

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE p53 EM PACIENTES COM ESOFAGITE,
METAPLASIA INTESTINAL DA CÁRDIA E ESÔFAGO DE BARRETT**

Diogo André Pilger

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner Segal

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2006

P638a Pilger, Diogo André

Análise molecular do gene p53 em pacientes com esofagite, metaplasia intestinal da cárdia e esôfago de Barrett; orient. Sandra Leistner Segal ; co-orient. Fábio Segal. – 2006.

148 f. : il. color.

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

1. Genes P53 2. Polimorfismo 3. Esôfago de Barrett 4. Metaplasia 5. Esofagite I. Segal, Sandra Leistner II. Segal, Fábio III. Título.

NLM: WI 250

Dedicatória

À minha família, pelo amor, esforço e constante

incentivo aos estudos.

À Daniela, pelo amor, dedicação e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sandra Leistner-Segal, pelos ensinamentos e desafios na biologia molecular, sua confiança e orientação constante.

Ao Dr. Fábio Segal, pela proposta, generosidade e orientação clínica.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica, Patrícia Lopez, Tatiane Cristófoli e Rafael Silva pelo auxílio na realização deste trabalho. À Luciane Cauduro Lima pelo auxílio com seus conhecimentos de biologia molecular e incentivo no laboratório.

Aos colegas do Laboratório Weinmann pela compreensão e oportunidade de realização desta etapa.

À Dra. Beatriz von Poser pela amizade, paciência e análise crítica contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Serviço de Genética Médica, pelo apoio estrutural para realização deste estudo.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas por oferecer condições para seguir com minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), pelo suporte financeiro.



“Si yo tengo el Esófago del Sr Barret, entonces ¿quién tiene el mío?”

(Extraído del Art. del Dr Heading. Medwave)

Em agradecimento à Dra. Beatriz von Poser

Aquele que duvida e não
investiga torna-se não só infeliz, mas também injusto.

(Pascal)

O primeiro dever da inteligência é desconfiar dela mesma.

(Einstein)

SUMÁRIO	Página
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas	
I. INTRODUÇÃO	10
1. Esôfago de Barrett	10
2. Metaplasia Intestinal da Cárdia	12
II. REVISÃO DA LITERATURA	13
1. Epidemiologia	13
1.1 Distribuição étnica	15
1.2 Prevalência familiar do Esôfago de Barrett	15
2. Doença de Refluxo Gastresofágico (DRGE)	16
2.1 Alterações no epitélio esofágico devido à DRGE	17
3. Displasia	18
4. Neoplasia esofágica e o gene p53	20
5. O ciclo celular e o gene p53	22
6. Alterações moleculares no gene p53	23
6.1 Instabilidade genômica (Aneuploidia)	23
6.2 Instabilidade microssatélite	24
6.3 Perda de Heterozigidade	24
6.4 Mutações	26
6.5 Polimorfismos	28
7. Técnicas laboratoriais para detecção de alterações moleculares no gene p53	30
7.1 Extração de DNA	30
7.2 Reação em Cadeia da Polimerase	30
7.3 Eletroforese	31
7.4 Digestão com endonucleases de restrição	32

	6
7.5 Sequenciamento	32
III. OBJETIVOS	33
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
V. ARTIGO 1 (Versão em português)	43
VI. ARTIGO 1 (Versão em inglês)	60
VII. ARTIGO 2 (Versão em português)	77
VIII. ARTIGO 2 (Versão em inglês)	97
IX. ARTIGO 3 (Versão em português)	116
X. ARTIGO 3 (Versão em inglês)	130
XI. ANEXOS	
Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	144
Anexo II. Instruções aos Autores <i>Cancer Genetics and Cytogenetics</i>	147

LISTA DE FIGURAS**Página**

FIGURA 1: Representação da distinção entre esôfago normal e Esôfago de Barrett	12
FIGURA 2: Representação esquemática da adaptação que ocorre durante a formação da metaplasia	19
FIGURA 3: Diagrama esquemático do ciclo celular abordando mecanismos e alterações genéticas envolvidos na carcinogênese esofágica	24

LISTA DE ABREVIATURAS

EB: Esôfago de Barrett

JEG: Junção gastroesofágica

MIC: Metaplasia Intestinal da Cárdia

INCA: Instituto Nacional do Câncer

DRGE: Doença de refluxo gastroesofágico

Rb: Retinoblastoma

TP53: gene p53

p53: proteína p53

DNA: Ácido desoxirribonucléico

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento de endotélio vascular)

S: fase de síntese do ciclo celular

G1: fase *gap 1* do ciclo celular

G2: fase *gap 2* do ciclo celular

M: fase de mitose do ciclo celular

FT: Fator de transcrição gênica

CDks: Quinase ciclino dependentes

LOH: *Loss of Heterozygosity* (Perda de Heterozigozidade)

A: Adenina

G: Guanina

C: Citosina

T: Timina

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo)

HPV: *Human Papilloma Virus* (Papiloma Virus Humano)

SSCP: *Single-strand conformation polymorphism* (Análise de Conformação de cadeia simples)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

I. INTRODUÇÃO

1. ESÔFAGO DE BARRETT

O Esôfago de Barrett (EB) é uma condição adquirida por ação do refluxo gastroesofágico na qual uma extensão variável do epitélio escamoso do esôfago distal é substituída por um epitélio colunar especializado (1).

Três tipos bem diferenciados de epitélio colunar que podem estar presentes no esôfago de distal: epitélio fúndico, epitélio juncional ou cárdico e o epitélio colunar especializado (2). Este último, característico do EB, diferentemente do fúndico e do juncional, adquire uma grande relevância clínica devido a sua associação com o desenvolvimento de displasia e adenocarcinoma (3,4).

Até a poucos anos atrás, o Esôfago de Barrett era definido, arbitrariamente, como qualquer tipo de epitélio colunar com um comprimento mínimo de 3 cm acima da junção gastroesofágica (linha Z) (5). Entretanto, baseado em evidências de que o adenocarcinoma esofágico poderia estar associado a pequenos segmentos de metaplasia intestinal e, devido à dificuldade para a definição de epitélio colunar em pequenos segmentos de metaplasia intestinal (com menos de 3 cm de comprimento), ampliou-se esta definição (6).

Uma mudança importante na compreensão da patogênese do EB foi a observação da capacidade de substituição de um segmento desnudo da mucosa escamosa esofágica por ação do refluxo persistente por células colunares secretoras de muco, sugerindo uma migração do epitélio colunar em direção proximal com objetivo de substituir o epitélio original (7).

A definição proposta pelo Colégio Americano de Gastroenterologia é que EB é uma alteração no epitélio esofágico, de qualquer comprimento, reconhecido por endoscopia, na qual a metaplasia intestinal especializada com presença de células calciformes é confirmada por biópsia (8,9). Essa definição

inclui o EB propriamente dito (epitélio com 3 cm ou mais de comprimento) e o EB de segmento curto (epitélio inferior a 3 cm de comprimento).

Morfologicamente, o epitélio do EB apresenta perfil viliforme com muitas células caliciformes intercaladas com células de muco e epitélio glandular (8). As células caliciformes observadas no Esôfago de Barrett se coram intensamente com o corante Alcian Blue (em pH 2,5) (10). Células de Paneth podem ocorrer, mas são raras. Juntamente com a mucosa intestinal especializada, outros dois tipos podem estar presentes, a cárdica e a fúndica (8).

Três tipos de metaplasia estão associados ao EB. No tipo 1, ou metaplasia intestinal completa, estão presentes células caliciformes e de Paneth. Os tipos 2 e 3 são definidos como metaplasia intestinal incompleta, pois o epitélio perde a atividade absorptiva das células intestinais. Qualquer tipo pode apresentar displasia e potencial maligno (11).

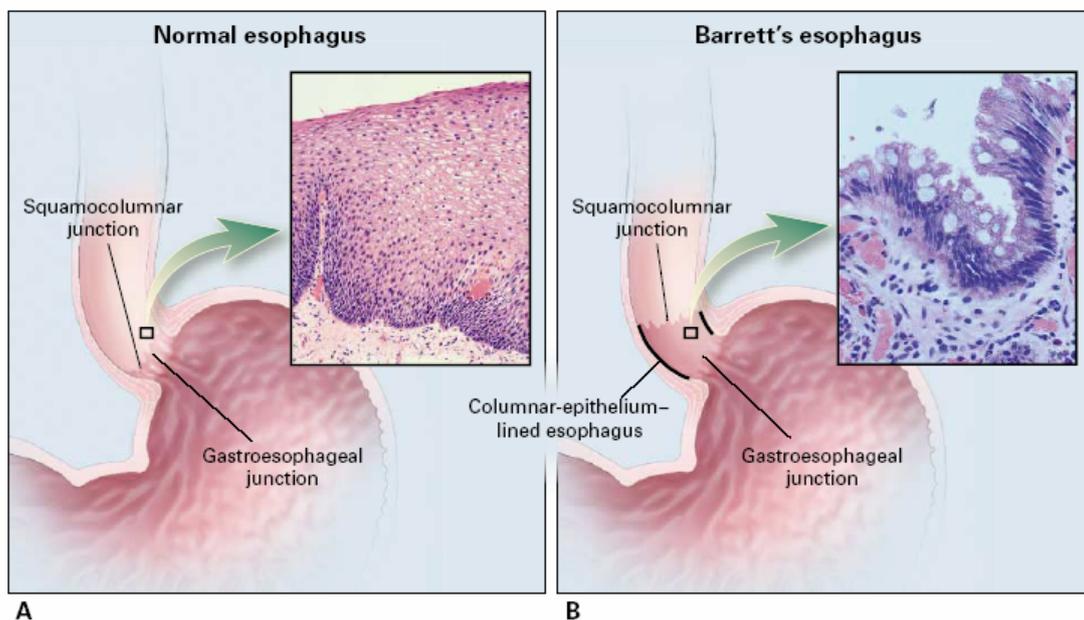


Figura 1: Representação da distinção entre esôfago normal e Esôfago de Barrett. A: esôfago normal B: Esôfago de Barrett. A junção gastroesofágica (JEG) é a linha invisível na qual o esôfago termina e o estômago começa. A área entre as duas junções na figura B representa o epitélio colunar com metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett) (adaptado de Spechler *et al.*, 2002) (12).

2. METAPLASIA INTESTINAL DA CÁRDIA

A cárdia é uma região anatomicamente localizada na transição entre o esôfago e o estômago, mais precisamente entre a porção tubular do esôfago distal e a parte proximal da porção gástrica. Nessa região, observa-se a justaposição do epitélio escamoso do esôfago com o epitélio do tipo colunar gástrico, apresentando-se à endoscopia em uma linha irregular, chamada de linha Z (13,14).

A mucosa cárdica é uma mucosa com epitélio colunar sem secreção ácida. A maioria da população não apresenta mucosa cárdica na junção gastroesofágica (JGE). Conforme Oberg *et al.*, 1997 a mucosa cárdica e oxíntico-cárdica são mucosas anormais na JGE que resultam do efeito do ácido sobre o epitélio escamoso do esôfago (15), entretanto somente a mucosa cárdica evolui para metaplasia especializada (EB) (16). O epitélio da cárdia parece ser marcador para a doença de refluxo gastroesofágico (17).

As células colunares tipo cárdicas apresentam grânulos de muco assemelhando-se às células secretoras gástricas, quando se utiliza coloração convencional (Hematoxilina-Eosina). Entretanto, com o uso de Alcian-Blue (pH 2,5) estas células apresentam tonalidade azulada de positividade, mas pelo fato de não terem a forma de “barrilete” diferem das células do EB que se coram mais intensamente (10).

Em estudos recentes, Chandrasoma *et al.*, 2000 propôs que a mucosa cárdica, considerada anatomicamente normal, seria metaplásica (18,19). Observou-se que biópsias colhidas na JGE, macroscopicamente de aspecto normal, demonstraram a presença de focos microscópicos de metaplasia intestinal em mucosa cárdica, o que foi denominado de Metaplasia Intestinal da Cárdia (MIC) (20).

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. EPIDEMIOLOGIA

A neoplasia de esôfago (todos os subtipos histológicos) é, atualmente, a nona causa mais freqüente de morte por câncer no mundo (21) e a sexta nos Estados Unidos (22,23), aumentando em torno de 300 a 500% nos últimos 30 a 40 anos (24). Estima-se que apareçam 12.300 novos casos nos Estados Unidos por ano (11), com uma taxa de sobrevivência inferior a 25% em 5 anos (21).

No Brasil, em 2005, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a incidência de neoplasia de esôfago foi a sétima mais freqüente entre as neoplasias para os homens e a décima para as mulheres. De acordo com estimativas de incidência de câncer no Brasil, devem ocorrer cerca de 10.580 novos casos de neoplasias esofágicas (7.970 entre os homens e 2.610 entre as mulheres) em 2006 (25).

A taxa bruta de incidência no Rio Grande do Sul foi de 22,57/100.000 habitantes para os homens (quinta mais alta) e 7,59/100.000 habitantes para as mulheres (sétima mais alta). Representou, no ano de 2003, a terceira causa de óbito por câncer entre os homens (coeficiente de mortalidade de 12,03/100.000 habitantes) superado apenas pelas neoplasias de pulmão e próstata (26).

Mais de 90% das neoplasias esofágicas são dos tipos carcinoma epidermóide e adenocarcinoma (23). O perfil epidemiológico das neoplasias esofágicas vem sofrendo alterações nas últimas décadas com aumento da incidência do adenocarcinoma e decréscimo do carcinoma epidermóide (27).

O adenocarcinoma do esôfago é uma complicação bem estabelecida do EB. Uma vez identificado como portador de EB, o paciente tem uma probabilidade de desenvolver adenocarcinoma de esôfago de 0,5 a 3,0% por ano (24,28). A freqüência de EB, em pacientes com neoplasia esofágica, era de 16% na década de 70, passando a 34% nos anos de 1980 (29) e chegando em torno

de 50% em 1990 (30). Atualmente, a taxa de mortalidade do adenocarcinoma esofágico excede a 80% em 5 anos (28,31).

O Esôfago de Barrett representa uma das mais importantes conseqüências histológicas da doença de refluxo gastresofágico (DRGE), desenvolvendo-se em torno de 10% dos pacientes com esta condição (11) e 11 a 36% dos pacientes com esofagite (32,33).

Assume-se que 5% de pacientes em geral apresentam sintomas de refluxo e que destes, até 5% podem apresentar EB (34). Dependendo de como EB é definido, 0,25 a 2% da população em geral e em torno de 10% dos pacientes sob vigilância endoscópica por sintomas de refluxo apresentam EB (34,35,36,37). Como conseqüência, o risco para desenvolvimento de adenocarcinoma aumentou em pacientes com EB (de 30 a 125 vezes) (38,39,40).

Aparentemente, a incidência de metaplasia intestinal tem aumentado nos últimos anos, porém devido ao fato da endoscopia gastrointestinal superior estar aumentando de freqüência, não se sabe se isto é um aumento real ou conseqüência do maior número de investigação (41).

A prevalência de EB aumenta com o tempo de duração dos sintomas de refluxo. Segundo Liebermann *et al.*, 1997 a prevalência de EB, comparado com pacientes com sintomas de refluxo por menos de 1 ano, foi 3 vezes mais elevada em pacientes com sintomas de refluxo entre 1 e 5 anos, 5 vezes mais elevada em pacientes com até 10 anos de refluxo e de cerca de 6 vezes em pacientes com mais de 10 anos (42).

A prevalência de EB e o conseqüente risco para adenocarcinoma variam com a idade e sexo. Os homens predominam em uma taxa de 5:1 (24) sendo que o grupo de maior risco para desenvolvimento de neoplasia esofágica é o do sexo masculino com mais de 50 anos (12), atingindo um platô em torno de 70 anos de idade (37).

1.1 Distribuição Étnica

A distribuição geográfica reflete a influência de condições ambientais locais, estilo de vida e predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasia esofágica (22).

Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou maior incidência de EB e adenocarcinoma em caucasianos do que em afro-americanos (43). Blot *et al.*, 1991 demonstrou uma relação de 3:1 (branco:negro) para adenocarcinoma de esôfago em homens (29). Devesa *et al.*, 1998 atualizou esses dados mostrando que a incidência aumentou 350% em homens caucasianos (44). Atualmente, os homens caucasianos têm 5 vezes mais chance de ter adenocarcinoma de esôfago do que os afro-americanos (43).

1.2 Prevalência familiar do Esôfago de Barrett

Existem múltiplos casos de Esôfago de Barrett familiar demonstrados na literatura nos quais dois ou mais membros de uma mesma família apresentam EB e, eventualmente, adenocarcinoma de esôfago. Entretanto, há casos de pacientes com refluxo gastroesofágico sem EB encontrados em membros de famílias nas quais casos de EB haviam sido previamente descritos (45). Segundo Romero *et al.*, 1998 os sintomas de refluxo (pirose e regurgitação ácida) foram significativamente mais freqüentes em pais e irmãos de pacientes com EB (46). Tanto este trabalho quanto outro publicado por Trudgill *et al.*, 1999 encontraram aumento na prevalência dos sintomas de refluxo em parentes de pacientes com EB (47).

Segundo Cameron *et al.*, 2003 parece existir um componente genético, além do ambiental, para o desenvolvimento de refluxo e EB (45). Uma herança autossômica dominante para desenvolvimento de refluxo (48), hérnia hiatal (49) ou EB (50) foi proposta. Assim sendo, embora em algumas famílias pareça existir um perfil de herança autossômica dominante, supõe-se que existam múltiplos

genes de baixa penetrância que contribuam para a formação de um *cluster* familiar (28).

2. DOENÇA DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO

O adenocarcinoma esofágico é uma doença com etiologia multifatorial (51). Recentes estudos têm demonstrado que o fator de risco mais importante é a doença de refluxo gastroesofágico (DRGE) e o conseqüente desenvolvimento de EB (27,41,51,52,53).

Embora não exista uma definição universalmente aceita, DRGE é comumente referida como uma afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado do conteúdo gastroduodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes, acarretando um espectro variável de sintomas e/ou sinais esofagianos e/ou extra esofagianos associados ou não a lesões teciduais (54).

A DRGE apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas, secundárias ao refluxo do material gástrico. Entre elas, a pirose é a mais típica (24). O refluxo leva as alterações endoscópicas e histológicas no epitélio escamoso e a presença de um pH esofágico anormal medido através do monitoramento de pH esofágico em 24 horas (pHmetria).

A etiologia da DRGE é multifatorial: alterações na motilidade e esvaziamento esofágico, redução na pressão do esfíncter esofágico inferior, acalasia, secreção ácida e alcalina estão envolvidos (37,55,56,57,58,59,60,61,62,63).

O epitélio colunar, característico do EB, é uma condição adquirida prevalente em pacientes com refluxo gastroesofágico, seja este de natureza ácida ou alcalina (5). Diferentes estudos confirmam a associação entre a presença do epitélio colunar no esôfago e os sintomas clínicos de refluxo gastroesofágico (16).

2.1 Alterações no epitélio esofágico devido à DRGE

A evolução progressiva do epitélio esofágico normal para epitélio do tipo colunar no Esôfago de Barrett caracteriza-se por uma complexa seqüência de eventos que se iniciam por uma inflamação do epitélio escamoso normal (esofagite), decorrente de refluxo crônico, seguida de metaplasia intestinal da cárdia e EB, graus crescentes de displasia e adenocarcinoma.

Desde a inflamação do epitélio escamoso normal que precede o desenvolvimento de metaplasia intestinal, um constante processo de dano e reparo conduz a regeneração do epitélio inflamado. Este epitélio imaturo é sensível ao dano ácido e alcalino como visto em pacientes com refluxo crônico (64).

A inflamação crônica e a subseqüente morte celular e perda da altura da zona proliferativa, aliada ao comprimento da papila basal, induzem a formação de esofagite com regeneração. Este evento é acompanhado pelo aumento do desdobramento do epitélio esofágico levando células-tronco para uma posição mais exposta e suscetível ao potencial tóxico do refluxo de materiais, evidenciado pela expressão de fator de crescimento epidérmico nestas áreas. Estas células-tronco sofrem diferenciação quando submetidas ao constante refluxo, levando a uma expressão de fenótipos glandulares distintos da mucosa gástrica adjacente (1). Essa alteração pode evoluir para três tecidos metaplásicos distintos: intestinal, fúndico e cárdico. Atualmente não se conhece quais bases moleculares contribuem para o desenvolvimento de um ou outro. Assim, o refluxo induz a substituição de células escamosas por metaplasia colunar especializada (65).

