráfico de barras ilustra o tempo médio e o desvio-padrão dos hábitos de tabaco e álcool (expressos em anos)

Foi realizada análise estatística com teste exato de Fisher, com o intuito de avaliar associação entre os fatores de risco estudados (tabaco, álcool e chimarrão) com as mutações encontradas. A análise não demonstrou associação na amostra, com um valor p de 0,217.

Nos seis pacientes que apresentaram mutação no gene *TP 53*, quatro apresentaram imunohistoquímica com expressão aumentada da proteína p53.

A tabela 3 demonstra os resultados integrados entre a avaliação da mutação em *TP53* por PCR-SSCP com seqüenciamento e a imunohistoquímica;

**TABELA 3: Resultados integrados entre presença de mutação / Imunohistoquímica**

<u>MUTAÇÃO</u>	<u>IMUNOHISTOQUÍMICA</u>		<u>TOTAL</u>
SIM	<b>Positiva</b>	<b>Negativa</b>	<b>6</b>
	<b>4</b>	<b>2</b>	
	<b>66,7%</b>	<b>33,3%</b>	
NÃO	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>24</b>
	<b>58,3%</b>	<b>41,7%</b>	<b>100%</b>
	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>30</b>
TOTAL	<b>60%</b>	<b>40%</b>	<b>100%</b>

## 6 DISCUSSÃO



No presente estudo observou-se uma prevalência de 16,6 % de mutações no gene *tP53*, sendo consideravelmente menor em comparação à maioria dos demais trabalhos publicados referentes a este assunto.

Bennett (1997) estudou 29 pacientes chineses com carcinoma epidermóide de esôfago. Foi observado um índice de 69 % de mutações no gene *tP53*, tanto em fumantes como em não fumantes, pela técnica de PCR e seqüenciamento.

Castellsagué (2000) publicou um estudo com pacientes provenientes de países da América do Sul (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) com elevado consumo de chimarrão. O objetivo era avaliar se o consumo de chimarrão e de bebidas quentes como o café e o chá, exerciam influência no desenvolvimento do câncer de esôfago. Foram estudados 830 pacientes com câncer e 1779 controles. Após o ajuste para os efeitos do tabaco e álcool, os autores observaram que os bebedores excessivos de chimarrão e a altas temperaturas apresentavam um risco maior em desenvolver câncer de esôfago. Além disso observaram que o consumo de outros líquidos quentes como chá e café com leite, mas não café isoladamente, apresentavam de duas a quatro vezes maior risco para desenvolverem câncer de esôfago. A conclusão é de que o consumo excessivo de líquidos quentes a altas temperaturas favorece o desenvolvimento de lesões irritativas à mucosa esofágica, podendo ser precursoras de neoplasia.

Um estudo publicado em 2001 conduzido por Biramijamal avaliou 74 pacientes provenientes do Irã com carcinoma epidermóide de esôfago. Este país comporta uma das taxas mais elevadas de mortalidade por câncer de esôfago e a prevalência elevada parece não estar apenas relacionado ao tabaco e álcool.

Verificou-se um índice de mutações no gene *tP53* de 65 % por PCR e seqüenciamento. A análise imunohistoquímica constatou níveis elevados de COX-2 e óxido nítrico sintetase (74 e 91 % respectivamente). Os autores concluem que mediadores da resposta inflamatória em provável associação com fatores dietéticos ou culturais praticados no Irã podem contribuir para o perfil de mutações encontrados nesta população de pacientes.

Putz (2002) publicou um estudo com 135 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, provenientes do Rio Grande do Sul. O objetivo principal do estudo era o de avaliar a influência do estilo de vida dos pacientes (particularmente o consumo de tabaco, álcool e chimarrão) com o padrão de mutações encontradas no gene *tP53*. Foi utilizada avaliação imunohistoquímica, PCR-SSCP com seqüenciamento do gene *tP53* para os exons 5 a 9. Os autores constataram 47 mutações (34,8%) , tendo sido 18 (36,7%) no exon 5, 5 (10,2%) no exon 6, 8 (16,3%) no exon 7 e 16 (32,7%) no exon 8. Observou-se um padrão de mutações diferente nestes pacientes quando comparado a outras regiões mundiais, como uma maior prevalência de mutações no exon 8. Os autores concluem que o tabaco e o álcool , acrescidos aos efeitos provocados pelo chimarrão podem ser responsáveis por este diferente padrão mutacional nesta amostra.