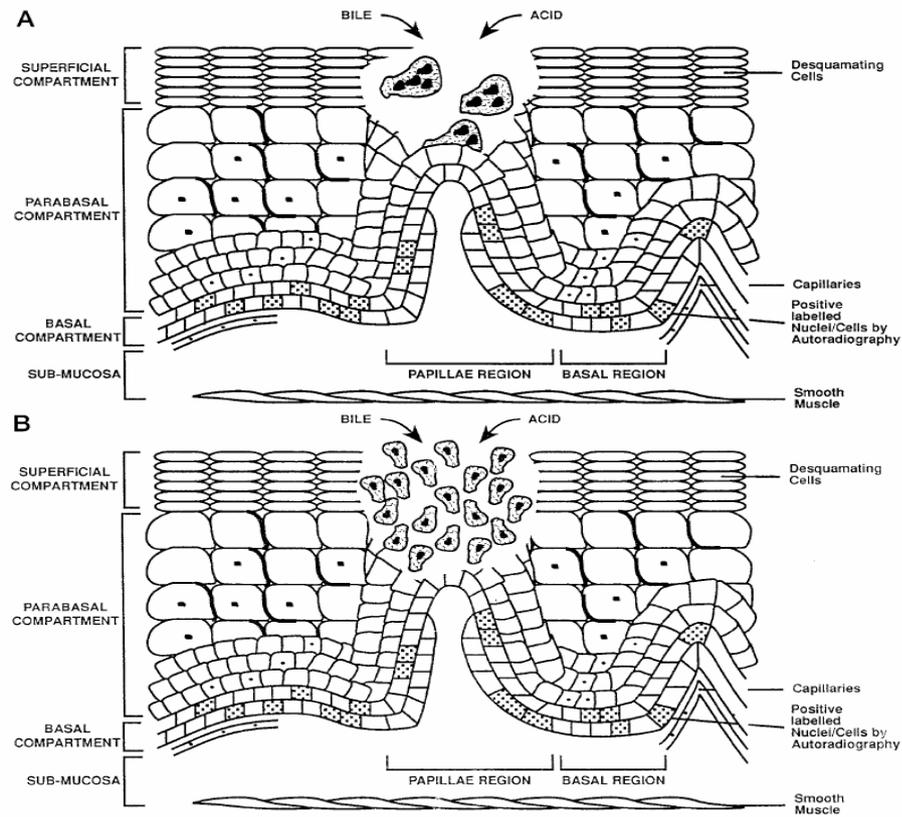


Figure 2. (Legend on next page)

Figura 2: Representação esquemática da adaptação que ocorre durante a evolução para a metaplasia. Os três compartimentos do epitélio do esôfago são representados. A parte inferior de cada figura mostra um compartimento contendo células tronco (nucleadas) e proliferativas. No centro, compartimento parabasal contendo células proliferativas. No topo, compartimento superficial contendo somente células diferenciadas maduras. A camada não inflamada é achatada enquanto que a camada inflamada sofre invaginações. A: dano às camadas superficiais e parabasais do esôfago. B: dano mais profundo envolvendo epitélio escamoso de células tronco (adaptado de Jankowski *et al.*, 1999) (52).

3. DISPLASIA

Entre o epitélio metaplásico e o adenocarcinoma se estabelece um espectro contínuo de lesões de caráter pré-neoplásico que se classificam, desde o ponto de vista histológico, de displasias de baixo e alto grau. Quanto mais severo o grau de displasia, maior a sua associação com adenocarcinoma (8,66).

Morfologicamente, displasia é caracterizada pela combinação de anormalidades estruturais, tais como enxertos, compactação e dobramento de glândulas e anormalidades citológicas, tais como hipercromasia nuclear e estratificação com nucléolos proeminentes e atividade mitótica (8,67). Pode ser entendida como um ou mais clones de células epiteliais que adquirem alterações genéticas que conferem maior propensão à malignidade (12).

A moderna classificação de Viena de displasia (resumidamente apresentada a seguir), baseada nas anormalidades presentes, permite graduá-la de acordo com o aumento da gravidade das lesões (8,68):

- 1) negativo para displasia
- 2) indefinido para displasia
- 3) displasia de baixo grau
- 4) displasia de alto grau

A distinção entre displasia de baixo grau e displasia de alto grau é feita microscopicamente de acordo com a severidade da arquitetura e as desordens celulares. A recomendação é a confirmação de ambas por biópsias e repetidas endoscopias (67). O diagnóstico da displasia aumenta em 3% por ano de idade dos pacientes e 14% por centímetro de displasia. Estes dados sugerem que estas duas características funcionem como fatores de risco independentes (28).

Uma vez que EB é diagnosticado, a progressão para displasia de alto grau pode ocorrer em 5% dos pacientes em 5 anos (se a displasia estiver ausente no início) e em 25% dos pacientes com displasia inicial de baixo grau (39).

A classificação e a graduação da displasia no trato gastrointestinal tem, historicamente, causado problemas aos patologistas, devido à baixa reprodutibilidade inter e intra-observador (67). É difícil distinguir displasia de baixo grau de atipia reacional na esofagite de refluxo e o significado clínico da displasia de baixo grau é incerto, assim como a regressão para metaplasia é

comum (41,66). Por este motivo, muitos investigadores preferem a avaliação citogenética, citometria de fluxo e biologia molecular à caracterização morfológica das alterações celulares. Estudos que avaliam o controle do ciclo celular, taxas de apoptose, aumento da atividade da telomerase e pesquisa de mutações em genes supressores tumorais têm sido utilizados.

4. NEOPLASIA ESOFÁGICA E O GENE p53

O desenvolvimento da neoplasia no EB é um processo de múltiplos estágios, onde um estímulo ambiental e a predisposição genética resultam em instabilidade genômica. Células com múltiplas anormalidades genéticas resultam em clones com erros genéticos acumulados. Alguns clones adquirem vantagem proliferativa e podem desenvolver a capacidade de invasão, resultando em neoplasia (69).

Numerosos estudos mencionam as alterações moleculares relacionadas com a seqüência metaplasia-adenocarcinoma enquanto que poucos relacionam a interação entre fatores moleculares e o desenvolvimento de alterações anteriores à metaplasia intestinal (70,71,72).

A análise genética do EB e do adenocarcinoma revela que frequentemente são identificadas perdas cromossômicas (4q, 5q, 9p e 18p), ganhos cromossômicos (8q, 17q e 20q) e eventualmente amplificações (7, 8 e 17q) (23).

Em 1994, Neshat *et al.* descreveu as alterações moleculares associadas a neoplasias de esôfago. As mutações no gene supressor tumoral p53 foram as anormalidades mais comumente descritas. A incidência de mutações tende a aumentar com a progressão metaplasia-displasia-adenocarcinoma, passando de raras no epitélio não displásico até 90% no adenocarcinoma (28,73).

O gene p53 (TP53), descoberto em 1979 por Lane e Crawford, tem 20 Kb e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (39,74). É formado por 11 éxons que codificam uma fosfoproteína de 393 aminoácidos (75,76,77). Funciona como gene supressor tumoral, agindo em conjunto com outros genes envolvidos na regulação do ciclo celular. O TP53 tem um papel chave no controle da proliferação celular, apoptose (morte celular programada), síntese e reparo de DNA (78). Desempenha ainda papel importante na angiogênese por regular a expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), aumentando a vascularização dos tumores e permitindo o desenvolvimento de metástases à distância (79).

Como resultado da expressão gênica, a proteína p53 (p53), está normalmente presente nas células em baixas concentrações e com uma meia-vida curta (2 a 15 minutos) (80). Em resposta ao estresse celular, devido ao dano do DNA, o TP53 é ativado por alterações conformacionais e aumenta a transcrição do gene (81,82) levando ao aumento da meia-vida da proteína para horas (39).

Durante os anos 70, o TP53 foi inicialmente visto como um oncogene e, por volta de 1990, foi amplamente reconhecido como gene supressor tumoral estando mutado ou deletado em torno de 50% de todas as neoplasias humanas (78). Uma revisão de mais de 2500 tumores analisados para mutações no TP53, mostrou maior frequência destas alterações em tumores do pulmão (56%), cólon (50%), esôfago (45%), ovário (44%) e pâncreas (44%) (83). A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) apresenta resultados semelhantes (84).

Estudando-se a natureza e a frequência das mutações no TP53 pode-se revelar a possibilidade deste gene funcionar como fator etiológico na patogênese das neoplasias humanas (85). No carcinoma esofágico, existem

fortes evidências do envolvimento do TP53 para o prognóstico dos pacientes, reduzindo sua sobrevida (86).

Em uma revisão de publicações dos últimos 10 anos sobre as alterações do TP53 nas diferentes fases da progressão ao adenocarcinoma esofágico, Kubba *et al.*, 1999 sugeriu o aumento gradual na sua frequência, estando presente em 11,6% dos pacientes com metaplasia intestinal, 23,6% dos pacientes com EB com displasia de baixo grau, em 64,6% dos com EB com displasia de alto grau e 63,4% dos casos de adenocarcinoma (39). Uma correlação significativa entre a severidade da displasia e a expressão do TP53 foi observada (8,67). A importância do gene não se restringe somente às lesões anteriormente mencionadas, mas também a outras como ulcerações e necroses (87), além de ter sido associado ao desenvolvimento de aneuploidias (13,65).

5. O CICLO CELULAR E O GENE p53

O ciclo celular compreende eventos que ocorrem no núcleo entre as divisões celulares. Esta série de eventos está dividida em 4 fases: G1 (*first gap*), S (*DNA synthesis*), G2 (*second gap*) e M (*mitosis*). Próximo ao final da fase G1 existe um ponto denominado ponto R (*restriction point*) onde mecanismos celulares determinam se a célula entrará na fase S e completará o ciclo, ou sairá do ciclo entrando numa fase quiescente G0. O retinoblastoma (Rb) é a molécula que realiza o controle do ponto R (65). Quando ativo, bloqueia o avanço através da fase S pela não ativação dos fatores de transcrição gênica (FT) (83).

Uma das funções do gene p53 no ciclo celular é manter a célula na fase G1 através do ativando as funções do Rb (65). Isto proporciona tempo para célula reparar possíveis danos no DNA que tenham acontecido no início da fase S do ciclo. Células que perdem esta capacidade do TP53, como as neoplásicas, sofrem instabilidade genômica com perda dos pontos de checagem durante a fase G1, culminando em amplificação gênica, aneuploidia e outras aberrações

cromossômicas. Na seqüência epitélio normal-metaplasia-neoplasia há mobilização das células da fase de G0 para G1 do ciclo celular, perda do controle da transição da fase G1/S e acúmulo das células na fase G2 (88). Estas anormalidades contribuem para a evolução clonal e progressão tumoral (39,89,90). Além disso, pontos de controle do ciclo celular existem na transição G1/S e G2/M e são regulados por ciclinas e quinases ciclina-dependentes (CDKs). O gene p53 faz o seqüestro das CDKs através do p21 (WAF-1) (13).

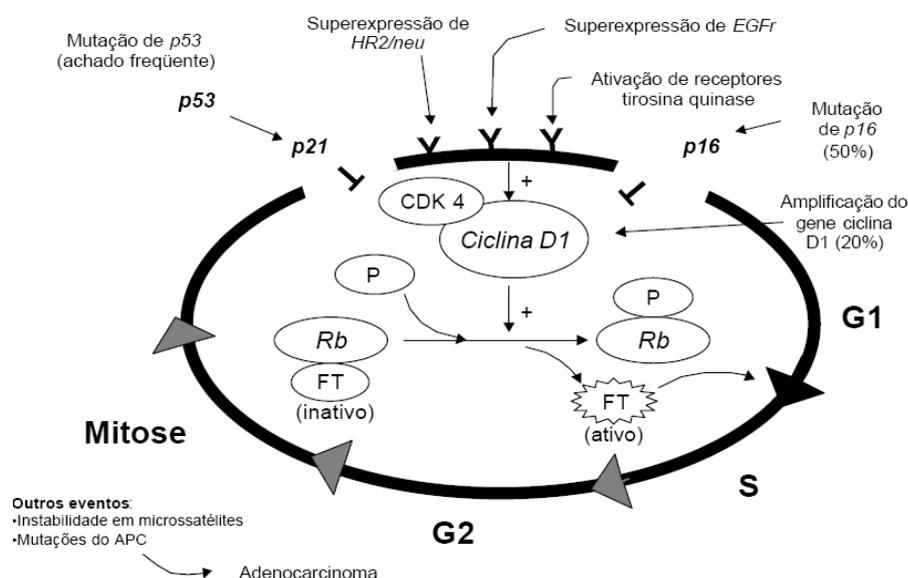


Figura 3: diagrama esquemático do ciclo celular abordando mecanismos e alterações genéticas envolvidos na carcinogênese esofágica (adaptado de Dillenburger *et al.*, 2001) (83).

6. ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GENE p53

Anormalidades envolvendo o TP53 são comuns em adenocarcinoma de esôfago e têm sido detectadas em tecidos pré-malignos que circundam a neoplasia esofágica (91,92).

6.1 Instabilidade Genômica (Aneuploidia): em células humanas normais, a taxa de mutação no DNA é muito baixa e, por esta razão, não apresentam a possibilidade de progredir para a neoplasia. No caso das células pré-

neoplásicas, o genoma das células se torna instável, o que reflete mutações no DNA ou anormalidades no conteúdo cromossômico resultante de deleções ou duplicações (65). A modificação no conteúdo do DNA celular, resultante de uma divisão celular descontrolada é chamada de aneuploidia.

Muitos estudos têm demonstrado aneuploidia em pacientes com EB (93). A prevalência destas alterações eleva-se com o aumento do risco histológico de malignidade e múltiplas aneuploidias são associadas com displasia de alto grau e adenocarcinoma (92). Desta maneira, aneuploidias podem prever o risco de progressão para displasia de alto grau e adenocarcinoma (1).

Dados indicam que alterações no TP53 precedem o desenvolvimento de aneuploidias no EB indicando a importância do gene na manutenção da estabilidade do genoma (94). Alterações no TP53 são mais prevalentes em pacientes com aneuploidias, porém podem ocorrer em sua ausência (91).

6.2 Instabilidade microsatélite: são alterações em regiões do genoma constituídas de seqüências curtas de nucleotídeos repetidos (95). Em tecidos malignos, a rápida proliferação celular resulta em erros de replicação do DNA e em variação no tamanho da seqüência microsatélite (41).

A instabilidade microsatélite ocorre em 13-35% dos adenocarcinomas provenientes de EB e pode se desenvolver como um evento anterior a aneuploidia (52). Tem sido identificada tanto no adenocarcinoma como na metaplasia e displasia (41).

6.3 Perda de Heterozigidade (*Loss of heterozygosity* - LOH)

Na maioria destas alterações, nas quais a mutação é recessiva, as células tumorais frequentemente retêm somente o alelo mutado e perdem o selvagem, enquanto que o sangue mantém ambos os alelos. A esse processo se

dá o nome de perda de heterozigozidade (LOH) (96). A perda do efeito protetor do gene supressor tumoral acontece se ambos os alelos forem eliminados. A presença de um alelo normal é suficiente para prevenir a carcinogênese. Um alelo mutante só produzirá fenótipo alterado caso o outro alelo seja perdido ou mutado (97). Dessa forma, o tecido tumoral pode ser comparado com o sangue periférico que irá apresentar os dois alelos (selvagem e alterado), sendo esta mais uma forma de observar alterações na proteína em tecidos (96).

Deleções localizadas, acompanhadas de perda de cromatina, resultante de quebra no DNA de fita simples e dupla, conversão gênica, recombinação, translocação, não-disjunção cromossômica com duplicação do cromossomo remanescente são os principais eventos que levam à LOH (98).

Perda alélica do 17p no TP53 tem sido detectada em estágios iniciais de metaplasia e displasia, levando a aneuploidia e sugerindo que a inativação do TP53 seja um passo inicial na carcinogênese (65,92).

Perda de heterozigozidade tem sido observada em 75 a 80% dos adenocarcinomas esofágicos, 79% das displasias de alto grau, 42% das displasias de baixo grau e em 14% dos EB (99). A completa perda do TP53 selvagem dentro da célula raramente ocorre como resultado de deleção homozigótica ou uma mutação dupla. Quando tecidos de EB com LOH no 17p são examinados, 95 a 100% dos casos apresentam mutações no TP53, enquanto que pacientes sem LOH do gene ainda carregam um alelo mutado. Isto sugere que uma mutação em um alelo do gene p53 provavelmente ocorra primeiro, seguido por perda alélica de um segundo alelo durante a progressão neoplásica, resultando em um fenótipo nulo que pode promover tumorogênese no EB (41,99).

Mutações *missense* são o mecanismo primário de inativação alélica e o gene p53 foi confirmado como o principal alvo desta inativação, seguido de LOH funcionando como o principal mecanismo de predisposição genética para o

desenvolvimento de câncer (98). Galipeau *et al.*, 2004 conduziu um estudo com 270 pacientes com EB no qual foram avaliadas mutações nos genes p53 e p16 e perda de heteroziguidade do 17p e 9p. Com exceção das mutações do gene p16, todas contribuíram para o desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago (100).

6.4 Mutações (Pereira *et al.*, 2001) (101)

Uma mutação é uma mudança na estrutura primária do DNA, que consiste de uma seqüência linear de pares de nucleotídeos, representando a informação química armazenada. O efeito de uma mutação no fenótipo de organismo varia do “trivial” ao “letal”, dependendo da propriedade da proteína codificada pelo gene alterado e como aquela alteração afeta o desenvolvimento e a manutenção do nosso corpo.

As mutações podem ser germinativas, quando ocorrem em células germinais que são aquelas destinadas a se tornarem ovo ou esperma. Estas mutações não afetam as pessoas nas quais ocorrem, mas podem ser transmitidas e causar danos em futuras gerações. As mutações somáticas, por outro lado, ocorrem em células do corpo (fígado, pulmão, intestino, esôfago etc) e podem afetar o fenótipo do seu portador, mas não são transmitidas para seus descendentes. Esta classe de mutações é a mais envolvida no desenvolvimento de neoplasias.

Sejam germinativas ou somáticas, em nível molecular as alterações genéticas podem ser:

1. *Missense* (ou de sentido trocado): existe a troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando também a troca de um aminoácido. Cerca de 73% das substituições de base nas regiões codificantes dos genes são mutações *missense*. Pode ocorrer também a troca de um nucleotídeo sem alteração do

aminoácido. Neste caso, a mutação é chamada silenciosa e não tem consequência fenotípica;

2. *Nonsense* (ou sem sentido): troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando a troca de um aminoácido por um códon de parada. Têm o efeito de parar a tradução da proteína prematuramente, produzindo um polipeptídeo mais curto, muitas vezes chamado de proteína truncada. Em torno de 4% das substituições de base são do tipo *nonsense*.

3. *Splicing* (mutações em sítio de processamento de RNA): são mutações de ponto presentes nas junções entre íntron e éxon. Alteram o processamento do RNA de modo que as regiões correspondentes aos íntrons não são retiradas da molécula de maneira apropriada. Na maioria dos casos, ocorre a utilização de um sítio de *splicing* alternativo que pode estar localizado dentro do próprio éxon ou em um íntron anterior ou subsequente;

4. Inserções: podem ser pequenas, isto é, inserção de um ou mais pares de base, podendo ser também definidas como mutações *frameshift* ou mutações de mudança de quadro de leitura. Estas não apenas alteram o códon onde ocorrem como também mudam o quadro de leitura (*reading frame*), fazendo com que as unidades codificantes sejam modificadas daquele ponto em diante. Quando isto ocorre, geralmente há a formação de um códon de parada prematuro, causando um efeito similar ao das mutações *nonsense*. Alternativamente, elas podem não modificar o quadro de leitura, se a inserção for de três pares de bases, ocasionando a introdução de um novo aminoácido na proteína mutante;

5. Deleções: podem ser pequenas ou grandes. As pequenas deleções (um ou mais pares de bases) também podem causar *frameshift* (mutações de mudança do quadro de leitura) ou não alterar o quadro de leitura da proteína (se for uma deleção de três pares de bases). As grandes deleções podem causar a

retirada de um ou mais éxons ou de todo o gene. Geralmente estão associados a fenótipos mais graves, já que o efeito na proteína é bastante drástico.

6. Inversões: são causadas por rearranjos na estrutura do gene, ocasionados por recombinação da seqüência dos nucleotídeos dentro da estrutura gênica. Normalmente, provocam uma grande alteração no fenótipo do paciente.

Alterações foram encontradas em 40 a 50% de todas as neoplasias esofágicas, mais frequentemente mutações do tipo *missense* (50 a 80%), seguidas de mutações *nonsense* (10 a 50%) e de deleções e inserções (102). A maioria das mutações no TP53 em adenocarcinoma de esôfago são transições do tipo G:C para A:T, 89% das quais ocorrem em dinucleotídeos CpG *hotspot* (códon 175, 176, 196, 213, 245, 248, 273 e 282) (40,74,84,99,103). Estes achados sugerem que a metilação do CpG desempenhe um importante papel no desenvolvimento de mutações em TP53 no adenocarcinoma associado ao EB (75,89,90,99,104).

Invariavelmente, as mutações localizam-se entre os éxons 5 a 8 que contém o domínio de ligação do DNA com a proteína p53 (22,40,74,102,105). Mutações nas regiões flangeadoras nos éxons 5 a 8 são raras, embora possam ser biologicamente significantes (24,106).

O adenocarcinoma de esôfago é o tipo de neoplasia que apresenta uma das maiores proporções das mutações citadas anteriormente (80). Estas alterações não estão correlacionadas com os parâmetros clínicos-patológicos tais como invasão tumoral, metástases em linfonodos, veias e linfa, o que sugere que estejam ligadas somente aos estágios pré-invasivos (107).

6.5 Polimorfismos

Constituem variações genéticas encontradas em pelo menos 1% dos indivíduos de uma amostra populacional aleatória. O tipo de polimorfismo mais

comum é o *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP, no qual a variação ocorre em um único nucleotídeo. Considera-se que o grupo total de SNPs de um indivíduo é um fator contribuinte para as predisposições genéticas (108). Os polimorfismos são relativamente comuns na população e, portanto, podem conferir um risco atribuível na população geral maior do que as raras mutações que ocorrem em genes de susceptibilidade com alta penetrância (109), sendo possível identifica-los pelo uso de enzimas de restrição (96,110,111).

Além de mutações associadas ao adenocarcinoma, em torno de 20 polimorfismos foram descritos no TP53, localizados tanto em regiões codificantes quanto em não codificantes do gene (84). A maioria dos polimorfismos encontrados no gene p53 está localizada em íntrons, fora da região consenso de sítios de *splicing* (74).

A presença do polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 apresenta uma freqüência de torno de 65% em pacientes com neoplasias esofágicas. Este polimorfismo envolve a substituição de uma arginina por uma prolina, porém sua relação com a carcinogênese ainda é controversa (96,112). Vários estudos têm investigado a associação deste polimorfismo com o aumento do risco para desenvolvimento de neoplasias relacionados ou não à infecção por HPV (*Humman Papilloma Vírus*) (74,113).