Vos (2003) publicou um estudo sul-africano com 74 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, com PCR-SSCP e análise de DNA em 37 destes 74 pacientes. Foram utilizados 118 controles do mesmo grupo étnico da África do Sul. Os autores observaram um baixo índice de mutações em exons 5 a

8, tendo sido mais freqüente polimorfismos. Duas mutações no exon 9 foram evidenciadas.

Um estudo chinês publicado em 2004 liderado por Cao estudou 92 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago provenientes de duas diferentes regiões da China. Foram estudadas mutações em *tP53* por imunohistoquímica, PCR-SSCP e seqüenciamento: o índice de mutações pontuais encontrado foi de 30.4 % e de expressão aumentada da proteína p53 foi de 51.1 % . A expressão aumentada da proteína p53 teve associação com doença metastática e sobrevida abaixo de cinco anos. As mutações encontradas foram mais freqüentes nos exons 5 e 7.

Mir (2005) estudando 55 pacientes do vale do Kashmir, localizado no norte da Índia, evidenciou 36 % de mutações no gene *tP53* por PCR e seqüenciamento. Esta região também apresenta elevada prevalência de carcinoma epidermóide de esôfago.

Estudo chinês publicado em 2005 conduzido por Li-Ya Li estudou 24 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago quanto a presença de mutações no gene *tP53* , exons 4 a 8. Foi utilizada a técnica de PCR , SSCP e seqüenciamento. Observou-se 41 % de mutações no tecido neoplásico e 59 % nos tecidos adjacentes ao câncer.

Kawakubo (2005) estudou 105 casos de biópsias de lesões esofágicas de pacientes japoneses indicativas de neoplasia quanto a expressão de ki67, p53, ciclina D1 e pRB utilizando imunohistoquímica. Os autores evidenciaram uma

expressão de p53, ciclina D1 e pRB de 31 , 0 e 51 % respectivamente, nos casos de displasia leve. Nos casos de displasia moderada foi de 40, 0 e 70 % respectivamente. Já nos casos de displasia severa os índices são de 40, 20 e 70 % respectivamente. Nos casos de carcinoma epidermóide observou-se 48, 32 e 80 % respectivamente. Os autores concluem que a expressão de p53 foi aumentada nos casos de displasia leve, enquanto que a expressão de ciclina D1 e pRB foi aumentada nos casos de carcinoma epidermóide quando em comparação ao epitélio esofágico normal e esofagite.

Murtaza (2006) estudou pacientes indianos do vale do Kashmir. Foram estudados 45 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago e 150 pacientes controles. Dos 45 pacientes com câncer, 35 (77%) apresentaram mutação no gene *tP53*. A técnica de PCR –SSCP demonstrou que as mutações ocorreram mais no exon 6 (77%). Os autores concluem que as mutações encontradas tem associação com fatores dietéticos utilizados nesta população, como alimentos ricos em nitrosaminas, e história familiar de câncer.

Um estudo sul-coreano publicado em 2006 conduzido por Kim avaliou os padrões de expressão das proteínas p53, p16 e ciclina D1 em displasia esofágica e carcinoma epidermóide. Foram estudados quinze pacientes com câncer, cinco pacientes com displasia esofágica e cinco voluntários com esôfago normal. A mutação em *Tp53* foi observada em 13 de 15 (87%) pacientes com câncer, em 4 de 5 (80%) com displasia e em zero de 5 com mucosa normal. Como conclusões os autores citam que tanto a mutação em *Tp53* como a diminuição em *Tp16* podem desempenhar um papel central na patogênese do carcinoma epidermóide

de esôfago e contribuir para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas como a displasia.

A imunohistoquímica não define a existência de mutações genéticas, mas existem dados que sugerem a relação entre o prolongamento da estabilidade da proteína p53 e, conseqüentemente, a sua expressão imunohistoquímica, com mutações ocorrendo no epitélio esofágico, principalmente as mutações do tipo *missense* (HARIS & HOLLSTEIN,1993; WAGATA ET AL,1993).

A imunohistoquímica tem suas limitações, e a ausência de marcação não significa ausência de alteração da proteína(falso negativo). De modo inverso, o acúmulo de proteína não significa mutação. A ausência de expressão da proteína pode ocorrer em virtude de condições adversas de fixação do tecido, diminuindo a sensibilidade da técnica. Mutações do tipo *nonsense* podem impedir a detecção da proteína. Por outro lado, a proteína pode ser detectada em tecidos normais, em situações de indução fisiológicas frente a alterações acidentais do genoma. Uma forte positividade, na maioria das células tumorais, indica uma disfunção da proteína, podendo corresponder a mutação ou estabilização por outro mecanismo (KLUMB, 2002).

É possível que o acúmulo da proteína p53 em células tumorais possa indicar a existência de um defeito regulatório na seqüência codificadora protéica do gene, ao invés de uma mutação. Diversos investigadores observaram discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações, e além disso, pode ocorrer a mutação no gene *Tp53* sem o aumento na expressão da proteína (CASSON ET AL,1998; COGGI ET AL,1997).

Um exemplo desta situação foi apontado por Ribeiro (1998), com avaliação imunohistoquímica para a proteína p53 e PCR-SSCP para comprovações de mutações nos exons 5 a 8. Das amostras estudadas, 60 % foram imunopositivos, ao passo que em 40 % se comprovou mutação gênica. Os autores concluíram que o binômio de análise histopatológica e genética proporciona um melhor determinante do que a imunohistoquímica isolada, e poderia ser utilizado como fator prognóstico no carcinoma epidermóide de esôfago.

EXON	RS 1	RJ e SP	RS 2	IRÃ	FRANÇA	IARC
Número pacientes	36	38	135	98	34	-----
Mutações N						
Exon 5						
Exon 6						
Exon 7						
Exon 8						

Exon	RJ e SP	RS <sup>1,5</sup>	Irã <sup>2,5</sup>	FRANÇA <sup>3,5</sup>	IARC <sup>4,5</sup>
Pacientes, N	38	135	98	34	-
Mutações, N(%)	12 (31,6%)	47 (34,8%)	55 (56,1%)	24 (70,6%)	1033
5	5 (41,7%)	18 (38,3%)	25 (45,5%)	8 (33,3%)	372 (36,0%)
6	1 (8,3%)	5 (10,6%)	7 (12,7%)	8 (33,3%)	185 (17,9%)
7	4 (33,3%)	8 (17,0%)	8 (14,5%)	1 (4,2%)	219 (21,2%)
8	2 (16,7%)	16 (34,1%)	15 (27,3%)	7 (29,2%)	257 (24,9%)

Tipo de mutação	RJ e SP	RS <sup>1,5</sup>	IRÃ <sup>2,5</sup>	FRANÇA <sup>3,5</sup>	IARC <sup>4,5</sup>
<b>A:T&gt;C:G</b>	<b>0</b>	1 (2,1%)	4 (7,3%)	2 (8,3%)	39 (3,8%)
<b>A:T&gt;G:C</b>	<b>2 (16,7%)</b>	5 (10,6%)	8 (15,5%)	4 (16,7%)	111 (10,7%)
<b>A:T&gt;T:A</b>	<b>1 (8,35)</b>	2 (4,3%)	3 (5,5%)	0	72 (7,0%)
<b>Deleção</b>	<b>4 (33,3%)</b>	6 (12,8%)	3 (5,5%) <sup>6</sup>	4 (16,7%)	102 (9,9%) <sup>6</sup>
<b>G:C&gt;A:T</b>	<b>1 (8,3%)</b>	10 (21,3%)	7 (12,7%)	3 (12,5%)	176 (17,0%)
<b>G:C&gt;A:T em CpG</b>	<b>1 (8,3%)</b>	9 (19,1%)	17 (30,9%)	4 (16,7%)	221 (21,4%)
<b>G:C&gt;C:G</b>	<b>0</b>	5 (10,6%)	3 (5,5%)	2 (8,3%)	51 (4,9%)
<b>G:C&gt;T:A</b>	<b>3 (25,0%)</b>	8 (17,0%)	6 (10,9%)	5 (20,8%)	201 (19,5%)
<b>Inserção</b>	<b>0</b>	0	4 (7,3%)	0	48 (4,6%)
<b>Tandem</b>	<b>0</b>	1 (2,1%)	0	0	12 (1,2%)

Referências: <sup>1</sup>PUTZ *et al.*, 2002; <sup>2</sup>SEPEHR *et al.*, 2001; <sup>3</sup>BRETON *et al.*, 2003; <sup>4</sup>OLIVIER *et al.*, 2002 (IARC Database).