O polimorfismo do códon 213 (R213R), localizado no éxon 6 e o polimorfismo 13494 g ->a no íntron 6 são pouco citados em literatura, e suas freqüências na população brasileira não foram estimadas. O polimorfismo R213R mantém o aminoácido arginina, sendo o códon mais freqüente a CGA e o polimórfico CGG. O polimorfismo na região 13494 do íntron 6 mostra uma adenina no lugar de guanina. Para ambos, ainda não foram encontradas quaisquer diferenças fenotípicas (84).

7. TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GENE p53

Inúmeras metodologias são empregadas para realizar *screening* das mutações no gene p53, incluindo técnicas moleculares e imunohistoquímicas (82). A análise de polimorfismo de cadeia simples (*Single-strand Conformation Polymorfism* - SSCP), eletroforese em gradiente de desnaturação e análise de polimorfismos por enzimas de restrição são exemplos de técnicas moleculares utilizadas. O sequenciamento de DNA ainda é necessário para confirmar a localização específica e a natureza da mutação do gene (81).

As técnicas moleculares são mais sensíveis e específicas do que as imunohistoquímicas (82). Apesar de mais sensíveis, resultados falso-negativos podem acontecer caso a proporção de células tumorais mutadas na amostra seja muito baixa (81).

7.1 Extração de DNA

Todos os protocolos de extração de DNA baseiam-se no rompimento da membrana nuclear, separação do DNA das proteínas através de precipitação e posterior solubilização do DNA em solução aquosa.

O DNA pode ser obtido a partir de qualquer tecido que contenha células nucleadas. Materiais provenientes de biópsias de pacientes e células em cultura são utilizados como fonte de obtenção de DNA, especialmente em estudos de neoplasias, em que tecidos específicos podem apresentar diferenças na constituição do material genético com relação ao DNA do resto do corpo (101).

7.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) é uma técnica rápida de amplificação *in vitro* de um seqüência específica do DNA genômico (ou RNA, seguido de uma transcrição reversa) entre uma região 5' e 3'

flanqueada por *primers*, complementares a uma das fitas de DNA (82). Permite a síntese enzimática de seqüências específicas gerando até 10^9 cópias a partir de uma única molécula alvo (101).

O resultado desta amplificação é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5´ dos *primers* (101).

O gene p53 tem 11 éxons e as mutações estão distribuídas ao longo desta região, embora estejam principalmente concentradas entre os éxons 5 e 8. Cada éxon pode ser amplificado separadamente utilizando *primers* específicos ou através de uma reação única que amplifica a região compreendida entre estes 4 éxons (82).

7.3 Eletroforese

A eletroforese, técnica utilizada para separação de fragmentos de DNA, é utilizada para análise de resultados de vários procedimentos laboratoriais, como extração de DNA, PCR e digestão com enzimas de restrição. Consiste na aplicação de uma corrente elétrica por uma fase semi-móvel (suporte), promovendo a migração de moléculas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular. A escolha do tipo (gel de agarose ou poliacrilamida) e da concentração do suporte depende do tamanho dos fragmentos que se deseja separar e da necessidade da resolução dos mesmos. A corrente elétrica é conduzida por um tampão salino, em geral TAE (Tris-Acetato-EDTA) ou TBE (Tris-Borato-EDTA). O tempo de migração também varia com o tamanho do fragmento que se deseja visualizar, utilizando-se, como referência, os chamados “marcadores de peso molecular” para estimativa do tamanho do fragmento visualizado (101).

7.4 Digestão com Endonucleases de Restrição

São enzimas de clivagem do DNA que reconhecem seqüências curtas de bases e fazem um corte na dupla hélice do DNA. Cada enzima reconhece apenas um tipo de seqüência específica. Algumas cortam a molécula produzindo pontas retas, enquanto outras cortam entre as mesmas duas bases, mas fora de ponto de simetria, produzindo pontas desiguais.

No caso de detecção de mutações de ponto, utiliza-se uma enzima que tem seu padrão de corte alterado pela mutação, isto é, um sítio de restrição é criado ou abolido para determinada enzima. É preciso antes conhecer o padrão de restrição do fragmento de PCR e sempre realizar controles positivos e negativos (101).

7.5 Sequenciamento

O sequenciamento de DNA é um método que determina a seqüência de nucleotídeos em um produto de PCR (82). O sequenciamento direto de DNA é considerado o “padrão-ouro” para a definição da seqüência de uma alteração de DNA (101).

O método de sequenciamento automatizado consiste no anelamento do *primer* com desnaturação da dupla fita e conseqüente extensão do oligonucleotídeo pela *Taq DNA polimerase* com a incorporação de nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos e exposição a um feixe de luz (82).

Este método apresenta vantagens como facilidade de execução e pequeno número de passos intermediários, facilidade de identificação de polimorfismos e mutações e eliminação de estruturas secundárias de DNA. Entretanto, a baixa reprodutibilidade entre os resultados é a principal desvantagem (82).

III. OBJETIVOS

Artigo 1

1. Padronizar a identificação do polimorfismo R72P do éxon 4 do gene p53;
2. Estimar a frequência desse polimorfismo em uma população controle representativa da população de Porto Alegre, e verificar a associação entre a frequência deste polimorfismo para controles e pacientes portadores de Esôfago de Barrett.

Artigo 2

1. Padronizar a técnica de amplificação dos éxons 5 a 8 do gene p53 em um só produto de PCR;
2. Padronizar a identificação dos polimorfismos R213R e 13494g->a no éxon 6 e íntron 6, respectivamente, do gene p53;
3. Estimar a frequência desses polimorfismos em uma população controle representativa da população de Porto Alegre, e em pacientes com esofagite, metaplasia intestinal da cárdia e Esôfago de Barrett;
4. Verificar a ocorrência de perda de heterozigotidade em amostras de pacientes com os três tipos histológicos;
5. Montar um haplótipo para pacientes com esofagite, metaplasia intestinal da cárdia e Esôfago de Barrett relacionando os polimorfismos R72P, R213R e 13494g->a.

Artigo 3

1. Identificar as principais alterações moleculares presentes nos éxons 5 a 8 do gene p53 em pacientes com metaplasia intestinal da cárdia e Esôfago de Barrett através da técnica de sequenciamento direto do DNA.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus*. 1999; 12:177-180.
2. Paull A, Trier JS, Dalton MD. This histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Eng J Med*. 1976; 295:476-480.
3. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition: report on 140 cases of Barrett's Esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975; 70: 826-834.
4. Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH. Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus. *Am J Clin Pathol*. 1978; 70:1-5.
5. Watson A, Sampliner RE, Appelman HD, Spechler SJ, Shepherd NA. The definition of "Barrett's Esophagus". In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus*. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 1-4.
6. Schnell TG, Sontag SJ, Chejfec G. Adenocarcinoma arising in tongues or short segments of Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci*. 1992; 37:137-143.
7. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's Esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery*. 1970; 68:209-216.
8. Fléjou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut*. 2005; 54 (suppl I):i6-i12.
9. Shaheen N, Ransohoff D. Gastroesophageal reflux, Barrett's Esophagus and esophageal cancer. *JAMA*. 2002; 287(15): 1972-1981.
10. Haggitt RC. Barrett's Esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Human Pathol*. 1994; 25(10):982-993.
11. Kyrgidis A, Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. New molecular concepts of Barrett's Esophagus: clinical implications and biomarkers. *J Surg Res*. 2005; 125: 189-212.
12. Spechler SJ. Barrett's Esophagus. *N Eng J Med*. 2002; 346(11): 836-842
13. Lin J, Beer DG. Molecular biology of upper gastrointestinal malignancies. *Seminars in Oncol*. 2004; 31(4):476-486.
14. Tanriere P, Martel-Planche G, Maurici D, Lombard-Bohas C, Scoazec JY, Montesano R, et al. Molecular and clinical differences between adenocarcinomas of the esophagus and the gastric cardia. *Am J Pathol*. 2001; 158(1):33-40.

15. Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, Chandrasoma P, Hagen JA, Ireland AP, et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg.* 1997; 226:522-532.
16. Chandrasoma . How to define cardiac mucosa? Can it be found in patients without gastroesophageal reflux disease? Can it be considered as a pre-Barrett change? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 100-103.
17. Lauwers GY, Shimizu M, Correa P, Riddell RH, Kato Y, Lewin KJ, et al. Evaluation of gastric biopsies for neoplasia: differences between Japanese and Western pathologist. *Am J Surg Pathol.* 1999; 23:511-518.
18. Chandrasoma PT, Der R, Ma Y. Histology of the gastroesophageal junction. An Autopsy Study. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24: 402-409.
19. Chandrasoma PT, Lokuhetty DM, DeMeester TR. Definition of histopathologic changes in gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24:344-351.
20. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus – Fifty years of controversy. *Ann Surg.* 2000; 231(3):303-321.
21. Koppert LB, Wijnhoven BPL, Dekken HV, Tilanus HW, Dinjens WNM. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2005; 92:169-190.
22. Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RNK. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (Índia): a high-incidence area. *Int J Cancer.* 2005; 116: 3-7.
23. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(23): 2241-2252.
24. Shaheen N, Ransohoff D. Gastroesophageal reflux, Barrett's esophagus and esophageal cancer. *JAMA.* 2002; 287 (15):1972-1981.
25. INCA Homepage – Instituto Nacional de Câncer [periódico da Internet] 2005 [acesso 15 dezembro 2005] Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
26. Villwock, MM. Prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p21 em adenocarcinoma do esôfago. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
27. Lagergren J. Adenocarcinoma of oesophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? *Gut.* 2005; 54 Suppl I: i1-i5.
28. Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2005; 166: 35-46
29. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA.* 1991; 265:1287-1289.

30. Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: na update. *JAMA*. 1993; 270:1320.
31. Dietz J, Meurer D, Maffazzoni A, Furtado AD, Prolla JC. Intestinal metaplasia in the distal esophagus and correlation with symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Dis Esoph*. 2003; 16: 29-32.
32. Moreira LF, Tiburi MF. Lesões pré-malignas do esôfago e câncer precoce: considerações sobre o tratamento. *Revista HCPA*. 2001; 21(1):73-82.
33. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined Barrett's Esophagus. Comparison of populations-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol*. 1990; 99:918-922.
34. Cameron AJ. What is the prevalence of long segment Barrett's Esophagus? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus*. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 60-62.
35. Playford R. The value of surveillance and other unresolved issues in the management of Barrett's Esophagus. *Medscape* [periódico da Internet] 2005 [acesso em 24 Abril 2005]. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/499714>
36. Trudgill NJ, Suvarna SK, Royds JA, Riley SA. Cell cycle regulation in patients with intestinal metaplasia at the gastro-oesophageal junction. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 313-317.
37. Boulton RA, Usselman B, Mohammed I, Jankowski J. Barrett's Esophagus: environmental influences in the progression of dysplasia. *World J Surg*. 2003; 27: 1014-1017.
38. Wang KK. Barrett's Esophagus, current and future management. *Compr Ther*. 1994; 20:36.
39. Kubba AK, Poole NA, Watson A. Role of p53 assessment in management of Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci*. 1999; 44(4): 659-667.
40. Wang LD, Zheng S, Zheng, ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(6): 1156-1164.
41. McManus DT, Olaru A, Meltzer S. Biomarkers of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Can Res*. 2004; 64:1561-1569.
42. Liebermann DA, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's Esophagus in community-based practice. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92: 1293-1297.
43. Waring, JP. Are there ethnic differences in the prevalence of Barrett's Esophagus? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus*. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 39-41.
44. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*. 1998; 83:2049-2053.

45. Cameron AJ. Can a familial prevalence of Barrett's esophagus be demonstrated? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. Barrett's Esophagus. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 35-38.
46. Romero Y, Cameron AJ, Locke III GR, Schaid DJ, Slezak JM, Branch CD, et al. Familial aggregation of gastroesophageal reflux in patients with Barrett's Esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol.* 1997; 113: 1449-1456.
47. Trudgill NJ, Kapur KC, Riley SA. Familial clustering of reflux symptoms. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94: 1172-1178.
48. Crabb DW, Berk MA, Hall TR, Conneally PM, Biegel AA, Lehman GA. Familial gastroesophageal reflux and development of Barrett's Esophagus. *Ann Int Med.* 1985; 103:52-54.
49. Carre IJ, Johnston BT, Thomas BS, Morrison PJ. Familial hiatal hernia in a large five generation family confirming true autosomal dominant inheritance. *Gut.* 1999; 45:642-649.
50. Jochem VJ, Fuerst PA, Fromkes JJ. Familial Barrett's Esophagus associated with adenocarcinoma. *Gastroenterol.* 1992; 102:1400-1402.
51. McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanism of oesophageal cancer. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5:1113-1130.
52. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol.* 1999; 154(4):965-973.
53. Buttar NS, Wang KK. Mechanism of disease: carcinogenesis in Barrett's Esophagus. *Nature Clin Practice Gastroenterol & Hepatol.* 2004; 1:106-112.
54. Moraes F^o JP, Hashimoto CL. I Consenso Brasileiro da Doença de Refluxo Gastroesofágico. Proceedings of the Congresso Brasileiro de Gastroenterologia. 2000; Foz do Iguaçu, Brasil.
55. Fitzgerald RC, Lascar R, Triadafilopoulos G. What is known about the pattern of acid exposure differentiation in Barrett's Esophagus? What is the significance of microvilli formations? What is the relationship between cell differentiation and proliferation? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. Barrett's Esophagus. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 177-179.
56. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's Esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest.* 1996; 98:2120-2128.
57. Champion G, Richter JE, Vaezi MF, Singh S, Alexander R. Duodenogastroesophageal reflux: relationship to pH and importance to Barrett's Esophagus. *Gastroenterol.* 1994; 107:747-754.
58. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, Hennessy TP. Barrett's Esophagus: pH profile. *Br J Surg.* 1987; 74:774-776.

59. Oberg S, DeMeester TR, Peters JH, Hagen JA, Nigro JJ, DeMeester SR, et al. The extent of Barrett's esophagus depends on the status of the lower esophageal sphincter and the degree of esophageal acid exposure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 117:572-580.
60. Genta RM. What is the role of *Helicobacter pylori* in intestinal metaplasia above, below and at the gastresophageal junction? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 252-255.
61. Sharma P. Clinical Challenges in Barrett's Esophagus. *Medscape* [periódico da Internet] 2005 [acesso em 24 Abril 2005] Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/480236>
62. Bowrey DJ, Clark GWB. In patients with Barrett's Esophagus, what is the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the antrum? In the cardia? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 249-251.
63. Ellis FH. Is preexisting gastroesophageal reflux necessary for the development of Barrett's Esophagus in patients with achalasia? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 274-278.
64. MacKay CK, Stuart RC. Are chromosomal alterations observed in non-dysplastic Barrett's mucosa? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 132-136.
65. Feagins LA, Souza RF. Molecular targets for treatment of Barrett's Esophagus. *Dis Esophagus.* 2005; 18:75-86.
66. Dolan K, Walker J, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esophagus.* 2003; 16:83-89.
67. Sanders DSA, Taniere P, Harrison RF, Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's Esophagus. *Curr Diag Pathol.* 2003; 9:235-241.
68. Lee JR. What Is the best marker of potential dysplastic changes in Barrett's epithelium? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 300-303.
69. Blount PL, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Reid BJ. Barrett's adenocarcinoma arises within a single aneuploid population. *Gastroenterol.* 1990; 98:A273.
70. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine CS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterol.* 1992; 102: 1212-1219.

71. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's Esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol.* 1987; 93:1-11.
72. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's Esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest.* 1989; 60:65-71.
73. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC. Barrett's Esophagus: a model of human neoplastic progression. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1994; 59:577-583.
74. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: current knowledge and perspectives. *Mut Res.* In press 2005.
75. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000; 77:81-137.
76. Smith ML, Fornace AL. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol.* 1995; 7(1):69-75.
77. Chang F, Syrjanen K. Implications of p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol.* 1995; 13(4):1009-1022.
78. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacol Sci.* 2004; 25(4):177-181.
79. Rosa, ARP. Valor prognóstico das expressões da proteína p53 e do fator de crescimento do endotélio vascular em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à esofagectomia. [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
80. Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125:1121-1131.
81. Evans SC, Casson AG. How can the contradictory findings of p53 gene mutation be explained? Can differences in technique be sufficient reason? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 397-400.
82. Mukhopadhyay T. Detection of mutations in tumor suppressor genes. *Methods.* 1995; 8:170-181.
83. Dillenburg CF, Moreira LF. Biologia molecular dos tumores do trato digestivo. *Revista HCPA.* 2001; 21(1):59-70.
84. IARC Homepage – International Agency for Research no Cancer – p53 polymorphisms [Periódico da Internet] 2005 [acesso 23 abril 2005] Disponível em: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>

85. Geboes K. Does staining for p53 improve the histologic diagnosis of any epithelial abnormality in Barrett's mucosa? In: Giulini R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editors. Barrett's Esophagus. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 391-393.
86. Casson A, Tammermagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophagus cancer: association with clinical/pathological features, risk factors and survival. *Mol Pathol.* 1998; 51:71-79.
87. Aujeský R, Hajdúch M, Neoral C, Král V, Lubusská L, et al. p53- prognostic factor of malignant transformation of Barrett's Esophagus. *Biomed Papers.* 2005; 149(1):141-144.
88. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's Esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol.* 1993; 105:119-129.
89. Ortiz-Hidalgo. The histopathology and biologic prognostic factors of Barrett's Esophagus. *J Clin Gastroenterol.* 1998; 26(4):324-333.
90. Harris CC, Holstein M. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med.* 1993; 329:1318-1327.
91. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. P53-mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Res.* 1999; 59:4784-4787.
92. Reid B, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, et al. Predictors of progression in Barrett's Esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96(10): 2839-2848.
93. Blount PL, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Levine DS, Yin J, et al. 17p allelic losses in diploid cells of patients with a Barrett's Esophagus who develop aneuploidy. *Cancer Res.* 1994; 54:2292-2295.
94. Reid BJ. Barrett's Esophagus: ordering the events that lead to cancer. *Eur J Cancer Prev.* 1996; 5:57-65.
95. Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Recent developments in the molecular characterization of Barrett's Esophagus. *Dig Dis.* 1998; 16:63-80.
96. Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Lett.* 2003; 189:91-96.
97. Ireland AP, Clarck GWB, DeMeester TR. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg.* 1997; 225(1):17-30.
98. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14:65-72

99. Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, et al. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2003; 89:1729-1735.
100. Galipeau PC, LI X, Longton G, Sanchez C. A panel of molecular and cytometric markers in Barrett's esophagus (BE) predicts progression to esophageal adenocarcinoma (EA). *Gastroenterol*. 2004; 126(suppl 2):A-114
101. Pereira MLS, Leistner S, Matte U. Protocolos laboratoriais de análise molecular para investigação de doenças genéticas. *Revista HCPA*. 2001; 21(3):321-328.
102. Pütz A, Hartmann A, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer*. 2002; 98:99-105.
103. Soussi T, Bérout C. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mut*. 2003; 21:192-200.
104. Ramel S. How to treat a Barrett patient with a p53 mutation and no evidence of invasive carcinoma? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus*. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 401-404.
105. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis*. 1999; 14:229-233.
106. 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 Gen Cytogen*. 2003; 140:20-30.
107. Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992; 4:1-15.
108. Louro ID, Melo MSV, Galeotti S. Conceitos gerais. In: Louro ID, Llerena Jr. JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann G, Confronti-Froes N, editores. *Genética molecular do câncer*. São P: MSG Produção Gráfica; 2000. P 11-24.
109. Rocha AP. Avaliação de polimorfismos no proto-oncogene Ret em pacientes com carcinoma medular de tireóide. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
110. Olschwang S, Laurent-Puig P, Vassal A, Salmon R, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the TP53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet*. 1991; 86:369-370.

111. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandios DA. P53 codon 72 polymorphism and association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002; 179:175-183.
112. Guimaraes DP, Lu SH, Snijders P, Wilmotte R, Herrero R, Montesano R, et al. Absence of association between HPV DNA, TP53 codon 72 polymorphism and risk of oesophageal cancer in a high-risk area of China. *Cancer Lett.* 2001; 162:231-235.
113. Chang CC, Hsieh YY, Tsai FJ, Tsai CH, Tsai HD, Lin CC. The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis. *Fertility and Sterility.* 2002; 77(1):43-45.

V. ARTIGO 1

VERSÃO EM PORTUGUÊS

Artigo submetido no periódico ***Cancer Genetics and Cytogenetics***,
em dezembro de 2005, conforme Anexo II.

Aceito sob número **MM-4964-05** em 29/03/2006

**Análise do polimorfismo R72P do gene p53 em indivíduos brasileiros com
Esôfago de Barrett e controles**

Sandra Leistner Segal¹; Diogo André Pilger²; Ana Paula Bohn Kaspar¹; Patrícia Lopez¹;
Fábio Segal³.

1. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
3. Instituto do Aparelho Digestivo (IAD)

Título abreviado: polimorfismo R72P do p53 em Esôfago de Barrett

Correspondência para o autor:

Sandra Leistner, PhD
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-2101-8011
Fax: +55-51-2101-8010
E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Objetivo: Analisamos o polimorfismo Arg72Pro no éxon 4 do gene p53, o qual pode ser relacionado ao aumento da suscetibilidade a vários tipos de câncer. Vinte e três pacientes diagnosticados com Esôfago de Barrett e 80 indivíduos controles oriundos do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram analisados. O protocolo incluiu extração do DNA do sangue e tecido, seguido de reação em cadeia da polimerase com amplificação do éxon 4. O polimorfismo foi analisado com a enzima de restrição *Acc II*.

Resultados: A proporção de indivíduos que foram homozigotos para Arginina72, homozigotos para Prolina72 e heterozigotos para ambos os alelos foi, respectivamente, 38.75%, 15.0% e 46.25% nos controles e 39.1%, 8.7% e 52.2% nos pacientes com Esôfago de Barrett.

Conclusões: Não há diferença significativa na distribuição genotípica entre pacientes com Esôfago de Barrett e controles. Entre os pacientes com Barrett analisados, foram encontrados um caso (8.33%) de perda de heterozigozidade (LOH) e 4 casos (22.2%) de instabilidade genômica, o que pode sugerir alguma associação entre estes eventos e o desenvolvimento de câncer.

Palavras-chave: p53, Esôfago de Barrett, polimorfismo Arg72Pro, análise molecular.

Introdução

Esôfago de Barrett (EB) é uma complicação da doença de refluxo gastroesofágica sendo uma desordem pré-maligna adquirida que predispõe ao desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago em 10% dos pacientes. Tem também sido utilizado como modelo para investigar a ordem dos eventos genéticos na progressão neoplásica [1].

Mutações somáticas no gene supressor tumoral p53 (TP53) são as alterações mais freqüentes nos cânceres humanos [2,3,4]. Mais de 90% das mutações descritas para o gene p53 ocorrem entre os exons 4 e 9, os quais contém o domínio II-V da proteína. Esta região é altamente conservada evolutivamente e envolve o domínio de ligação no DNA, essencial para a atividade do TP53 [5,6].

Mutações no gene p53 podem danificar o domínio de ligação com o DNA ou as funções de trans-ativação, por meio disso inibindo seu principal papel no controle do ciclo celular. Na maioria desses casos onde a mutação é recessiva, células tumorais retêm somente um alelo mutado e perdem o alelo selvagem, enquanto de células sanguíneas preservam ambos os alelos. Esta perda é chamada de perda de heterozigosidade (LOH – *loss of heterozygosity*) [7]. Regiões cromossômicas com freqüentes LOH podem indicar aqueles genes com maior suscetibilidade e ajudar a entender os eventos moleculares envolvidos na carcinogênese [8].

Durante a evolução do Esôfago de Barrett a adenocarcinoma, alterações genômicas numéricas e estruturais são observadas. A ausência de um denominador citogenético comum indica que um grande número de alterações genéticas que estão envolvidas na progressão para o adenocarcinoma [9].

Mutações no TP53 têm sido encontradas em mais de 25% dos pacientes com Esôfago de Barrett submetidos à endoscopia e em mais de 75% dos adenocarcinomas [10].

Além das mutações associadas ao câncer, no mínimo 20 polimorfismos já foram descritos no gene p53, tanto em regiões codificadoras como não codificadoras [11]. Entre elas, três foram descritas no éxon 4: R72P, codificando tanto para arginina (CGC) como para prolina (CCC) que parecem ser funcionalmente equivalentes [11], um polimorfismo silencioso no códon 36 (GCA ->CCA), com uma frequência de 4% [12] e P47S (CCG->TCG), com uma frequência de 1.5% [13]. O polimorfismo R72P tem sido muito estudado com respeito ao seu envolvimento com o aumento do risco para o desenvolvimento do câncer, mas os resultados são inconsistentes [14, 15, 16, 17]. Nosso estudo tem por objetivo estimar a frequência do polimorfismo R72P em indivíduos controles que representam a população de Porto Alegre e pacientes com Esôfago de Barrett de uma região ao sul do Brasil. Além disso, nós estudamos a associação potencial entre a frequência deste polimorfismo para os dois grupos. A análise de sangue e tecido obtido dos mesmos indivíduos permitiu analisarmos a existência de perda de heterozigidade nesta região do gene.

Materiais e Métodos

As amostras utilizadas consistiam de 80 controles não identificados obtidas do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 23 pacientes diagnosticados com Esôfago de Barrett, confirmados por endoscopia digestiva alta e biópsia.

Foram coletados 10mL de sangue periférico em EDTA dos controles e pacientes com EB e o DNA foi isolado utilizando procedimento de precipitação por sais descrito por Miller *et al.* (1998). Além disso, tecido do sítio da lesão foi obtido por biópsia no momento da endoscopia. O DNA foi extraído como

previamente descrito (18). Todos os procedimentos foram realizados com consentimento livre e esclarecido dos pacientes.

Amplificação do éxon 4 do gene p53 foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o PCR, utilizamos 0,2 mM de dNTP (Sigma), 5 µL tampão amônio (16mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris. HCL pH 8.8, and 0.1% Tween 20), 2UI de DNA Taq polymerase Gibco, 2mM MgCl₂, 20 pmoles dos *primers* específicos para o fragmento a ser amplificado, para um volume final de 50µL. A seqüência de *primers* utilizados foi:

FORWARD 5'AGGACCTGGTCCTCTGACTG3'

REVERSE 5'TCATGGAGCCAGCCCCTCA3'

As condições do PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, temperatura de anelamento de 55°C, 72°C de extensão e extensão final de 72°C por 10 min. O fragmento amplificado de 350 pb foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídio.

O produto de PCR foi digerido com 10U da enzima de restrição *AccII* (Amersahm Pharmacia Biotech), 3 µL de tampão (10mM Tris-HCl [pH7,5], 7mM MgCl₂, 60mM NaCl, 7mM 2-mercaptoetanol e 0,01% BSA), 10 µL do produto de PCR, além do dobro de volume de água para um volume final de 30µL. Os tubos foram então incubados a 37°C por 3 horas até completa digestão em banho seco. A reação de digestão foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 2.5% corado com brometo de etídio.

A enzima de restrição *AccII* reconhece o sítio de restrição CG ↓ CG, clivando o fragmento de 350pb em 191 pb e 159 pb, respectivamente, na presença do alelo arginina. O alelo prolina (CCG) não apresenta o sítio de restrição e então não é clivado, permanecendo com 350 pb.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste do Qui-quadrado de Person no programa EPI-INFO 6.1.

Resultados

1. Determinação da frequência do polimorfismo R72P

O DNA extraído de 80 indivíduos controles e 23 pacientes com EB foram analisados para determinar a frequência do polimorfismo R72P. Os dados foram analisados levando em consideração a frequência do genótipo (tabela 1) e dos alelos (tabela 2).

Na análise estatística, a frequência do genótipo encontrada para controles e pacientes não foi estatisticamente diferente ($p = 0,7208$).

A análise da frequência dos alelos arginina e prolina nos controles e pacientes também não mostrou diferença significativa ($p = 0,8103$).

2. Análise de perda de heterozigidade

Para este estudo, o DNA extraído do sangue e do tecido dos 23 pacientes com EB foram analisados. Somente indivíduos que apresentaram o padrão heterozigoto no sangue foram considerados para a análise ($n = 12$). Destes, somente um (8.33%) apresentou padrão homozigoto no tecido. O indivíduo que apresentou LOH no tecido tinha transição de heterozigidade para homozigidade para o alelo prolina (Figura 1).

Nós também observamos que 4 dos 11 pacientes com padrão homozigotos para prolina ($n = 2$) ou arginina ($n = 9$) no sangue, apresentaram padrão heterozigoto no tecido (22.2%), indicando ganho de um alelo e sugerindo a presença instabilidade genômica nesta região (Figura 2).

Discussão

Muitos estudos que relatam o polimorfismo R72P com vários tipos de carcinomas têm sido realizados, indicando-o como um potencial fator de predisposição do desenvolvimento de tumores. Esta predisposição associada com alguns fatores ambientais pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer em pessoas com genótipo suscetível.

A associação do polimorfismo no códon 72 do gene p53 com câncer cervical uterino relacionado ao papiloma vírus humano (HPV) tem sido estudada por muitos grupos com resultados contraditórios [15, 19]. Em 1998, Storey *et al.* [20] sugeriu que indivíduos homozigotos para arginina no códon 72 tinham, aproximadamente, um risco 7 vezes maior para câncer cervical associado ao HPV quando comparados com indivíduos heterozigotos, porque a proteína transportadora de arginina é significativamente mais suscetível à degradação do sorotipo E6 *in vivo* que a prolina. O polimorfismo R72P também tem sido correlacionado com câncer esofágico associado com HPV, sugerindo uma tendência de indivíduos homozigotos para arginina para o desenvolvimento de câncer em pacientes japoneses [21]. Soultzis *et al.*, 2002 publicou o primeiro estudo correlacionando o códon 72 do gene p53 com câncer de bexiga, dando evidências de que este polimorfismo está relacionado à carcinogênese do câncer de bexiga. O genótipo Arg/Arg tinha um risco aumentado de desenvolvimento deste tipo de câncer [14].

Aparentemente, entretanto, há poucos relatos relacionado este polimorfismo ao EB. Por outro lado, Guimarães *et al.*, 2001 indicou que o alelo mais comum na região central da China é o da prolina, ao contrário da maioria das populações testadas até o momento. Estes resultados indicam que o polimorfismo no códon 72 no TP53 não está associado com risco de câncer esofágico, mesmo associado à infecção por HPV [22].

Poucos estudos demonstraram uma alta incidência de mutações no gene supressor tumoral p53 em indivíduos com EB. De acordo com Aldulaimi *et al.*, 1999, mutações somáticas no gene p53 têm sido detectadas em mais de 25% de pacientes com metaplasia de Barrett e 75% de adenocarcinomas [10]. Prevo *et al.*, 1999 analisou 58 pacientes com displasia de alto grau e identificou 50% de mutações no gene p53 nos segmentos de Barrett [23] e Ireland *et al.*, 2000 identificou 48.6% de mutações no TP53 em adenocarcinomas do esôfago e

da cárdia [24]. Entretanto, não existem estudos relacionando o polimorfismo R72P com EB, o qual, de acordo com Audézet *et al.*, 1996 é um excelente modelo para investigação de eventos genéticos envolvendo a progressão neoplásica [2].

Quando indivíduos controles são comparados àqueles com EB em relação à frequência genotípica, nós encontramos uma taxa de 38.75% para indivíduos homozigotos para Arg72, 15% para homozigotos para Pro72 e 46.25% para heterozigotos para ambos os alelos no grupo controle, comparado a 39.1%, 8.7% e 52.2% respectivamente em pacientes com EB, sugerindo que não exista diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p = 0.7208$).

A análise dos alelos de prolina revelou uma frequência de 38.1% para indivíduos controles e 34.78% para pacientes com EB, enquanto que a análise dos alelos da arginina apresentaram 61.87 e 65.22% para controles e pacientes com EB, respectivamente. Embora a frequência dos alelos da arginina seja maiores em ambos os grupos, não existem diferenças significativas na distribuição alélica entre pacientes com EB e controles ($p = 0.8103$).

Oschwang *et al.*, 1991 caracterizou a frequência do polimorfismo R72P em indivíduos com câncer coloretal e controles. Como no nosso estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos de amostras estudadas [25]. A frequência genotípica encontrada no grupo controle analisado por Oschwang *et al.* e aqueles encontrados por nosso grupo foram bastante similares, o que pode indicar que este polimorfismo segue uma proporção uniforme nas populações estudadas.

Vos *et al.*, 2003 comparou pacientes com carcinoma esofágico de células escamosas e controles na África do Sul e encontrou polimorfismo no éxon 4, incluindo no códon 72, mas raras mutações nas regiões flanqueadoras dos éxons 5-8. Perda de heterozigidade ocorreu para o polimorfismo 16 pb nos pacientes com câncer esofágico, mas não nos controles [26].

Na análise do câncer esofágico associado com HPV, Kawaguchi *et al.*, 2000 comparou indivíduos HPV positivos e negativos e concluiu que indivíduos homozigotos para arginina tinham um risco maior de desenvolver carcinoma do que indivíduos heterozigotos ou homozigotos para prolina [21]. Em nosso estudo, não foi possível correlacionar a frequência genotípica e os alelos arginina e prolina com o aumento da predisposição para EB.

Na análise somente do material obtido de indivíduos com EB, a comparação das frequências genotípicas e alélicas do DNA extraído do sangue e do tecido revelou que um dos doze pacientes analisados, que foram heterozigotos para os dois alelos no DNA extraído do sangue, tinha perda de heterozigozidade do alelo prolina no tecido. Este evento já havia sido descrito por Kawaguchi *et al.*, 2000, com todos seus casos de perda de heterozigozidade, o evento comum consistia de prolina e não perda de arginina, como no nosso caso [21]. Entretanto, é difícil saber se existe perda atual de arginina ou existe qualquer mutação no sítio de clivagem, prevenindo o reconhecimento por enzima de restrição. Isto pode ser confirmado somente através do método de sequenciamento dos indivíduos alterados.

Recentemente, Beccouche *et al.*, 2003 descreveu um método mais acurado para detecção do polimorfismo no códon 72 e LOH do TP53. Este método é baseado na digestão de um fragmento amplificado por PCR do éxon 4 a 6 pela enzima *AccII*. O fragmento amplificado contém dois sítios de restrição para *AccII*: o primeiro, localizado no éxon 4, é polimórfico enquanto que um segundo, no éxon 5, é não polimórfico e utilizado como controle interno da digestão [7].

Entretanto, instabilidade genômica foi o evento mais frequente encontrado em nosso estudo, sendo observado em 22.2% dos pacientes com EB. Este achado sugere que esta região é um *hotspot* para mutações e que nestes 4 pacientes uma mutação pode ter ocorrido no tecido de um alelo,

prevenindo o reconhecimento da seqüência de nucleotídeos pela enzima de restrição *AccII*, levando a perda de heterozigozidade observada. Isto pode ser confirmado somente através de sequenciamento desta região.

Uma explicação para a instabilidade freqüente do alelo arginina está relacionado ao fato de que este alelo é representado pelos nucleotídeos CGC e o gene p53 apresenta uma outra guanina próximo a última citosina da arginina, então representando dois sítios CpG – regiões que são reconhecidas por ter seqüências com alta suscetibilidade para mutações devido à metilação da citosina e a habilidade espontânea de deaminação da timina apresentada por esta base [27]. Por outro lado, o alelo prolina, representado pelo CCC, com uma guanina próxima a ele, apresenta somente um sítio CpG, então sendo menos suscetível à metilações do que a arginina.

No caso de instabilidade dos indivíduos homozigotos para prolina no DNA extraído do sangue, que apresentaram padrão heterozigoto no tecido, nós podemos afirmar que estes indivíduos substituíram prolina (CCC) por arginina (CGC), e por isso esta seria a única alternativa que a enzima de restrição poderia reconhecer o sítio de clivagem. Para os indivíduos homozigotos para arginina no sangue e heterozigotos para arginina no tecido, nós não podemos saber se o alelo foi substituído por prolina. Qualquer alteração no sítio de clivagem pode ocorrer, então prevenindo o reconhecimento pela enzima de restrição *AccII*. Entretanto, a alteração pode ser somente confirmada por sequenciamento.

Análises de alterações genéticas deveriam ser feitas com cuidado, porque pode haver erros nas seqüências e polimorfismos nos genes, que podem ocorrer largamente ou em somente certos grupos étnicos. Além disso, certos polimorfismos podem ser desvantajosos, mas não dominantes a menos que exista LOH. Neste caso, a célula se torna efetivamente um “doble-knockout” e o controle do ciclo celular se perde [26].

Por estes resultados, com a freqüente existência de perda de heterozigosidade e instabilidade genômica, uma associação entre estes eventos e EB é sugerida. A análise de outros éxons do gene p53 é essencial para confirmar a ocorrência destes eventos em outras regiões do gene, além da caracterização de possíveis mutações neste grupo de pacientes, contribuindo para um melhor entendimento da progressão do adenocarcinoma esofágico.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio editorial do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brasil) e apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Referências Bibliográficas

1. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B, Nousbaum JB, Hardy E, Bail JP, Volant A, Lozac'h P, Gouérou H, Férec C. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's Adenocarcinoma. *Hum Mutat* 1996; 7:109-113.
2. Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Emond MJ, Reid BJ. Determination of the frequency of loss of heterozigosity in esophageal adenocarcinoma by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1996; 12:1873-1878.
3. Dahiya R, Deng G, Selph C, Carroll P, Presti JJr. A novel p53 mutation hotspot at codon 132 (AAG>AGG) in human renal cancer. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44(2):407-415.
4. Jorde LN, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. *Medical Genetics*. 2nd edition, St. Louis, Mosby, 1999.

5. Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155:181-205.
6. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2(1):32-37.
7. Baccouche S, Mabrouk I, Said Salem, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri. *Cancer Letters* 2003; 189:91-96.
8. Hu N, Roth MJ, Emmert-Buck MR, Tang Z, Polymeropoulos MQ, Goldstein AM, Han X, Dawsey SM, Ding T, Giffen C, Taylor PR. Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3476-3482.
9. Menke-Pluymers MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22:311-316.
10. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999; 12:177-180.
11. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphisms. Disponível em: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>. Acesso em 23 Abril de 2005.
12. Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 1996; 6(12): 4650-4656.
13. Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagaki N, Wong A, Wassermann R, Womer RB, Biegel JA. Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene* 1994; 9(1): 327-335.
14. Soultz N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters* 2002; 179: 175-173.

15. Malcolm EK, Baber GB, Boyd James C, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol* 2000; 13(4):373-378.
16. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, Gorogh, T, Heidorn K, Rudert H. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res* 2000; 20(4):2613-2616.
17. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kunishima S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K., Saito H, Ohno, R. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000; 24(4):349-352.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998;16(7):1215.
19. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87(4):528-33.
20. Storey A, Thomas M, Kalita A, Hardwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 2000; 396:530-531.
21. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, Tanaka S, Sugimachi K. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Canc Res* 2000; Jun 1; 60(11):2753-2755.
22. Guimaraes DP, Lu SH, Snijders P, Wilmotte R, Herrero R, et al. Absence of association between HPV DNA, TP53 codon 72 polymorphism , and risk of oesophageal cancer in a high-risk area of China. *Cancer Letters* 2001; 162: 231-235.

23. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. p53-Mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Research* 1999; 59:4784-4787.
24. Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000; 231:179-187.
25. Olschwang S, Laurent-Puing P, Vassal A, Salmon R-J, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet* 2001; 86:369-370.
26. Vos M, Adams CH, Victor TC, Van Helden PD. Polymorphisms and mutation 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 and Citogenet* 2003; 140: 23-30.
27. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Human Genet* 1990; 85:55-74.

Tabela 1 – Frequência genotípica para o polimorfismo R72P entre indivíduos controles e pacientes com EB

Grupo	Heterozigotos Pro72/Arg72	Homozigotos Pro72	Homozigotos Arg72	# Indivíduos
Controle	37(46.25%)	12 (15%)	31 (38.75%)	80
EB	12 (52.17%)	2 (8.69%)	9 (39.13%)	23
Total	49 (47.57%)	14 (13.59%)	40 (38.83%)	103

EB – Esôfago de Barrett

Tabela 2 – Frequência alélica para Arg72 e Pro72 em indivíduos controles e pacientes com EB.

Grupo	Pro72	Arg72	# Alelos
Controle	61 (38.1%)	99 (61.9%)	160
EB	16 (34.8%)	30 (65.2%)	46
Total	77 (37.4%)	129 (62.6%)	206

EB – Esôfago de Barrett

Legenda de Figuras:

Figura 1: representação esquemática da perda de heterozigozidade. O retângulo branco representa o alelo arginina, o retângulo pintado representa o alelo prolina e o retângulo pontilhado representa LOH ou outra mutação. O número entre parênteses corresponde ao tamanho da amostra.

Figura 2: representação esquemática da instabilidade genômica. O retângulo branco representa o alelo arginina, o retângulo pintado representa o alelo prolina. O ponto de interrogação indica um outro alelo, além da prolina, que pode ter se originado devido a alguma alteração na seqüência de nucleotídeos. O número entre parênteses corresponde ao tamanho da amostra.

Figura 1

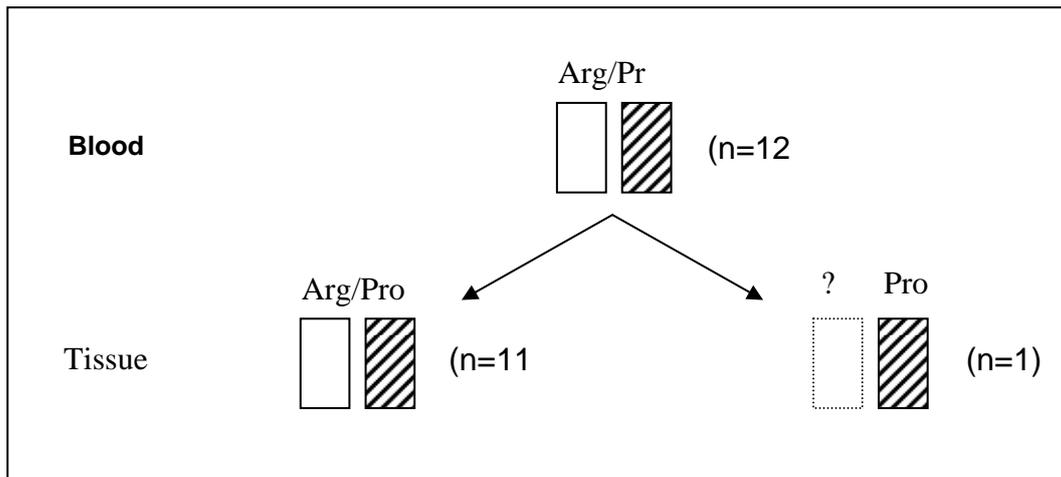
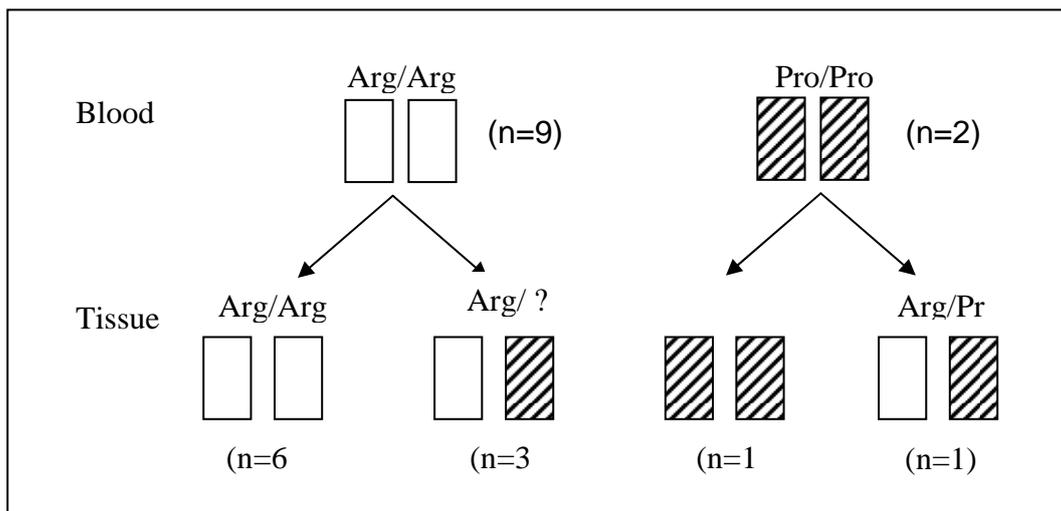


Figura 2



VI. ARTIGO 1

VERSÃO EM INGLÊS

Article submitted and accepted on ***Cancer Genetics and Cytogenetics*** Journal at december 2005, according supplement II.