<sup>5</sup> Foram excluídas as mutações em introns e os polimorfismos encontrados nestes trabalhos.

<sup>6</sup> p< 0.050

## 7 CONCLUSÕES

- A prevalência de mutações no gene *Tp53* nos exons 5 a 8 no presente estudo foi de 16,6 %
- As mutações foram em sua maioria do tipo missense, estando localizadas preferencialmente no exon 5
- Não houve associação estatisticamente significativa entre os fatores de risco estudados (tabaco, álcool e chimarrão) com as mutações encontradas
- A análise imunohistoquímica evidenciou uma expressão aumentada da proteína p53 na maioria dos casos



## 8 ANEXOS

### ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

NÚMERO DO PACIENTE :

#### IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE:

Data da entrevista:    /    /

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

#### INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1. Alguma vez você já percebeu alguns desses sintomas? Há quanto tempo?
- |  |                              |                              |               |
|--|------------------------------|------------------------------|---------------|
| Dificuldade para engolir?                | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | _____         |
| Queimação atrás do peito – Azia?         | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | _____         |
| Sentir voltar o alimento – Regurgitação? | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | _____         |
| Perdeu peso?                             | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | Quanto? _____ |
2. Se você teve algum diagnóstico , qual foi?
- \_\_\_\_\_

#### HÁBITOS

##### Fumo:

Você fuma?  sim  não

Se sim, o que fuma?  cigarro  cachimbo  palheiro

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Quantos cigarros ao dia? \_\_\_\_\_

##### Álcool:

Utiliza bebidas alcoólicas?  sim  não

Se sim, qual bebida? \_\_\_\_\_

Com que frequência? \_\_\_\_\_

Quantidade? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

#### COMORBIDADES:

HAS  sim  não

Diabetes  sim  não

Asma  sim  não

Obesidade  sim  não

Tilose  sim  não

Doença de Chagas  sim  não

**ANTECEDENTES PESSOAIS E HISTÓRIA FAMILIAR:**

Você já apresentou algum tipo de câncer? \_\_\_\_\_

Tem algum familiar com antecedente de câncer? \_\_\_\_\_

Se sim, qual familiar? \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde assim como aspectos genéticos de pacientes submetidos à endoscopia digestiva no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com suspeita ou diagnóstico de neoplasia de esôfago.

Para isto, pedimos a colaboração dos pacientes para responder um questionário com duração aproximada de 10 a 15 minutos, além de uma amostra de 10 ml de sangue, que será coletado após o exame de endoscopia (exame que faz parte da rotina do atendimento no HCPA para pacientes com suspeita de tumor de esôfago). Durante o exame de endoscopia, serão coletados 08 fragmentos a mais do que é habitualmente realizado. Esses fragmentos da lesão esofágica possibilitarão estudar a estrutura molecular do DNA do tumor. Mas o que é DNA? O DNA é uma estrutura em forma de escada que está presente em todas as células do corpo humano. Quando um “degrau” dessa escada está danificado a célula não funciona adequadamente. Identificando qual o degrau que foi danificado pode-se conhecer qual o agente que causou tal dano. Por exemplo, o cigarro costuma danificar um determinado “degrau” desse DNA. Por isso, saber qual o “degrau” que foi danificado é importante. A partir dessa informação se pode determinar qual a substância que mais colaborou com o aparecimento da doença. Além disso, algumas evidências mostram que, no futuro, essas informações sobre o DNA de cada tumor poderão auxiliar o médico a escolher o tratamento que melhor funcionará para cada paciente.

Os fragmentos do tumor serão estudados no laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, onde o Prof. Luis Felipe Ribeiro Pinto ficará responsável pela análise do material.

As Equipes do Professores Cleber D. P. Krueel, Sérgio Barros e Luise Meurer, juntamente com os pesquisadores da Universidade Estadual do Rio de Janeiro se comprometem em não divulgar as informações para terceiros. Os fragmentos de biópsia do tumor serão armazenados em Banco de Material Biológico no laboratório de Bioquímica da UERJ (Rio de Janeiro). As informações referentes ao material estudado serão armazenadas em banco de dados localizado na UERJ sob responsabilidade da Equipe envolvida na pesquisa. Fica assegurado que as informações que constarem neste banco de dados serão utilizadas apenas para o presente estudo.