Accepted by number **MM-4964-05** at March 29, 2006

Analysis of R72P polymorphism in the p53 gene in Brazilian individuals with Barrett's Esophagus and controls.

Sandra Leistner Segal¹; Diogo André Pilger²; Ana Paula Bohn Kaspar¹; Patrícia Lopez¹; Fábio Segal³.

1. Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas in Porto Alegre
2. Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul
3. Institute of the Digestive Tract (Instituto do Aparelho Digestivo - IAD)

Abbreviated Title: p53 R72P polymorphism in Barrett's esophagus

Corresponding author:

Sandra Leistner, PhD
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-2101-8011
Fax: +55-51-21018010
E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Purpose: We performed analysis of the Arg72Pro polymorphism in exon 4 of the p53 gene, which may be related to increased susceptibility to several types of cancer. Twenty-three individuals diagnosed with Barrett's Esophagus and 80 control individuals from the Blood Bank of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre were analyzed. The protocol included DNA extraction from blood and tissue followed by polymerase chain reaction amplification of exon 4. Polymorphism analysis was performed with *AccII* restriction enzyme.

Results: The proportion of individuals who were homozygous for Arginine72, homozygous for Proline72, and heterozygous for both alleles was, respectively, 38.75%, 15.0%, and 46.25% in controls, and 39.1%, 8.7% and 52.2% in Barrett's patients.

Conclusions: There were no significant differences in genotype distribution between Barrett's patients and controls. Among the Barrett's patients analyzed, one case (8.33%) of loss of heterozygosity (LOH) and 4 cases (22.2%) of genomic instability were found, which may suggest some association between these events and cancer development.

Key words: p53, Barrett's Esophagus, Arg72Pro polymorphism, molecular analysis.

Introduction

Barrett's Esophagus (BE) is a complication of the gastroesophageal reflux disease being an acquired premalignant disorder that predisposes the development of adenocarcinoma of the esophagus in 10% of the patients. It is also used as a model to investigate the order of genetic events in neoplastic progression [1].

Somatic mutations of the tumor suppressor gene p53 (TP53) are the most common alterations in a number of human cancers [2, 3, 4]. More than 90% of the mutations described for the p53 gene occur between exons 4 and 9, which encompass protein domains II-V. This region is evolutionarily highly conserved and involves the DNA-binding domain, essential for the activity of TP53 [5, 6].

p53 gene mutations can damage its DNA-binding or transactivation functions, thereby inhibiting its key role in the cell cycle control. In the majority of these cases where the mutation is recessive, tumor cells often retained only the mutated allele and lose the wild type, while blood cells harbor both alleles. This loss is named loss of heterozygosity (LOH) [7]. Chromosomal regions with frequent LOH may point out those genes with higher susceptibility and help to understand the molecular events involved in carcinogenesis [8].

During the evolution from Barrett's Esophagus into adenocarcinoma, numerical and structural genomic changes are observed. The lack of a cytogenetic common denominator indicates that a great number of gene alterations may be involved in adenocarcinoma progression [9].

Mutations in TP53 gene have been detected in more than 25% of patients with Barrett's metaplasia submitted to endoscopy and in more than 75% of Barrett's adenocarcinomas [10].

In addition to cancer-associated mutations, at least 20 polymorphisms have already been described at the p53 gene, both in coding and noncoding regions [11]. Among these, three have been described in exon 4: the R72P,

encoding both arginine (CGC) and proline (CCC) alleles which appear to be functionally equivalent [11], a silent polymorphism at codon 36 (GCA-->CCA), with a frequency of 4% [12], and P47S (CCG-->TCG), with a frequency of 1.5% [13]. The R72P polymorphism has been extensively studied with regard to its involvement in increased risk for cancer development, but results are inconsistent [14, 15, 16, 17]. Our study aimed to estimate the frequency of R72P polymorphism in control individuals, who represent the population of Porto Alegre, and in individuals with Barrett's Esophagus from the southernmost region of Brazil. In addition, we studied the potential association between the frequencies of this polymorphism in these two groups. The analysis of blood and tissue obtained from the same individual allowed us to check for the existence of loss of heterozygosity in this region of the gene.

Material and Methods

The material used in this study consisted of 80 unidentified controls obtained from the Blood Bank of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre and 23 individuals diagnosed with Barrett's Esophagus, confirmed by elective upper digestive endoscopy and biopsy.

Ten milliliters of peripheral blood in EDTA was withdrawn from controls and BE individuals and DNA was isolated using the salting out procedure described by Miller *et al.*, 1988. In addition, tissue from the lesion site was obtained by biopsy at endoscopy from the BE patients. DNA extraction from tissue was performed freshly, carried out as previously described [18]. All procedures were performed with written informed consent of the patients.

Amplification of exon 4 of p53 gene was carried out through the polymerase chain reaction (PCR) technique. For PCR, we used 0.2 mM dNTP (Sigma), 5 μ L ammonium buffer (16mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris. HCL pH 8.8, and 0.1% Tween 20), 2UI of DNA Taq polymerase Gibco, 2mM MgCl₂, 20 pmoles of

specific primers designed for the fragment to be amplified, to a final volume of 50 μ L. The sequence of primers used was:

FORWARD 5'AGGACCTGGTCCTCTGACTG3'

REVERSE 5'TCATGGAGCCAGCCCCTCA3'.

PCR conditions were: initial denaturation at 94 °C for 3 min., followed by 35 cycles of 40 seconds, with 94°C of denaturation, 55°C of annealing and extension at 72°C, and final extension of 72°C for 10 min. The amplified fragment of 350 pb was submitted to 2.0% agarose gel electrophoresis and visualized through ethidium bromide staining.

The PCR product was then digested with 10U of *AccII* restriction enzyme (Amersahm Pharmacia Biotech), 3 μ L of buffer (10mM Tris-HCL [pH7.5], 7mM MgCL₂, 60mM NaCl, 7mM 2-mercaptoethanol, and 0.01% BSA), and 10 μ L of PCR product, plus double distilled water to a final volume of 30 μ L. The tubes were incubated at 37°C for 3 hours until complete digestion in dry bath. The digestion reaction was visualized in 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Restriction enzyme *AccII* recognizes the restriction site at CG↓CG base pair, cleaving the amplified fragment of 350 pb into 191 pb and 159 pb, respectively, in the presence of the arginine allele. The proline allele (CCG) does not present the restriction site and thus is not cleaved, remaining with 350 pb.

The statistical analysis of results was performed by the Pearson's chi-square method in the EPI-INFO 6.1 software.

Results

1. Determination of R72P polymorphism frequency

The DNA extracted from 80 control individuals and 23 BE patients was analyzed to determine the frequency of the R72P polymorphism. The data were analyzed regarding the genotype (Table 1) and allele (Table 2) frequencies.

In the statistical analysis, the genotype frequency found in controls and BE patients was not significantly different ($p = 0.7208$).

The analysis of frequency of arginine and proline alleles in controls and BE patients did not show significant differences either ($p = 0.8103$).

2. Loss of heterozygosity analysis

For this study, the DNA extracted from blood and tissue of 23 BE individuals was analyzed. Only the individuals who presented a heterozygous pattern in their blood were considered ($n = 12$). Of these, only one (8.33% of the sample) presented a homozygous pattern in the tissue. The individual who presented loss of heterozygosity in the tissue had a transition from heterozygosity to homozygosity for the proline allele (Figure 1).

We have also observed that 4 of the 11 individuals homozygous for proline ($n=2$) or arginine ($n=9$) in their blood presented a heterozygous pattern in the tissue (22.2%), indicating the “gain” of an allele and suggesting the presence of genomic instability in this region (Figure 2).

Discussion

Several studies that relate R72P polymorphism to various types of carcinomas have been performed, leading to a potential predisposing factor for the development of tumors. This predisposition associated with certain environmental factors may increase the risk of cancer development in people with susceptible genotypes.

The association of polymorphism at codon 72 of p53 with uterine cervical cancer related to human papillomavirus (HPV) has been studied by several groups with contradictory results [15, 19]. In 1998, Storey *et al.*, 2000 suggested that individuals homozygous for arginine at codon 72 of p53 have approximately a seven-fold increased risk of cervical cancer related to HPV as compared to heterozygous individuals, because the arginine transport protein is significantly more susceptible to E6 degradation in vivo than the proline [20]. R72P polymorphism has also been correlated with esophageal cancer associated with the human papillomavirus, suggesting a tendency of individuals homozygous for arginine towards developing esophageal cancer related to HPV in Japanese patients [21]. Soultzis *et al.*, 2002 published the first study correlating p53 codon 72 polymorphism with bladder cancer, providing evidence that this polymorphism is implicated in bladder carcinogenesis. The Arg/Arg genotype has an increased risk of developing this kind of cancer [14].

Apparently, however, there are few reports relating this polymorphism to Barrett's Esophagus. In the other hand, Guimaraes *et al.*, 2001 indicate that the most common allele in central China is the one encoding proline, in contrast to the majority of the populations tested to date. These results indicate that polymorphism at codon 72 in TP53 is not associated with risk of esophageal cancer, even associated to HPV infection [22]

A few studies report a high incidence of mutations in tumor suppressor p53 gene in individuals with Barrett's Esophagus. According to Aldulaimi *et al.*, 1999, somatic mutations in p53 gene have been detected in more than 25% of patients with Barrett's metaplasia and 75% of those with Barrett's adenocarcinomas [10]. Prevo *et al.*, 1999 analyzed 58 patients with high-grade dysplasia and identified 50% with p53 mutations in their Barrett's segments [23], and Ireland *et al.*, 2000 identified 48.6% of p53 mutations in adenocarcinomas of the esophagus and cardia [24]. However, there are no studies relating R72P

polymorphism to BE, which, according to Audrézet *et al.*, 1996, is an excellent model for the investigation of genetic events involved in neoplastic progression [2].

When control individuals are compared to those with Barrett's Esophagus as to genotype frequency, we find a rate of 38.75% for individuals homozygous for Arg72, 15% for those homozygous for Pro72, and 46.25% for those heterozygous for both alleles in the control group, compared to 39.1%, 8.7%, and 52.2% respectively in individuals with Barrett's Esophagus, suggesting that there is no significant difference between the two groups studied ($p = 0.7208$).

The analysis of proline alleles revealed a frequency of 38.1% for control individuals and 34.78% for BE patients, while the analysis of arginine alleles presented 61.87 and 65.22% for controls and BE individuals, respectively. Although the frequency of the arginine allele is greater in both populations, there is no difference in allelic distribution between BE individuals and controls ($p = 0.8103$).

Olschwang *et al.*, 1991 characterized the frequency of R72P polymorphism in individuals with colorectal cancer and controls. As in our study, no significant differences were found between the two samples studied [25]. The genotype frequencies found in the control group analyzed by Olschwang *et al.*, and those found in our control group are very similar, which may indicate that such polymorphism follows a uniform proportion in the populations studied.

Vos *et al.*, 2003 compared patients with esophageal squamous cell carcinoma and controls in South Africa and found polymorphisms in exon 4, including codon 72, but rarely mutations in the regions flanking exons 5-8. Loss of heterozygosity occurred for the 16 pb polymorphism in the esophageal cancer patients, but not in the controls [26].

On analyzing esophageal cancer associated with HPV, Kawaguchi *et al.*, 2000 compared HPV positive and negative individuals and concluded that individuals homozygous for arginine have a higher risk to developing carcinoma than individuals who were heterozygous and homozygous for proline [21]. In our study, it was not possible to correlate the genotype frequencies and arginine and proline alleles with increased predisposition to Barrett's Esophagus.

On analyzing only the material obtained from individuals with Barrett's Esophagus, the comparison of genotype and allele frequencies of DNA extracted from blood and tissue revealed that one of the twelve patients analyzed, who were heterozygous for the two alleles in DNA extracted from blood, had loss of heterozygosity of the proline allele in the tissue. This event had already been reported by Kawaguchi *et al.*, 2000, yet in all of their cases of loss of heterozygosity, the common event consisted of proline and not arginine loss, as in our case [21]. However, it is hard to know whether there was actually loss of arginine or if there was any mutation in the cleavage site, preventing its recognition by the restriction enzyme. This can be checked only through the sequencing method in the altered individual.

Recently, Baccouche *et al.*, 2003 described a more accurate method of detection of codon 72 polymorphism and LOH of TP53 gene. This method is based on *AccII* digestion of a fragment extending from exon 4 to exon 6 amplified by PCR. The amplified fragment contains two *AccII* restriction sites: the first one, located in exon 4, is polymorphic whereas the second one located in exon 5, is non-polymorphic and is used as an internal control for digestion [7].

However, genomic instability was the most frequent event found in our study, being observed in 22.2% of BE individuals. This finding suggests that this region is a hotspot for mutations, and that in these 4 individuals, a mutation may have occurred in the tissue of one allele, preventing the recognition of the nucleotide sequence by restriction enzyme *AccII*, and leading to the

heterozygosity observed. This can be confirmed only through sequencing of this region.

An explanation for the frequent instability of the arginine allele is related to the fact that the arginine allele is represented by nucleotides CGC and p53 gene presents another guanine next to the last cytosine of the arginine amino acid, thus representing two CpG islands – regions which are known to have the sequences with highest susceptibility to mutation due to cytosine methylation and to the ability of spontaneous deamination to thymine presented by this base [27]. On the other hand, the proline allele, represented by CCC, with a guanine next to it, presents only one CpG site, thus being less susceptible to mutations than arginine.

In the case of instability in the individual homozygous for proline in DNA extracted from blood, who presented a heterozygous pattern in the tissue, we can affirm that this individual replaced proline (CCC) with arginine (CGC), for this would be the only alternative through which the restriction enzyme would recognize the cleavage site. For the individual homozygous for blood arginine but heterozygous for tissue arginine, however, we cannot know if the allele was actually replaced with proline. Any alteration in the cleavage site may have occurred, thus preventing recognition by restriction enzyme *AcclI*. However, the alteration can only be confirmed by sequencing the individuals under consideration.

Analysis of genetic changes should be done with circumspection, because there may be errors in sequence deposited and there may be polymorphisms in the gene, which may occur widely or in certain ethnic groups only. It is, furthermore, possible that certain polymorphisms may be disadvantageous, but not dominant unless there is a loss of heterozygosity (LOH). In this case, the cell becomes effectively a double-knockout and cell cycle control is lost [26]

In view of the results, with the frequent existence of loss of heterozygosity and genomic instability, an association between these events and Barrett's Esophagus is suggested. The analysis of other exons of the p53 gene is essential to check for the occurrence of these events in other regions of the gene, in addition to characterizing possible mutations in this group of patients, thus contributing to a better understanding of esophageal adenocarcinoma progression.

Acknowledgment: This work received editorial support from the Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brazil) and financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

References

1. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B, Nousbaum JB, Hardy E, Bail JP, Volant A, Lozac'h P, Gouérou H, Férec C. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's Adenocarcinoma. *Hum Mutat* 1996; 7:109-113.
2. Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Emond MJ, Reid BJ. Determination of the frequency of loss of heterozygosity in esophageal adenocarcinoma by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1996; 12:1873-1878.
3. Dahiya R, Deng G, Selph C, Carroll P, Presti JJr. A novel p53 mutation hotspot at codon 132 (AAG>AGG) in human renal cancer. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44(2):407-415.

4. Jorde LN, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Medical Genetics. 2nd edition, St. Louis, Mosby, 1999.
5. Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155:181-205.
6. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2(1):32-37.
7. Baccouche S, Mabrouk I, Said Salem, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri. *Cancer Letters* 2003; 189:91-96.
8. Hu N, Roth MJ, Emmert-Buck MR, Tang Z, Polymeropoulos MQ, Goldstein AM, Han X, Dawsey SM, Ding T, Giffen C, Taylor PR. Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3476-3482.
9. Menke-Pluymers MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22:311-316.
10. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999; 12:177-180.
11. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphisms. Available at <http://www.iarc.fr/p53/index.html>. Accessed April 23, 2005.
12. Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 1996; 6(12): 4650-4656.
13. Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagaki N, Wong A, Wassermann R, Womer RB, Biegel JA. Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene* 1994; 9(1): 327-335.
14. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters* 2002; 179: 175-173.

15. Malcolm EK, Baber GB, Boyd James C, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol* 2000; 13(4):373-378.
16. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, Gorogh, T, Heidorn K, Rudert H. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res* 2000; 20(4):2613-2616.
17. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kunishima S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K., Saito H, Ohno, R. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000; 24(4):349-352.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998;16(7):1215.
19. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87(4):528-33.
20. Storey A, Thomas M, Kalita A, Hardwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 2000; 396:530-531.
21. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, Tanaka S, Sugimachi K. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Canc Res* 2000; Jun 1; 60(11):2753-2755.
22. Guimaraes DP, Lu SH, Snijders P, Wilmotte R, Herrero R, et al. Absence of association between HPV DNA, TP53 codon 72 polymorphism , and risk of oesophageal cancer in a high-risk area of China. *Cancer Letters* 2001; 162: 231-235.

23. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. p53-Mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Research* 1999; 59:4784-4787.
24. Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000; 231:179-187.
25. Olschwang S, Laurent-Puing P, Vassal A, Salmon R-J, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet* 2001; 86:369-370.
26. Vos M, Adams CH, Victor TC, Van Helden PD. Polymorphisms and mutation 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 and Citogenet* 2003; 140: 23-30.
27. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Human Genet* 1990; 85:55-74.

Table 1: Genotype frequencies for the R72P polymorphism among controls and individuals with Barrett's Esophagus.

Group	Heterozygous Pro72/Arg72	Homozygous Pro72	Homozygous Arg72	# Individual
Control	37(46.25%)	12 (15%)	31 (38.75%)	80
EB	12 (52.17%)	2 (8.69%)	9 (39.13%)	23
Total	49 (47.57%)	14 (13.59%)	40 (38.83%)	103

BE – Barrett's Esophagus

Table 2: Allele frequencies for Arg72 and Pro72 in controls and individuals with Barrett's Esophagus.

Group	Pro72	Arg72	# Allele
Control	61 (38.1%)	99 (61.9%)	160
EB	16 (34.8%)	30 (65.2%)	46
Total	77 (37.4%)	129 (62.6%)	206

BE – Barrett's Esophagus

Figure Legends

Figure 1: Schematic representation of loss of heterozygosity. The white rectangle stands for the arginine allele, the striped rectangle for the proline allele, and the dotted rectangle for the allelic loss or some other mutation. The numbers in parentheses correspond to the sample size.

Figure 2: Schematic representation of genomic instability. The white rectangle stands for the arginine allele, and the striped rectangle for the proline allele. The question mark indicates that another allele, besides proline, may have originated due to some alteration in the nucleotide sequence. The numbers in parentheses correspond to the sample size.