As informações obtidas no estudo estarão a disposição do paciente, ou no caso de impossibilidade do mesmo, poderão ser obtidas por familiares.

O exame de endoscopia terá sua duração mais prolongada que o habitual (aproximadamente 10 minutos a mais), sem aumentar os riscos relativos ao exame. No entanto, pode-se provocar um pequeno desconforto ao paciente em virtude do prolongamento do exame.

Os pacientes que participarem do estudo não terão benefícios num primeiro momento. No futuro, as informações obtidas pelas análises dos tumores poderão indicar qual o agente que mais contribuiu para o aparecimento da doença. Isso

poderá servir de alerta para gerações futuras que cultivem hábitos como, por exemplo, ingerir bebidas muito quentes.

Deixamos claro que a participação é voluntária. A escolha de participar ou não do estudo não terá nenhuma influência no tipo de tratamento que é oferecido no HCPA. Em caso de qualquer intercorrência ou desconforto o voluntário poderá recorrer às equipes do HCPA envolvidas no estudo. As informações obtidas assim como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo, e serão usadas apenas pela equipe interna que faz parte da pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da presente pesquisa de acordo com as informações prestadas acima sobre os riscos, desconfortos , benefícios e procedimentos a serem realizados .

\_\_\_\_\_

Data: / /

Paciente

---

Pesquisador

Agradecemos antecipadamente a colaboração e nos colocamos à disposição para o esclarecimento de dúvidas. Você poderá entrar em contato com a Equipe responsável pelo estudo através do telefone 2101- 8307 (Serviço de Gastroenterologia do HCPA).

---

---

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, Armand JP, Riou G. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. **Oncogene 1995 March 16;10(6):1217-27.**

Bennett WP, von Brevern MC, Zhu SM, Bartsch H, Muehlbauer KR, Hollstein MC. p53 mutations in esophageal tumors from a high incidence area of China in relation to patient diet and smoking history. **Cancer Epidemiological Biomarkers Prev. 1997 November;6(11)963-6.**

Bevilacqua RG, Cerqueira EMM, Alcântara PSM. Genética em câncer digestivo. In: Paula Castro, Savassi Rocha e Andy Petroinau. **Tópicos em Gastroenterologia 7. Avanços em Gastroenterologia 1997;31-48. Editora Medsi- Rio de Janeiro.**

Binder T, Berg T, Siegert W et al. PCR-SSCP: nonradioisotopic detection with biotinylated primers and streptavidin-alkaline phosphatase conjugate. **Biotechniques.** 1995 May;18(5):780-1.

Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. **Cancer Research 2001, April 1;61(7):3119-3123.**

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA, Câncer de Esôfago. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) Rio de Janeiro, 2006.

Cao W, Chen X, Dai H, Wang H, Shen B, Chu D, McAfee T, Zhang ZF. Mutational spectra of p53 in geographically localized esophageal squamous cell carcinoma groups in China. **Cancer 2004, August 15;101(4): 834-44.**

Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. **Journal Of Clinical Pathology: Molecular Pathology 1998; 51:71-79.**

Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. **International Journal of Cancer , 82, 657-664 (1999).**

Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **International Journal of Cancer** , **88**, 658-664 (2000).

Cecconello I, Felix VN, Gama-Rodrigues, J. Câncer de Esôfago. In: **Condutas em Gastroenterologia. Federação Brasileira de Gastroenterologia**.2004;68-71. Editora Revinter, Rio de Janeiro.

Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Gaziani D, Bossi P, Viale G, Buffa R, Ferrero S, Piazza M, Blandamura S, Segalin A, Bonavina L, Peracchia A. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. **Cancer** **1997;79:425-432**.

Dong Y, Walsh MD, Mc Guckin MA et al. Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRB) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**. 1997 Aug 22;74(4):407-15.

Enzinger PC, Mayer RJ. *Esophageal Cancer – Review Article*. **New England Journal of Medicine** **2003; 349:2241-52**.

Étienne J. **Bioquímica genética e biologia molecular**. 6ª edição. 2003. São Paulo: Liv. Santos,xx,504p: il.

Haris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor supressor gen. **New England Journal of Medicine** **1993;329(18):1318-1326**.

Hunter T. **Cell** 75:839-841, 1993.

Kawakubo H, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Mukai M, Ueda M, Kitajima M. Alterations of p53 , cyclin D1 and pRB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. **Oncolog Rep** **2005, December;14(6): 1453-1459**.