Figure 1

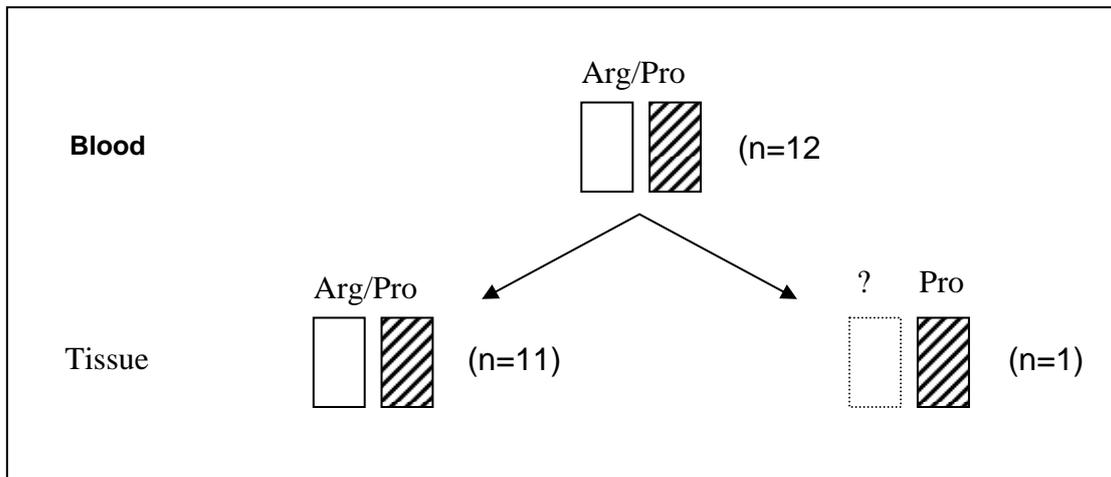
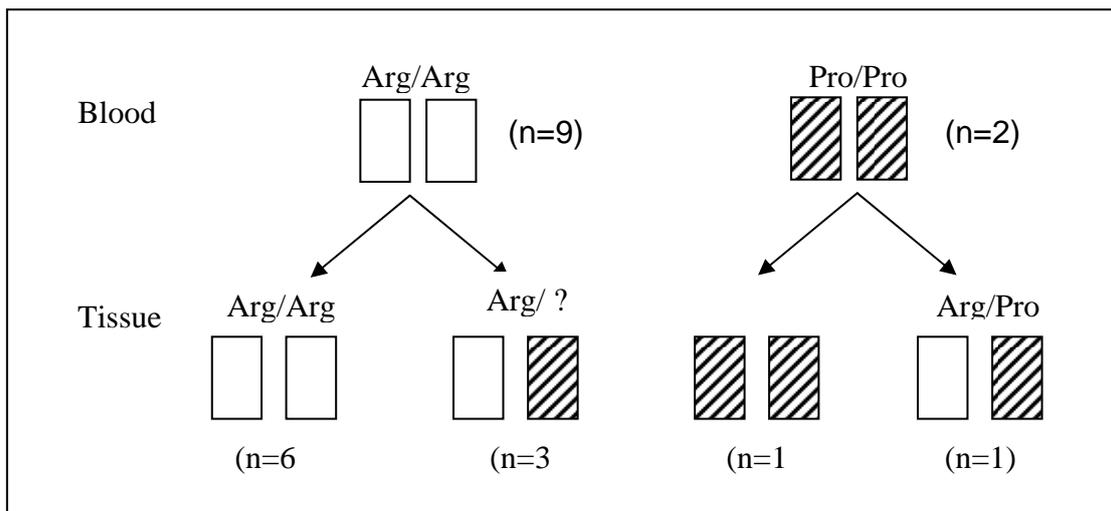


Figure 2



VII. ARTIGO 2
VERSÃO EM PORTUGUÊS

Artigo não submetido

Análise dos polimorfismos R213R e 13494 g->a do gene p53 em indivíduos com esofagite, metaplasia intestinal da cárdia e Esôfago de Barrett comparados com um grupo controle

Diogo André Pilger¹; Patrícia Luciana da Costa Lopez²; Fábio Segal³; Sandra Leistner-Segal²

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
3. Instituto do Aparelho Digestivo (IAD)

Correspondência para o autor:

Diogo André Pilger
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-2101-8011
Fax: +55-51-2101-8010
E-mail: pilger@terra.com.br

Resumo

Objetivos: o polimorfismo R213R, localizado no éxon 6 e o polimorfismo 13494 g->a no íntron 6 do gene p53 são pouco estudados, sem ainda uma frequência estimada na população brasileira. Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência desses dois polimorfismos numa população controle de Porto Alegre e verificar sua associação com alterações no tecido esofágico, além da ocorrência de perda de heterozigidade (LOH) nas amostras de tecidos alterados de esôfago quando comparados com tecido normal. Além disso, construir um haplótipo para os dois polimorfismos analisados juntamente com o polimorfismo R72P do éxon 4 do TP53 analisado anteriormente por nosso grupo.

Resultados: foram analisados um total de 45 indivíduos portadores de sintomas de doença de refluxo gastroesofágico, diagnosticados através de endoscopia digestiva alta e confirmados através de biópsia. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa na frequência destes dois polimorfismos entre o grupo de pacientes e controles. Foi encontrada LOH em somente um paciente quando analisado o polimorfismo do éxon 6 e dois pacientes para o polimorfismo do íntron 6. A análise em conjunto dos três polimorfismos demonstra o haplótipo conservado [AA, GG, RR].

Conclusões: considerando nossos resultados em relação à frequência alélica, genotípica e do haplótipo dos polimorfismos R213R, 13494g->a e R72P do gene p53 em pacientes e controles, podemos concluir que estes três sítios não representam determinantes genéticos de suscetibilidade ao câncer esofágico, nos estágios histológicos analisados.

Palavras-chave: polimorfismo, p53, esôfago.

Introdução

O Esôfago de Barrett (EB) é uma complicação da doença de refluxo gastroesofágico na qual, em cerca de 10% dos pacientes, ocorre substituição do epitélio escamoso normal por epitélio colunar especializado (1). A evolução progressiva do epitélio esofágico normal para epitélio do tipo colunar caracteriza-se por uma complexa seqüência de eventos que se iniciam por uma inflamação do epitélio escamoso normal (esofagite), decorrente do refluxo crônico, seguida de metaplasia intestinal da cárdia (MIC) e EB, graus crescentes de displasia e adenocarcinoma. Esse processo é modulado por estímulos ambientais e predisposição genética os quais resultam em instabilidade genômica. Células com múltiplas anormalidades genéticas adquiridas resultam em clones celulares com erros genéticos acumulados. Alguns clones adquirem vantagem proliferativa e podem desenvolver a capacidade de invasão, resultando em neoplasia (2).

Numerosos estudos mencionam as alterações moleculares relacionadas com a seqüência metaplasia-adenocarcinoma enquanto que poucos relacionam a interação entre fatores moleculares e o desenvolvimento de alterações anteriores à metaplasia (3,4,5). A atividade de inúmeros genes tem sido utilizada para identificar alterações na progressão para displasia e adenocarcinoma e a detecção de mutações no gene p53 (TP53) têm sido relacionadas a estágios posteriores ao EB (6,7,8). Para o adenocarcinoma esofágico, existem fortes evidências do envolvimento do TP53 para o prognóstico dos pacientes, reduzindo sua sobrevida (9).

Em 1994, Neshat *et al.* descreveu as alterações moleculares associadas a neoplasia de esôfago. As mutações no gene supressor tumoral p53 foram as anormalidades mais comumente descritas. A incidência de mutações tende a aumentar com a progressão metaplasia-displasia-adenocarcinoma, passando de raras no epitélio não displásico até 90% no adenocarcinoma (10,11).

O gene p53 é formado por 11 éxons que codificam uma fosfoproteína de 393 aminoácidos (12,13,14). Funciona como gene supressor tumoral, agindo em conjunto com outros genes envolvidos na regulação do ciclo celular, tendo um papel chave no controle da proliferação celular, apoptose (morte celular programada), síntese e reparo de DNA (15).

O gene p53 tem sido associado ao desenvolvimento de aneuploidias, instabilidade genômica, perda de heterozigotidade e diversos tipos de mutações e polimorfismos (16,17). Na maioria destas alterações, nas quais a mutação é recessiva, as células tumorais frequentemente retêm somente o alelo mutado e perdem o selvagem, enquanto que o sangue mantém ambos os alelos. A isto se dá o nome de perda de heterozigotidade (LOH) (18). Mutações *missense* são o mecanismo primário de inativação alélica e o TP53 foi confirmado como o principal alvo desta inativação, seguido de LOH funcionando como o principal mecanismo de predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasia (19).

Invariavelmente, estas alterações localizam-se entre os éxons 5 a 8 que contém o domínio de ligação do DNA com a proteína p53 (20,21,22,23). Mutações nas regiões flangeadoras nos éxons 5 a 8 são raras, embora possam ser biologicamente significantes (24,25).

Além de mutações, vários polimorfismos têm sido descritos localizados tanto em regiões codificantes quanto em não codificantes do gene (26). Estudos indicam que alelos polimórficos preferenciais do gene podem estar envolvidos na suscetibilidade e predisposição a neoplasias, sendo possível identifica-los pelo uso de enzimas de restrição (18,27,28).

A maioria dos polimorfismos encontrados no gene p53 estão localizados em íntrons, fora da região consenso de sítios de *splicing*. São 20 polimorfismos descritos tanto em éxons como em íntrons. Mutações em sítios de *splicing* ou íntrons são pouco encontradas em base de dados, pois a maioria dos estudos está focada nas regiões codificadoras (29).

O polimorfismo do códon 213, localizado no éxon 6 e o polimorfismo 13494 g ->a no íntron 6 são pouco citados em literatura, e suas freqüências na população brasileira não foram estimadas (26). O polimorfismo R213R mantém o aminoácido arginina, sendo o códon mais freqüente a CGA e o polimórfico CGG. O polimorfismo na região 13494 do íntron 6 mostra uma adenina no lugar de guanina. Para ambos não foram encontradas quaisquer diferenças fenotípicas.

Este estudo tem por objetivo avaliar a freqüência desses dois polimorfismos em uma população controle de Porto Alegre e verificar sua associação com alterações no tecido esofágico, além da ocorrência de perda de heterozigozidade nas amostras de tecidos alterados de esôfago quando comparados com tecido normal. Além disso, construir um haplótipo para os dois polimorfismos analisados juntamente com o polimorfismo R72P do éxon 4 do TP53 analisado anteriormente por nosso grupo (30).

Materiais e Métodos

Pacientes: Para análise do polimorfismo R213R foram avaliados 35 pacientes (17 femininos e 18 masculinos; idades entre 23 e 82 anos; média de 51,1 anos). Para o polimorfismo 13494 g->a foram analisados um total de 45 pacientes (22 femininos e 23 masculinos; idades entre 23 e 82 anos; média de 51,4 anos) com sintomas de doença de refluxo gastroesofágico (DRGE), diagnosticados através de endoscopia digestiva alta e confirmados através de biópsia. As biópsias foram analisadas conforme descrito por Segal *et al.*, 2004 (31). Para os controles, foram analisadas 100 amostras provenientes de doadores do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Extração de DNA: As amostra de pacientes e controles tiveram DNA extraído de 10mL de sangue periférico coletado em EDTA através da técnica modificada de precipitação por sais descrita por Miller *et al.*, 1988 (32). Para o grupo de

pacientes portadores de alterações esofágicas, o mesmo procedimento foi realizado para amostras de tecido coletadas no momento da endoscopia.

Condições para reação em cadeia da polimerase (PCR): Foi padronizada a técnica de PCR longo envolvendo os éxons 5 a 8 do gene p53. Para isso foram utilizados *primers 5 forward* (5´CTGCCCTGACTTTCAACTCTG 3´) e *8 reverse* (5´ TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC 3´) de acordo com Segal *et al.*, 2004 (31). As ampliações foram realizadas utilizando em torno de 200 ng de DNA, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 5µL de tampão para enzima (Tris-HCl 200mM, KCl 500mM), 5µL de dNTP 0,2mM (Invitrogen®), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,0µL de cada *primer* específico na concentração de 20pmol para volume final de reação de 50µL. Em termociclador utilizou-se o programa com desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à temperatura de 94°C de desnaturação, temperatura de anelamento de 55°C; 72°C de extensão e extensão final de 72°C por 10 minutos. A amplificação resulta em um fragmento de 1619 pb que é visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Digestões com enzimas de restrição

Polimorfismo R213R (Éxon 6): Para identificação do polimorfismo R213R do éxon 6 foi realizada a digestão do produto de PCR longo com a enzima *Taq I* (New England BioLabs®) que cliva o sítio T´CGA, conforme instruções do fabricante. Foram utilizados na digestão 10µL do produto de PCR e 2U da enzima, em um volume final de 30µL. A reação foi mantida a 65°C em programa de termociclador por 2 horas e 30 minutos. Os fragmentos resultantes da clivagem com a enzima *Taq I* no produto de PCR são de 385, 309 e 925 pb na presença da seqüência CGA e 694 e 925 pb na presença da seqüência CGG.

Polimorfismo 13494 g->a (Intron 6): Para identificação do polimorfismo 13494 g->a do intron 6 foi realizada a digestão do produto de PCR longo com a enzima *Msp I* (New England BioLabs®) que cliva o sítio C´CGG conforme instruções do

fabricante. Foram utilizados na digestão 10 µL do produto de PCR e 2U da enzima, em um volume final de 30µL. A reação foi incubada a 37⁰C em banho seco. Os fragmentos resultantes da clivagem com a enzima *Msp I* no produto de PCR são de 124, 356, 276, 299, 168, 276 e 120 pb na presença da seqüência CGG e 124, 632, 299, 168, 276 e 120 pb na presença da seqüência CAG.

Ambos os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. O padrão de bandas encontrado é visualizado na figura 1.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste do Qui-quadrado de Person no programa MedCalc[®].

Resultados

Manifestações Clínicas

Todos os pacientes apresentavam manifestações de DRGE. Para a análise do polimorfismo R213R, 20% (7/35) apresentavam esofagite, 37,1% (13/45) apresentavam MIC e 42,9% (15/35) apresentavam EB. Para o polimorfismo 13494g->a, 27% (12/45) apresentavam esofagite, 37,8% (17/45) MIC e 35,6% (16/45) EB.

Padronização da técnica de PCR longo

A metodologia apresentada se mostrou adequada para amplificação de um segmento relativamente longo que envolveu 4 éxons importantes na função da proteína p53, conforme mostrado na figura 1.

Identificação do polimorfismo R213R (Éxon 6)

Tanto entre os pacientes quanto nos controles observou-se predominância do alelo (A), não sendo encontrado homozigose do alelo polimórfico (G). Este foi apenas encontrado em heterozigose em dois indivíduos do grupo de pacientes e quatro no grupo controle, conforme Tabela 1. As freqüências encontradas para este polimorfismo foram bastante semelhantes nos

dois grupos, sem diferença significativa, tanto para a análise genotípica quanto alélica ($p = 0,958$ e $p = 0,957$, respectivamente).

Os dois pacientes que apresentaram o alelo (G), em heterozigose, mostravam MIC e EB.

Estes resultados foram comparados com dados na literatura e não se observou diferença significativa entre as freqüências do alelo polimórfico ($p = 0,978$) (33). Comparando-se com uma população americana também não foi encontrada diferença significativa, nem mesmo quando comparadas com as subpopulações de Afro-americanos, Caucasianos e Hispânicos, dentro desse mesmo estudo ($p = 0,913$, $p = 0,726$, $p = 0,736$ e $p = 0,687$, respectivamente) (34).

A figura 1 mostra o resultado da digestão com *Taq I* evidenciando os possíveis alelos para o polimorfismo R213R.

Grupo	Genótipo			Alelo	
	AA	AG	GG	A	G
Controles (n=100)	96 (0,960)	4 (0,040)	0 (0,00)	196 (0,980)	4 (0,02)
Pacientes (n=35)	33 (0,943)	2 (0,057)	0 (0,00)	68 (0,971)	2 (0,028)

Tabela 1: Freqüência genotípica e alélica para o polimorfismo R213R em pacientes e controles

Identificação do polimorfismo 13494 g->a (Intron 6)

Tanto entre os pacientes quanto nos controles observou-se predominância do alelo (G), sendo encontrado homozigose do alelo polimórfico (A) em 4 indivíduos do grupo controle e nenhum no grupo de pacientes, conforme Tabela 2. A distribuição do alelo polimórfico (A) foi maior entre os indivíduos controles da amostra se comparado com o polimorfismo R213R. Da mesma forma que no polimorfismo para o éxon 6, a análise da freqüência do polimorfismo do intron 6 não apresentou diferença significativa quando

comparado o grupo de pacientes com o grupo controle tanto para análise genotípica quanto alélica ($p = 0,607$ e $p = 0,395$, respectivamente).

Os pacientes que apresentaram o alelo polimórfico (A) apresentavam esofagite (4/45), MIC (5/45) e EB (3/45).

Sobrepondo as frequências encontradas em nossa população com os dados da literatura houve diferença significativa. A população analisada no estudo de Akar *et al.*, 1999 obteve frequência 0,3 de alelos polimórficos, diferindo significativamente dos achados deste trabalho que encontrou 0,133 ($p = 0,008$) (33).

Comparando-se com uma população americana não foi encontrada diferença significativa, nem mesmo quando comparadas com as subpopulações de Afro-americanos, Caucasianos, Hispânicos e da Costa do Pacífico, dentro desse mesmo estudo ($p = 0,928$, $p = 0,404$, $p = 0,467$ e $p = 0,723$, respectivamente) (34).

Grupo	Genótipo			Alelo	
	AA	AG	GG	A	G
Controles (n=100)	4 (0,040)	25 (0,250)	71 (0,710)	33 (0,165)	167 (0,835)
Pacientes (n=45)	0 (0,000)	12 (0,267)	33 (0,733)	12 (0,133)	78 (0,867)

Tabela 2: Frequência genotípica e alélica para o polimorfismo 13494g->a em pacientes e controles

A figura 1 mostra o resultado da digestão com *Msp I* evidenciando os possíveis alelos para o polimorfismo 13494 g->a.

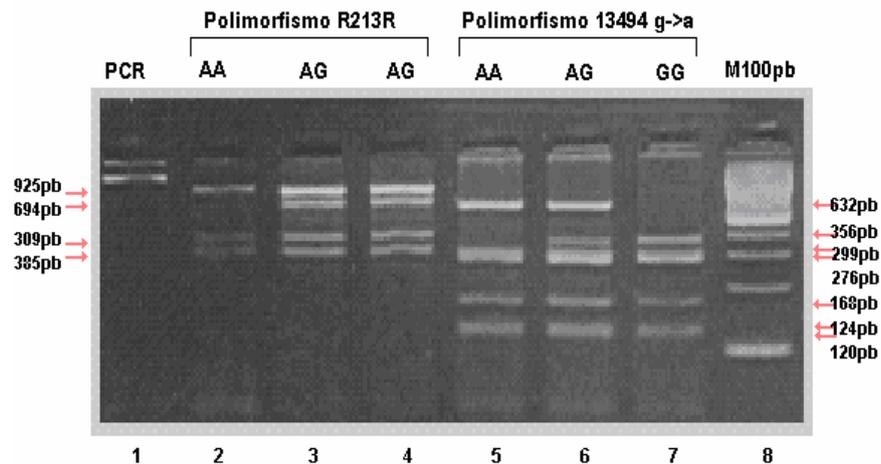


Figura 1: Gel de Agarose (3,0%) demonstrando o resultado do PCR longo e digestões realizadas com *Taq I* e *Msp I*. A posição 8 apresenta o marcador de peso molecular de 100pb. Na posição 1 visualiza-se o produto de PCR longo envolvendo os éxons 5 a 8 do TP53. Nas posições 2, 3 e 4 os padrões alélicos AA e AG para o polimorfismo R213R. Nas posições 5, 6 e 7 os padrões alélicos AA, AG e GG para o polimorfismo 13494 g->a.

Perda de Heterozigozidade (LOH)

Foram analisados 25 pares de amostras de sangue e tecido dos pacientes para o polimorfismo R213R e 27 pares de amostras para o polimorfismo 13494g->a. Dentro dessa análise, foram avaliados somente indivíduos com padrão heterozigotos no sangue periférico, que no grupo de pacientes representou uma frequência de 0,080 para o polimorfismo R213R e 0,330 para o polimorfismo 13494 g->a.

Foi encontrada LOH em somente um paciente (4,0%) quando analisado o polimorfismo do éxon 6, portador de EB. Para o polimorfismo do intron 6 foi encontrada LOH em dois pacientes (7,4%), um portador de esofagite e outro de EB. O alelo polimórfico presente na amostra de sangue periférico não foi mantido no tecido desses dois pacientes, confirmando o estresse deste tecido, mesmo com a preservação do selvagem.

Análise do haplótipo para os polimorfismos R213R, 13494 g->a e R72P

Os polimorfismos R213R e 13494 g->a foram analisados em conjunto com o polimorfismo R72P do éxon 4 do gene p53, anteriormente descrito por nosso grupo na mesma amostra de pacientes (30). Para esta análise foram avaliados 26 pacientes para os três polimorfismos em conjunto. Os padrões genotípicos obtidos estão demonstrados na tabela 3.

Paciente	R213R	13494 g->a	R72P	Tipo Histológico
Caso 1	AA	GG	PR	EB
Caso 2	AA	AG	RR	EB
Caso 3	AA	AG	RR	EB
Caso 4	AA	GG	PR	EB
Caso 5	AA	AG	PR	MIC
Caso 6	AA	GG	PR	ESOFAGITE
Caso 7	AA	AG	RR	ESOFAGITE
Caso 8	AA	GG	RR	MIC
Caso 9	AA	GG	RR	EB
Caso 10	AA	GG	RR	MIC
Caso 11	AA	GG	PR	EB
Caso 12	AA	GG	PR	EB
Caso 13	AA	AG	PR	MIC
Caso 14	AA	GG	RR	ESOFAGITE
Caso 15	AA	AG	PR	MIC
Caso 16	AA	GG	RR	MIC
Caso 17	AG	AG	PR	EB
Caso 18	AA	GG	RR	EB
Caso 19	AG	GG	RR	MIC
Caso 20	AA	AG	PP	ESOFAGITE

Paciente	R213R	13494 g->a	R72P	Tipo Histológico
Caso 21	AA	GG	RR	ESOFAGITE
Caso 22	AA	GG	RR	MIC
Caso 23	AA	GG	RR	EB
Caso 24	AA	GG	PR	EB
Caso 25	AA	GG	PR	MIC
Caso 26	AA	GG	PR	EB

Tabela 3: haplótipo com resultados das análises dos polimorfismos R213R, 13494 g->a e R72P do gene p53. MIC: metaplasia intestinal da cárdia, EB: Esôfago de Barrett.

A análise demonstra o haplótipo conservado [AA, GG, RR] para os três polimorfismos. Os alelos apresentados no haplótipo anterior são os mais freqüentes na população em geral, com exceção do polimorfismo R72P, em que na análise anterior realizada por nosso grupo mostrou predominância do genótipo PR.

Na análise da freqüência alélica não houve diferença significativa entre os três tipos histológicos analisados (esofagite, MIC e EB) para nenhum dos três polimorfismos, R213R, 13494 g->a e R72P ($p = 0,7600$, $p = 0,8438$ e $p = 0,8557$, respectivamente).

Discussão

A perda do controle do ciclo celular e a progressão para neoplasia nos eventos com TP53 nos éxons 5 a 8 já estão bem estabelecidos. O significado funcional e a freqüência de polimorfismos nestas regiões ainda permanecem desconhecidos. Acredita-se que eles possam contribuir para uma maior suscetibilidade (ou resistência) para o desenvolvimento de neoplasia (24). Uma consistente associação entre estes polimorfismos e vários tipos de neoplasias

humanas pode servir de argumento em favor destes sítios genéticos como determinantes de suscetibilidade (35). Além disso, mutações em regiões flangeadoras a estes éxons são, provavelmente, raras, embora apresentem significado biológico.

Os genes envolvidos na carcinogênese são potenciais marcadores moleculares associados à suscetibilidade a neoplasia. Desta maneira, nós investigamos a relação entre os polimorfismos R213R e 13494g->a do gene p53 e as alterações esofágicas precoces (esofagite, MIC e EB). Além disso, inúmeros estudos indicam a associação do polimorfismo R72P no éxon 4 do TP53 e o aumento do risco para desenvolvimento de neoplasias (29,36,37,38). Dessa maneira, nós também realizamos a análise conjunta dos três polimorfismos descritos através de um haplótipo.

No presente estudo, a distribuição genotípica dos polimorfismos R213R e 13494 g->a estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto no grupo dos pacientes como dos controles. A análise genotípica dos dois polimorfismos não apresentou distribuição alélica significativamente diferentes das amostras controle, o que nos leva a inferir que não há correlação entre esses achados moleculares e os tipos histológicos analisados, embora se saiba que exista uma pronunciada variação étnica em relação à prevalência destes dois polimorfismos (33,39,40).

Analisando-se o polimorfismo R213R, Mazars *et al.*, 1992 encontrou resultados semelhantes aos nossos para carcinomas ovarianos e controles de doadores do banco de sangue, numa prevalência de 3% e 2,6% para o alelo polimórfico, respectivamente (41). Na análise do polimorfismo 13494g->a para tumores gastrointestinais e mama, Peller *et al.*, 1995 também encontrou resultados semelhantes aos nossos, com frequência do genótipo heterozigoto AG de 32% e 68% para o genótipo homozigoto GG, para o grupo de pacientes (42). Estes resultados estão de acordo com a frequência alélica descrita por

Chumakov *et al.*, 1991 que foi de 31% para o genótipo AG e 69% para o GG (43).

Já era esperado que houvesse menor proporção do polimorfismo no éxon 6, visto que a seqüência codificadora é mais conservada que a região intrônica, principalmente porque a região onde esse polimorfismo se encontra apresenta grande importância para a atividade da proteína p53. A presença maior do polimorfismo encontrado no intron 6, e a presença de LOH não representam menor importância da região não codificadora.

As diferenças eventuais encontradas entre os diferentes trabalhos podem ser atribuídas a diferenças étnicas entre os grupos estudados (44). Diferentes atributos genéticos podem conferir proteção ou risco para o desenvolvimento de neoplasia em populações de ancestralidades diferentes (45). Entretanto, outras razões tais como tamanho de amostra, fonte de DNA e técnicas utilizadas devem também serem consideradas (44).

Na análise conjunta com o polimorfismo R72P previamente analisado por nosso grupo, observou-se frequência similar para controles e pacientes. Conforme tabela 3, o haplótipo mais freqüente foi [AA, GG, RR], que ocorreu em 34,6% dos pacientes analisados. Como o haplótipo mais freqüente é o mesmo no grupo de pacientes e controle, podemos pensar novamente que a ausência de associação entre estes três polimorfismos e as alterações esofágicas seja devido ao fato de que alterações moleculares somente possam ser identificadas em estágios mais avançados da seqüência tecido normal-metaplasia-adenocarcinoma.

Os achados de LOH estão de acordo com a ocorrência de instabilidade genômica presentes nos diferentes tipos de neoplasias, além de servir de estímulo para o entendimento dos processos de reparo de DNA nos eventos de replicação e recombinação (19). Todas as amostras de tecido apresentaram o alelo selvagem indicando que as células com os polimorfismos analisados eram

heterozigotas ou que muitas células normais (sem polimorfismos) estavam presentes no tecido do qual o DNA foi extraído (1,46). Este fato pode ter subestimado os achados de LOH no nosso estudo.

A perda alélica associada à carcinogênese de esôfago foi encontrada por Kawaguchi para o polimorfismo do códon 72 (47). Anormalidades envolvendo o TP53 são comuns em adenocarcinoma de esôfago e têm sido detectadas em tecidos pré-malignos que circundam o câncer esofágico (48,49). Neshat *et al.*, 1994 relatou as alterações moleculares e genômicas identificando LOH em 94% dos adenocarcinomas e 88% de mutações em TP53. Perda alélica do 17p tem sido detectada em estágios iniciais de metaplasia e displasia de alto grau, levando a aneuploidia e sugerindo que a inativação do TP53 seja um passo inicial na carcinogênese (10). Os dois casos de LOH localizados no intron 6 reforçam os dados da literatura desses eventos estarem presentes em tecidos alterados, e também realça a presença de alterações dentro da região não codificadora. Estas alterações podem alterar o fenótipo da proteína a ser codificada e tem grande utilidade na compreensão da expressão gênica.

Segundo Campomenozi *et al.*, 1996 a associação dos achados moleculares com o tipo histológico acontece a partir do desenvolvimento do Esôfago de Barrett (1) visto que a metaplasia tipo I (comum em EB) seria mais sensível aos danos provocado pela DRGE e conseqüentemente propenso ao desenvolvimento de aneuploidias do que os tecidos analisados em nosso estudo (50). Sem dúvida, essa poderia ser a explicação para nossos resultados não diferirem da população controle, uma vez que foram avaliados tecidos em estágios iniciais no desenvolvimento para EB.

Está crescendo a evidência de que novos mecanismos incluindo mutações em sítios de *splicing*, introns e regiões promotoras estejam envolvidas na expressão gênica. A identificação destas alterações pode favorecer a seleção

de pacientes com maior risco para desenvolvimento de neoplasia permitindo a otimização de tratamentos (29).

Considerando nossos resultados em relação à frequência alélica, genotípica e do haplótipo dos polimorfismos R213R, 13494g->a e R72P do gene p53 em pacientes e controles, podemos concluir que estes três sítios não representam determinantes genéticos de suscetibilidade ao câncer esofágico, nos estágios analisados. Estudos adicionais são necessários para investigar estes dois polimorfismos em estágios mais avançados da carcinogênese.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio editorial do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brasil) e apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Referências Bibliográficas

1. Campomenosi P, Conio M, Bogliolo M, Urbini S, Assereto P, Aprile A, et al. p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia of intestinal type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996; 5:559-565.
2. Blount PL, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Reid BJ. Barrett's adenocarcinoma arises within a single aneuploid population. *Gastroenterology*. 1990; 98:A273.
3. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine CS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology*. 1992; 102: 1212-1219.
4. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 1987; 93:1-11.
5. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest*. 1989; 60:65-71.

6. Robert ME, Washington MK, Lee JR, Bronner MP, Burgart LJ, Goldblum JR, et al. Diagnosis of dysplasia in Barrett's Esophagus by immunohistochemistry of nuclear proliferation (p53) and cellular trafficking (RAB 11). *Gastroenterol.* 2000; 118:A228.
7. Sanders DSA, Taniere P, Harrison RF, Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's Esophagus. *Curr Diag Pathol.* 2003; 9:235-241.
8. Younes M, Ertan A, Lechago J. p53 protein and malignant progression in Barrett's metaplasia (Barrett's Esophagus). *Am J Gastroenterol.* 2003; 98(5): 1200-1201.
9. Casson A, Tammermagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophagus cancer: association with clinical/pathological features, risk factors and survival. *Mol Pathol.* 1998; 51:71-79.
10. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC. Barrett's esophagus: a model of human neoplastic progression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1994; 59:577-583.
11. Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2005; 166: 35-46
12. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000; 77:81-137.
13. Smith ML, Fornace AL. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol.* 1995; 7(1):69-75.
14. Chang F, Syrjanen K. Implications of p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol.* 1995; 13(4):1009-1022.
15. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacol Sci.* 2004; 25(4):177-181.
16. Lin J, Beer DG. Molecular biology of upper gastrointestinal malignancies. *Seminars in Oncol.* 2004; 31(4):476-486.
17. Feagins LA, Souza RF. Molecular targets for treatment of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus.* 2005; 18:75-86.
18. Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Lett.* 2003; 189:91-96.
19. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr O Oncol.* 2002; 14:65-72

20. Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RNK. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (Índia): a high-incidence area. *Int J Cancer*. In press 2005.
21. Pütz A, Hartmann A, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk área (southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer*. 2002; 98:99-105.
22. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis*. 1999; 14:229-233.
23. Wang LD, Zheng S, Zheng, ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(6): 1156-1164.
24. 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 Gen Cytogen*. 2003; 140:20-30.
25. Shaheen N, Ransohoff D. Gastroesophageal reflux, Barrett's Esophagus and esophageal cancer. *JAMA*. 2002; 287 (15):1972-1981.
26. IARC Homepage – International Agency for Research no Cancer – p53 polymorphisms [periódico da Internet] 2005 [acesso 23 dezembro 2005] Disponível em: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>
27. Olschwang S, Laurent-Puig P, Vassal A, Salmon R, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the TP53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet*. 1991; 86:369-370.
28. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandios DA. P53 codon 72 polymorphism and association with bladder cancer. *Cancer Letters*. 2002; 179:175-183.
29. Lacerda LL, Serrano SV, Mathes A, Rey JA, Bello MJ, Casartelli C. An intronic variant in the TP53 gene in a Brazilian woman with breast cancer. *Cancer Gen and Cytogenetics*. 2005; 160:160-163.
30. Segal SL, Pilger DA, Kaspary APB, Lopez P, Segal F. The p53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett's Esophagus compared to normal controls. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. In press, 2006.
31. Segal F, Kaspary APB, Prolla JC, Leistner S. p53 overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus. *Cancer Letters*. 2004; 210:213-218
32. Miller SA, Dikes DD, Polensky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res*. 1998; 16(7): 1215.

33. Akar N, Akar E, Cyn P. p53 genes polymorphism in the Turkish population. *Turk L Hematol.* 1999; 16(4):187-189.
34. NCI Homepage - National Cancer Institute [periódico da Internet] 2005 [acesso 23 abril 2005] Disponível em: <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm>
35. Biros E, Kalina I, Kohut A, Bogyova E, Salagovic J, Sulla I. Allelic and haplotype frequencies of the p53 polymorphism in brain tumor patients. *Physiol Res.* 2002; 51:59-64.
36. Malcolm EK, Baber GB, Boyd James C, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol.* 2000; 13(4):373-378.
37. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, Gorogh, T, Heidorn K, Rudert H. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res.* 2000; 20(4):2613-2616.
38. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kunishima S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K., Saito H, Ohno, R. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2000; 24(4):349-352.
39. Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, A., Holmberg, P.A., Kivela, A., Beckman, L. Is polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered.* 1994; 44:266-270.
40. Sjalander, A., Birgander, R., Saha, N., Beckman, L., Beckman, G. p53 and polymorphism and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered.* 1996; 46:41-8.
41. Mazars GR, Jeanteur P, Lynch HT, Lenoir G, Theillet C. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene.* 1992; 7(4):781-782.
42. Peller S, Kolipova Y, Slutzki S, Halevy A, Kvitko K, Rotter V. A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility. *DNA Cell Biol.* 1995; 14(12):983-990.
43. Chumakov PM, Jenkins JR. BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nuclei Ac Res.* 1991; 19(24):6969.
44. Brenna SMF, Silva IDCG, Zeferino LC, Prereira JS, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prognostic value of p53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecol Oncol.* 2004; 93:374-380.
45. Rocha AP. Avaliação de polimorfismos no proto-oncogene Ret em pacientes com carcinoma medular de tireóide. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
46. Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, et al. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:1729-1735.

47. Kawaguchi, H., Ohno, S., Araki, K., Miyzaki, M., Saeki, H., Watanabe, M., Tanaka, S., Sugimachi, K. p53 Polymorphism in Human Papillomavirus-associated Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:2753-2755.
48. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. P53-mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Res.* 1999; 59:4784-4787.
49. Reid B, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, et al. Predictors of progression in Barrett's Esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96(10): 2839-2848.
50. Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(19):2998-3001.

ARTIGO 2
VERSÃO EM INGLÊS

Artigo não submetido

Analysis of R213R and 13494 g->a polymorphisms of the p53 gene in individuals with esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus compared with a control group.

Diogo André Pilger¹; Patrícia Luciana da Costa Lopez²; Fábio Segal³; Sandra Leistner-Segal²

1. Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul
2. Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas in Porto Alegre
3. Institute of the Digestive Tract (Instituto do Aparelho Digestivo - IAD)

Correspondence to the author at:

Diogo André Pilger
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.
Phone: +55 (51) 3316-8011/ 51-91149206
Fax: +55 (51) 3316-8010
E-mail: pilger@terra.com.br

Abstract

Objectives: the polymorphism R213R located in exon 6 and the polymorphism 13949 g->a polymorphism in intron 6 are rarely studied, with an estimate frequency not yet available for the Brazilian population. The objective of this study is to evaluate the frequency of these two polymorphisms in a control population from Porto Alegre and verify its relationship with alterations in the esophageal tissue, as well as loss of heterozygosity in samples of altered esophagus tissues when compared with normal tissue. Furthermore, it also purports to build a haplotype for both polymorphisms collectively analyzed with the R27P polymorphism of exon 4 of the TP53, previously analyzed by our group.

Results: a total of 45 patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) symptoms diagnosed by upper digestive endoscopy and confirmed by biopsy. The analysis of both polymorphisms did not present a significantly different allele distribution compared to the control samples, which leads us to conclude that there is no correlation, at these stages. There was only one patient with LOH when analyzed for exon 6 polymorphism and two patients for intron 6 polymorphism.

Conclusions: we can conclude that these three sites do not represent genetic susceptibility determiners for esophageal cancer at the analyzed stages.

Key-words: polymorphism, p53, esophagus

Introduction

Barrett's esophagus (BE) is a complication of the gastroesophageal reflux disease in which, in around 10% of patients, the normal squamous epithelium is replaced by specialized columnar epithelium (1). The progressive evolution of the normal esophageal epithelium into the columnar-type epithelium in Barrett's Esophagus is characterized by a complex sequence of events that begin by an inflammation of the normal squamous epithelium (esophagitis), resulting from chronic reflux, followed by intestinal metaplasia of the cardia (IMC) and BE, increasing levels of dysplasia, and adenocarcinoma. This process is modulated by environmental stimuli and genetic predisposition that result in genomic instability. Cells with multiple developed genetic abnormalities result in cellular clones with accrued genetic errors. Some clones acquire proliferative advantage and may develop capacity for invasion, resulting in neoplasia (2).

Several studies have focused on the metaplasia-adenocarcinoma transition while little is still known with respect to molecular factors that contribute to the development of alterations preceding intestinal metaplasia (3, 4, 5). The activity of several genes has been used to pinpoint alterations in the progression that leads to dysplasia and adenocarcinoma. Detecting mutations in the p53 gene (TP53) has been identifying in posterior stages to BE (6, 7, 8). With respect to esophageal adenocarcinoma, there are strong evidences showing involvement of TP53 in prognosis of patients, reducing their life span (9).

In 1994 Neshat *et al.* described the molecular alterations related to esophagus neoplasia. Gene mutations in the tumor-suppressing p53 gene were the abnormalities most commonly reported. The incidence of mutations tends to increase with the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma progression, ranging from rare in non-dysplastic epithelium to up to 90% in adenocarcinoma (10, 11).

The p53 gene is formed by 11 exons that code a 393-aminoacid phosphoprotein (12, 13, 14). It works as a tumor suppressor gene, functioning in

association with other genes involved in regulating the cell cycle and has a key role in the control of cell proliferation, apoptosis (programmed cell death), synthesis, and DNA repair (15).

The p53 gene has been associated with the development of aneuploidies, genomic instability, loss of heterozygosity and several kinds of mutations and polymorphisms (16, 17). In the majority of such alterations where the mutation is recessive, tumor cells often retain the mutated allele alone and drop the wild one, whereas the blood retains both alleles. This is called loss of heterozygosity (LOH) (18). Missense mutations are the primary mechanism of allelic inactivation and TP53 has been confirmed as the main target of this inactivation, followed by LOH acting as the chief mechanism of genetic predisposition to cancer development (19).

Invariably, such alterations are located between exons 5 to 8 where the DNA-binding domain with protein p53 (20,21,22,23) is contained. Mutations in flanking regions of exons 5 to 8 are uncommon, although they can be biologically significant (24,25).

In addition to mutations, various polymorphisms have been reported as located both at coding and non-coding regions of the gene (26). Studies indicate that the preferential polymorphic alleles of the gene may be involved with susceptibility and predisposition to cancer, it being possible to identify them by use of restriction enzymes (18,27, 28).

The majority of polymorphisms found in the p53 gene are located in introns, outside the consensus region of splicing sites. There are 20 polymorphisms described in exons and in introns. Mutations in splicing sites or introns are seldom found in databases since the majority of studies focus on coding regions (29)

The polymorphism in codon 213 located in exon 6 and the polymorphism 13949 g->a polymorphism in intron 6 are rarely studied, with an

estimate frequency not yet available for the Brazilian population (26). The R213R polymorphism retains the arginine amino acid, the most frequent codon being CGA and the polymorphic, CGG. The polymorphism in region 13494 of intron 6 shows one adenine replacing guanine. No phenotypic differences were reported in both cases.

The objective of this study is to evaluate the frequency of these two polymorphisms in a control population from Porto Alegre and verify its relationship with alterations in the esophageal tissue, as well as loss of heterozygosity in samples of altered esophagus tissues when compared with normal tissue. Furthermore, it also purports to build a haplotype for both polymorphisms collectively analyzed with the R27P polymorphism of exon 4 of the TP53, previously analyzed by our group (30).

Materials and Methods

Patients: To R213R polymorphism analysis a total of 35 patients (17 female and 18 male; ages ranging between 23 and 82 years; average of 51,1 years). To 13494 g->a polymorphism analysis a total of 45 individuals (22 female and 23 male; ages ranging between 23 and 82 years; average of 51,4 years) with gastroesophageal reflux disease (GERD) symptoms diagnosed by upper digestive endoscopy and confirmed by biopsy. The biopsies were analyzed according described for Segal *et al.*, 2004 (31). For controls, 100 donor samples from Hospital de Clínicas in Porto Alegre Blood Bank were analyzed.

DNA extraction: DNA from samples of patients and controls was extracted from 10mL of peripheral blood collected in EDTA through the same modified salt precipitation technique described by Miller *et al.*, 1988 (32). In the group of patients showing esophageal alterations, the same protocol was performed with respect to tissue samples collected at endoscopy time.

Conditions for polymerase chain reaction (PCR): The long PCR technique on exons 5 to 8 of the p53 gene was set as standard. Hence, 5 forward (5'CTGCCCTGACTTTCAACTCTG3') and 8 reverse (5'TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC3') primers were used, according to Segal *et al.*, 2004 (31). Amplifications were carried out using approximately 200 ng DNA, 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 5µL enzyme buffer (Tris-HCl 200mM, KCl 500mM), 5µL dNTP 0.2mM (Invitrogen™), 1.5µL MgCl₂ (50mM), and 1.0µL of each specific primer at a concentration of 20 pmol for a final reaction volume of 50µL. Using a thermocycler, a program was started with initial denaturation at 94°C for 1 minute, followed by 35 cycles of 40 seconds at denaturation temperature of 94°C, annealing temperature of 55°C; extension temperature of 72°C and final extension at 72°C for 10 minutes. The amplification results in a 1619 pb fragment that is visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Digestion with restriction enzymes

R213R (exon 6) polymorphism: to identify the exon 6 R213R polymorphism, digestion on the long PCR product was carried out using the *Taq I* (New England BioLabs™) enzyme to cleave the T'CGA site, according to the manufacturer's instructions. The digestion used 10 µL of the PCR product and 2 U of the enzyme in a total final volume of 30 µL. The reaction was kept at 65°C on thermocycler program for 2 hours and 30 minutes. Fragments resulting from cleavage with the *Taq I* enzyme in the PCR product are of 385, 309 and 925 pb in the presence of the CGA sequence, and 694 and 925 pb in the presence of the CGG sequence.

13494 g->a (intron 6) polymorphism: to identify the intron 6 13494 g->a polymorphism, digestion on the long PCR product was carried out using the *Msp I* (New England BioLabs™) enzyme to cleave the C'CGG site, according to the manufacturer's instructions. The digestion used 10 µL of the PCR product and 2 U of the enzyme in a total final volume of 30 µL. The reaction was incubated at

37°C in dry bath. Fragments resulting from cleavage with the *Msp I* enzyme in the PCR product are of 124, 356, 276, 299, 168, 276 and 120 pb in the presence of the CGG sequence, and 124, 632, 299, 168, 276 and 120 pb in the presence of the CAG sequence.

Both digestion products were subject to electrophoresis in 3% agarose gel. The band pattern found is visualized in figure 1.

The statistical analysis of results was performed using a Pearson's chi-square test in the MedCalc™ software.

Results

Clinical Signs

All patients showed signs of GERD. For R213R polymorphism analysis, 20% (7/35) showed esophagitis, 37,1% (13/45) showed IMC and 42,9% (15/35) showed BE. For the 13494 g->a polymorphism, 27% (12/45) showed esophagitis, 37,8% (17/45) IMC and 35,6% (16/45) BE.