Kim SG, Hong SJ, Kwon KW, Jung SW, Kim WY, Jung IS, Ko BM, Ryu CB. The expression of p53 , p16, cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma and esophageal dysplasia. **Korean Journal of Gastroenterology** **2006, October;48(4):269-76**.

Klumb CE, Cavalcanti JGB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** **2002;24(2):111-125**.

Krisnadath KK, Tilanus HW, Blankenstein MV, Mulder BH, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett 's oesophagus. **Journal of Pathology** 1995; 175: 175-180.



Kuwano H, Kato H, Miyazaki T, Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M. Genetic Alterations in Esophageal Cancer. **Surgery Today (2005) 35:7-18.**

Landberg G, Roos. The cell cycle in breast cancer. **APMIS.** 1997 August;105(8):575-589.

Lam KY, Loke SL, Chen WZ. Expression of p53 in oesophageal squamous cell carcinoma in Hong kong Chinese. **European Journal of Surgical Oncology 1995;21:242-247.**

Lam, AKY. Critical review . Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma . **Critical Reviews in Oncology / Hematology 33;71-90, 2000.**

Law JC, Deka A. Identification of a PstI polymorphism in the p21Cip1/Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. **Hum Genet.** 1995 Apr;95(4):459-60.

Law JC, Facher EA, Deka A. Nonradioactive single-strand conformation polymorphism analysis with application for mutation detection in a mixed population of cells. **Anal Biochem.** 1996 May 1;236(2):373-5.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I and Clinical Genomics of Esophageal Cancer Group. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis- Review Article. **Arquivos Brasileiros de Gastroenterologia 2003;40(4):256-261**

Lijinsky W. **Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds.** Cambridge, Cambridge University Press. (1992)

Lis JT. Fraction of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. **Methods Enzimol** 1980, 65(1):347-353.

Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. **World Journal of Gastroenterology 2005;11(19):2998-3001.**

Louro ID. Sistemas de controle celular. In:Louro ID,Llerena Jr Jc, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann, Conforti-Froes N. **Genética Molecular do Câncer.** 2000;44-82. MSG Produção Gráfica- São Paulo.

Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RN. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (India): a high-incidence area. **International Journal of Cancer 2005 August, 10;116(1):62-8.**

Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **International Journal of Cancer**. 1996 Jun 21;69(3):225-35.

Murtaza I, Mushtaq D, Margoob MA, Dutt A, Wani NA, Ahmad I, Bhat ML. A study on p53 gene alterations in esophageal squamous cell carcinoma and their correlation to common dietary risk factors among population of the Kashmir valley. **World Journal of Gastroenterology** 2006, July 7;12(25):4033-4037.

Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biology** 1994;59:339-48.

Putz A, Hartmann AA, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. Tp53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (southern Brazil):role of life style factors. **International Journal of Cancer**, 98,99-105 (2002).

Ribeiro JU, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. **Cancer** 1998;83(1):7-18.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1, 9.20, 1989.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**. 1994 Nov;17(5):914-21.

Seuáñez HN, Moreira MAM, Otazú IB, Braggio E, Renault IZ. Métodos moleculares de diagnóstico. In:Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular** 2004; 13-27. Editora Atheneu – São Paulo.

Sherr CJ. G1 phase progression:cycling on cue. **Cell** 1994;79:551-555.

Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I et al. Genetic alterations in patients with esophageal cancer with short- and long-term survival rates after curative esophagectomy. **Annals of Surgery**. 1997 Aug;226(2):162-8.

Shimada H, Nabeya Y, Okazumi SI, Matsubara H, Funami Y, Shiratori H, Takeda A, Ochiai T. Prognostic significance of serum p53 antibody in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Surgery** 2002; 132: 41-47.

Silva RLA. Oncogenes e genes supressores de tumor. In:Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular 2004; 29-42**. Editora Atheneu – São Paulo.

Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors. **Human Pathology, 1994, october; 25(10): 968-981**.

Vos M, Adams CH, Victor TC, van Helden PD. Polymorphisms and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the *TP53* gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. **Cancer Genet Cytogenet 2003, January 1;140(1):23-30**.

Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K. Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Research 1993;53:846-850**.

Wang LS, Chow KC, Liu CC, Chiu JH. p53 gene alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus detected by PCR-cold SSCP analysis. **Proc National Scientific Counc Republic of China B 1998;22:114-21**