Long PCR technique standardization

The presented methodology proved to be adequate for amplification of a relatively long segment involving 4 significant exons for the p53 protein function, as shown in figure 1.

Identification of R213R (exon 6) polymorphism

In both patients and controls a predominance in the allele (A) was noted, with no homozygosis for the polymorphic allele (G) being reported. This was only found in heterozygosis in two individuals in the patients group and four in the control group, as shown on Table 1. The frequencies found for this polymorphism were notably similar in both groups, without significant difference in neither the genotypic nor allelic analysis ($p = 0,958$ e $p = 0,957$, respectively).

The two patients presenting the allele (G) in heterozygosis showed IMC and BE.

These results were compared with literature data and no significant difference was observed among frequencies of the polymorphic allele ($p = 0.978$) (33). When comparing with an American population, no significant difference was also found, not even in comparison with Afro-American, Caucasian and Hispanic subpopulations within the same study ($p = 0,913$, $p = 0,726$, $p = 0,736$ e $p = 0,687$, respectively) (34).

Figure 1 shows the result of a *Taq I* digestion, highlighting the possible alleles.

Group	Genotype			Allele	
	AA	AG	GG	A	G
Controls (n=100)	96 (0,960)	4 (0,040)	0 (0,00)	196 (0,980)	4 (0,02)
Patients (n=35)	33 (0,943)	2 (0,057)	0 (0,00)	68 (0,971)	2 (0,028)

Table 1: Genotypic and allele frequency of the R213R polymorphism in patients and controls

Identification of the 13494 g -> a (intron 6) polymorphism

In both samples and controls a predominance in the allele (G) was noted, with homozygosis found for the polymorphic allele (A) in 4 individuals of the control group and none in the patient group, as shown on Table 2. The distribution of the polymorphic allele (A) was greater among the sample control individuals when compared with the R213R polymorphism. As with the exon 6 polymorphism, the frequency analysis of the intron 6 polymorphism did not present a significant difference for comparing the patients group with the control group for both the genotypic and allelic analysis ($p = 0,607$ and $p = 0,395$, respectively).

The patients that presenting the polymorphic allele (A) showed esophagitis (4/45), IMC (5/45) and BE (3/45).

When the frequencies found in our population were superimposed over the literature data, a significant difference was noted. The population analyzed in the Akar *et al.*, 1999 study showed a frequency of 0,3 polymorphic alleles, thus differing from the findings in this study, which were 0,165 ($p = 0.008$) (33).

When comparing with an American population, no significant difference was also found, not even in comparison with Afro-American, Caucasian, Hispanic and Pacific Coast subpopulations within the same study ($p = 0,928$, $p = 0,404$, $p = 0,467$, and $p = 0,723$, respectively) (25).

Group	Genotype			Allele	
	AA	AG	GG	A	G
Controls (n=100)	4 (0,040)	25 (0,250)	71 (0,710)	33 (0,165)	167 (0,835)
Patients (n=45)	0 (0,000)	12 (0,267)	33 (0,733)	12 (0,133)	78 (0,867)

Table 2: Genotypic and allele frequency of the 13494g->a polymorphism in patients and controls

Figure 1 shows the result of a *Msp I* digestion, highlighting the possible alleles.

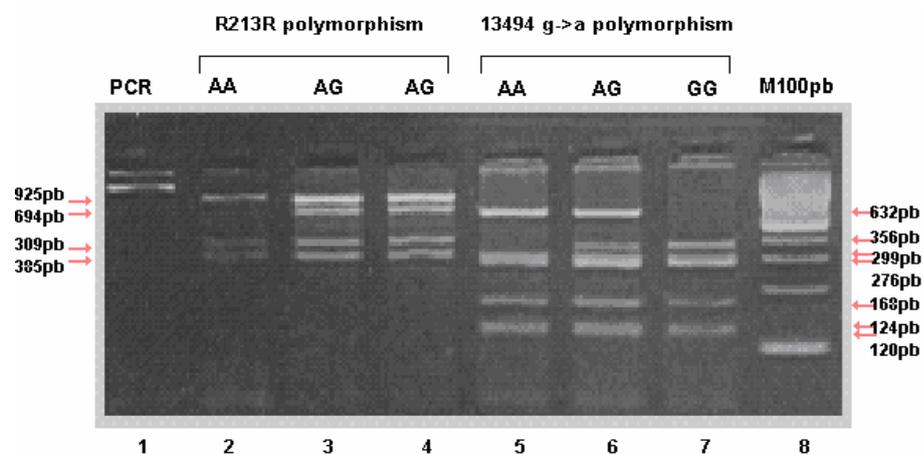


Figure 1: Agarose gel (3.0%) showing long PCR results and digestions carried out with *Taq I* and *Msp I*. Position 8 shows the 100 pb molecular weight marker. Position 1 shows the long PCR product concerning exons 5 to 8 in the TP53. Positions 2, 3 and 4 show the allelic patterns AA and AG for the R213R polymorphism. Positions 5, 6 and 7 show the allelic patterns AA, AG and GG for the 13494 g->a polymorphism.

Loss of Heterozygosity (LOH)

The analysis consisted in 25 pairs of blood and tissue samples from patients for the R213R polymorphism, and 27 pairs of samples for the 13494g->a polymorphism. Only individuals with a heterozygous pattern in the peripheral blood were assayed within this analysis, which in the patients group represented a frequency of 0,080 for the R231R polymorphism and of 0,330 for the 13494 g->a polymorphism.

Only a single instance (4,0%) of LOH was found when analyzing the exon 6 polymorphism, a patient carrying BE. For the intron 6 polymorphism, LOH was confirmed in two patients (7,4%), a carrier of esophagitis and another one BE. The polymorphic allele present in the peripheral blood sample was not kept in the tissues of these two patients, confirming the stress in such tissues even when the wild allele was preserved.

Haplotype analysis for the R213R, 13494 g->a and R72P polymorphisms

The R213R and 13494 g->a polymorphisms were analyzed setting with R27P polymorphism of exon 4 of the TP53, previously analyzed by our grouping the same group of patients. Analysis consisted of 26 patients for the 3 polymorphisms collectively. The genotypic patterns obtained are shown in table 3.

Patient	R213R	13494 g->a	R72P	Histological Type
Case 1	AA	GG	PR	BE
Case 2	AA	AG	RR	BE
Case 3	AA	AG	RR	BE

Paciente	R213R	13494 g->a	R72P	Tipo Histológico
Case 4	AA	GG	PR	BE
Case 5	AA	AG	PR	IMC
Case 6	AA	GG	PR	ESOPHAGITIS
Case 7	AA	AG	RR	ESOPHAGITIS
Case 8	AA	GG	RR	IMC
Case 9	AA	GG	RR	BE
Case 10	AA	GG	RR	IMC
Case 11	AA	GG	PR	BE
Case 12	AA	GG	PR	BE
Case 13	AA	AG	PR	IMC
Case 14	AA	GG	RR	ESOPHAGITIS
Case 15	AA	AG	PR	IMC
Case 16	AA	GG	RR	IMC
Case 17	AG	AG	PR	BE
Case 18	AA	GG	RR	BE
Case 19	AG	GG	RR	IMC
Case 20	AA	AG	PP	ESOPHAGITIS
Case 21	AA	GG	RR	ESOPHAGITIS
Case 22	AA	GG	RR	IMC
Case 23	AA	GG	RR	BE
Case 24	AA	GG	PR	BE
Case 25	AA	GG	PR	IMC
Case 26	AA	GG	PR	BE

Table 3: R213R, 13494 g->a and R72P polymorphism of TP53 haplotype analysis. IMC: intestinal metaplasia of cardia, BE: Barrett's Esophagus.

The analysis demonstrates the haplotype conserved [AA, GG, RR] for the three polymorphisms. The alleles present in the previous haplotype are the

most frequent in the general population, except for the R72P polymorphism that in the previous analysis carried out by our group showed predominance of the PR genotype.

In the allelic frequency analysis there were no significant difference between the three histological type (esophagitis, IMC and BE) for none polymorphism, R213R, 13494 g->a and R72P ($p = 0,7600$, $p = 0,8438$ e $p = 0,8557$, respectively).

Discussion

The loss of cell cycle control and the progression to cancer in TP53 events in exons 5 to 8 are already well established. The functional significance and the frequency of polymorphisms in these regions still remain unknown. It is believed that they may contribute to a higher susceptibility (or resistance) to developing cancer (24). A consistent association between these polymorphisms and several types of human neoplasias may serve as argument in support of confirming such sites as susceptibility determiners (26). Furthermore, mutations in flanking regions of these exons are probably rare in spite of the biological significance they present.

The genes involved with tumor genesis are potential molecular markers associated to susceptibility to cancer. We thus investigated the relationship linking the R213R and 13494g->a polymorphisms of the p53 gene and the precocious esophageal alterations (esophagitis, IMC and BE). Also, countless studies indicate an association between the R72P polymorphism at exon 4 of TP53 and the increase in risk of developing neoplasias (29,36,37,38). Hence, we also carried out a joint analysis of the three polymorphisms described by means of a haplotype.

In the present study the genotypic distribution of the R213R and 13494 g->a polymorphisms are in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium in the

patient group as well as in the control group. The genotypic analysis of both polymorphisms did not present a significantly different allele distribution compared to the control samples, which leads us to conclude that there is no correlation, at these stages, between such molecular findings and the histological types, although a strong ethnic variation with regard to the prevalence of these two polymorphisms (30, 31, 32) is known to exist.

While analyzing the R213R polymorphism, Mazars *et al.*, 1992 obtained results similar to ours for ovarian carcinoma and blood bank donor controls with prevalence of 3% and 2,6 % for the polymorphic allele, respectively (41). In the analysis of the 13494g->a polymorphism for gastrointestinal and mammary tumors, Peller *et al.*, 1995 also found results similar to ours, with frequencies of the heterozygous AG genotype of 32% and 68% for homozygous GG genotypes, for the patient group (42). These results match the allele frequency described by Chumakov *et al.*, 1991 that was 31% for the AG genotype, and 69% for the GG genotype (43).

It was anticipated that there would be a smaller proportion of the polymorphism in the exon 6 since the coding sequence is more conserved than the intronic region, mainly because the region in which this polymorphism is located carries great significance to the activity of the p53 protein. An increased presence of the polymorphism found in the intron 6 and the presence of LOH do not represent a lesser importance of the non-coding region.

Eventual differences detected in the different studies may be ascribed to ethnic differences between the groups studied (44). Different genetic attributes may bestow protection against or risk of developing cancer in populations of diverse ancestries (45). However, other reasons such as sample size, DNA source, and techniques employed should also be taken into consideration (44).

In the combined analysis with the R72P polymorphism previously studied by our group, a similar frequency was observed in both controls and

patients. According to table 3, the most frequent haplotype was [AA, GG, RR] which occurred in 34,6% of analyzed patients. Since the most frequent haplotype is the same in patient and control groups, we may think again that the absence of association between these three polymorphisms and the esophageal alterations stems from the fact that molecular alterations can only be identified in more advanced stages of the normal tissue-metaplasia-adenocarcinoma progression.

The LOH findings are in agreement with the occurrence of genomic instability seen in various types of cancer, and serve as encouragement to the understanding of DNA repair processes in replication and recombination events (19). All tissue samples presented the wild allele indicating that cells carrying the analyzed polymorphisms were heterozygotic or that many normal cells (lacking polymorphism) were present in the tissue from which DNA was extracted (1,46). This fact may have minimized the LOH findings in our study.

The allelic loss associated to esophageal carcinogenesis was found by Kawaguchi for the codon 72 polymorphism (47). Abnormalities involving the TP53 are common with esophageal adenocarcinoma and have been detected in pre-malignant tissues surrounding the esophageal cancer (48,49). Neshat *et al.*, 1994 reported molecular and genomic alterations identifying LOH in 94% of Barrett cancers and 88% of mutations in the TP53. Allelic loss of 17p has been detected in initial stages of high-degree metaplasia and dysplasia, leading to aneuploidy and suggesting that inactivation of the TP53 is a first step in carcinogenesis (10). Both cases of LOH located in the intron 6 reinforce the data in literature for these events being found in altered tissues and also highlight the presence of alterations within the non-coding region. Such alterations may alter the phenotype of the protein being coded and are of considerable value in understanding the genic expression.

According to Campomenozi *et al.*, 1996 the association of the molecular findings with the histological type occurs upon development of the Barrett's

Esophagus (1) since the type I metaplasia (common in BE) would be more responsive to damage caused by GERD and therefore more prone to developing aneuploidies than the tissues analyzed in our study (50). Without doubt, this could provide an explanation to the fact that our results do not differ from those in the control population, since the tissues assayed were in early stages of BE development.

There is increasing evidence that new mechanisms including mutation in splicing sites, introns and promoter regions are involved in the genic expression. Identification of these alterations may help select patients with a higher risk of developing cancer, allowing optimization of treatments (29).

Considering our data with regard to incidence of alleles, genotypes and haplotypes of the R213R, 13494g->a and R72P polymorphisms of the p53 gene in patients and controls, we can conclude that these three sites do not represent genetic susceptibility determiners for esophageal cancer at the analyzed stages. Additional studies are required in order to investigate these two polymorphisms in advanced stages of carcinogenesis.

Acknowledgements

This work received editorial support from the Research and Postgraduate Group of Hospital de Clínicas in Porto Alegre (RS, Brazil) and financial support from the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Research Support Fund/Hospital de Clínicas in Porto Alegre (FIPE-HCPA).

References

1. Campomenosi P, Conio M, Bogliolo M, Urbini S, Assereto P, Aprile A, et al. p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia of intestinal type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996; 5:559-565.

2. Blount PL, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Reid BJ. Barrett's adenocarcinoma arises within a single aneuploid population. *Gastroenterology*. 1990; 98:A273.
3. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine CS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology*. 1992; 102: 1212-1219.
4. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 1987; 93:1-11.
5. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest*. 1989; 60:65-71.
6. Robert ME, Washington MK, Lee JR, Bronner MP, Burgart LJ, Goldblum JR, et al. Diagnosis of dysplasia in Barrett's Esophagus by immunohistochemistry of nuclear proliferation (p53) and cellular trafficking (RAB 11). *Gastroenterol*. 2000; 118:A228.
7. Sanders DSA, Taniere P, Harrison RF, Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's Esophagus. *Curr Diag Pathol*. 2003; 9:235-241.
8. Younes M, Ertan A, Lechago J. p53 protein and malignant progression in Barrett's metaplasia (Barrett's Esophagus). *Am J Gastroenterol*. 2003; 98(5): 1200-1201.
9. Casson A, Tammermagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophagus cancer: association with clinical/pathological features, risk factors and survival. *Mol Pathol*. 1998; 51:71-79.
10. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC. Barrett's esophagus: a model of human neoplastic progression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1994; 59:577-583.
11. Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res*. 2005; 166: 35-46
12. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000; 77:81-137.
13. Smith ML, Fornace AL. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol*. 1995; 7(1):69-75.
14. Chang F, Syrjanen K. Implications of p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*. 1995; 13(4):1009-1022.
15. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacol Sci*. 2004; 25(4):177-181.
16. Lin J, Beer DG. Molecular biology of upper gastrointestinal malignancies. *Seminars in Oncol*. 2004; 31(4):476-486.

17. Feagins LA, Souza RF. Molecular targets for treatment of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus*. 2005; 18:75-86.
18. Baccouche S, Mabrouk I, Said S, Mosbah A, Jlidi R, Gargouri A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Lett*. 2003; 189:91-96.
19. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr O Oncol*. 2002; 14:65-72
20. Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RNK. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (India): a high-incidence area. *Int J Cancer*. In press 2005.
21. Pütz A, Hartmann A, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer*. 2002; 98:99-105.
22. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis*. 1999; 14:229-233.
23. Wang LD, Zheng S, Zheng, ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(6): 1156-1164.
24. 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 Gen Cytogen*. 2003; 140:20-30.
25. Shaheen N, Ransohoff D. Gastroesophageal reflux, Barrett's Esophagus and esophageal cancer. *JAMA*. 2002; 287 (15):1972-1981.
26. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphisms. Available at: <http://www.iarc.fr/p53/index.html> Accessed December 23, 2005.
27. Olschwang S, Laurent-Puig P, Vassal A, Salmon R, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the TP53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet*. 1991; 86:369-370.
28. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandios DA. P53 codon 72 polymorphism and association with bladder cancer. *Cancer Letters*. 2002; 179:175-183.
29. Lacerda LL, Serrano SV, Mathes A, Rey JA, Bello MJ, Casartelli C. An intronic variant in the TP53 gene in a Brazilian woman with breast cancer. *Cancer Gen and Cytogenetics*. 2005; 160:160-163.

30. Segal SL, Pilger DA, Kaspary APB, Lopez P, Segal F. The p53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett's Esophagus compared to normal controls. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. In press, 2006.
31. Segal F, Kaspary APB, Prolla JC, Leistner S. p53 overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus. *Cancer Letters*. 2004; 210:213-218
32. Miller SA, Dikes DD, Polensky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res*. 1998; 16(7): 1215.
33. Akar N, Akar E, Cyn P. p53 genes polymorphism in the Turkish population. *Turk L Hematol*. 1999; 16(4):187-189.
34. NCI Homepage - National Cancer Institute. Available at: <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm> Accessed April 23, 2005.
35. Biroš E, Kalina I, Kohut A, Bogyova E, Salagovic J, Sulla I. Allelic and haplotype frequencies of the p53 polymorphism in brain tumor patients. *Physiol Res*. 2002; 51:59-64.
36. Malcolm EK, Baber GB, Boyd James C, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol*. 2000; 13(4):373-378.
37. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, Gorogh, T, Heidorn K, Rudert H. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res*. 2000; 20(4):2613-2616.
38. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kunishima S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K., Saito H, Ohno, R. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2000; 24(4):349-352.
39. Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, A., Holmberg, P.A., Kivela, A., Beckman, L. Is polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994; 44:266-270.
40. Sjalander, A., Birgander, R., Saha, N., Beckman, L., Beckman, G. p53 and polymorphism and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered*. 1996; 46:41-8.
41. Mazars GR, Jeanteur P, Lynch HT, Lenoir G, Theillet C. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene*. 1992; 7(4):781-782.
42. Peller S, Kolipova Y, Slutzki S, Halevy A, Kvitko K, Rotter V. A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility. *DNA Cell Biol*. 1995; 14(12):983-990.
43. Chumakov PM, Jenkins JR. BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nuclei Ac Res*. 1991; 19(24):6969.

44. Brenna SMF, Silva IDCG, Zeferino LC, Prereira JS, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prognostic value of p53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecol Oncol.* 2004; 93:374-380.
45. Rocha AP. Avaliação de polimorfismos no proto-oncogene Ret em pacientes com carcinoma medular de tireóide. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
46. Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, et al. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:1729-1735.
47. Kawaguchi, H., Ohno, S., Araki, K., Miyzaki, M., Saeki, H., Watanabe, M., Tanaka, S., Sugimachi, K. p53 Polymorphism in Human Papillomavirus-associated Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:2753-2755.
48. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. P53-mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Res.* 1999; 59:4784-4787.
49. Reid B, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, et al. Predictors of progression in Barrett's Esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96(10): 2839-2848.
50. Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(19):2998-3001.

IX. ARTIGO 3
VERSÃO EM PORTUGUÊS

Artigo não submetido

**Análise molecular do gene p53 em pacientes com metaplasia intestinal da
cárdia e Esôfago de Barrett: caracterização por sequenciamento**

Diogo André Pilger¹; Patrícia Luciana da Costa Lopez²; Fábio Segal³; Sandra Leistner-Segal²

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
3. Instituto do Aparelho Digestivo (IAD)

Correspondência para o autor:

Diogo André Pilger
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-2101-8011
Fax: +55-51-2101-8010
E-mail: pilger@terra.com.br

Resumo

Objetivos: numerosos estudos mencionam as alterações moleculares relacionadas com a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de esôfago, enquanto que poucos relacionam a interação entre fatores moleculares e o desenvolvimento de alterações anteriores à displasia. As mutações no gene supressor tumoral p53 (TP53) foram as anormalidades mais comumente descritas nestes estágios. Este trabalho tem por objetivo identificar as principais alterações moleculares presentes nos éxons 5 a 8 do gene p53 em pacientes com sintomas de doença de refluxo gastroesofágico (DRGE) portadores de Metaplasia Intestinal da Cárdia (MIC) e Esôfago de Barrett (EB), diagnosticados através de endoscopia digestiva alta e biópsia

Resultados: a análise por sequenciamento revelou alterações em 37,5% pacientes analisados. As alterações no TP53 foram encontradas somente em pacientes portadores de EB sendo que as mais freqüentes foram mutações do tipo *missense*, correspondendo a 80% (8/10). Três das oito mutações *missense* descritas foram em sítios CpG.

Conclusões: a observação de mutações no TP53 em lesões pré-malignas sugere que estas podem ocorrer mesmo antes das alterações morfológicas se desenvolverem.

Palavras-chave: p53, metaplasia intestinal da cárdia, Esôfago de Barrett, sequenciamento

Introdução

Esôfago de Barrett (EB) é uma complicação da doença de refluxo gastroesofágica (DRGE) na qual, em torno de 10% dos pacientes, ocorre substituição do epitélio escamoso normal por epitélio colunar especializado (1). A evolução progressiva do epitélio esofágico normal para epitélio do tipo colunar no esôfago de Barrett caracteriza-se por uma complexa seqüência de eventos que se iniciam por uma inflamação do epitélio escamoso normal (esofagite), decorrente de refluxo crônico, seguida de metaplasia intestinal da cárdia e EB, graus crescentes de displasia e adenocarcinoma. Esse processo é modulado por estímulos ambientais e predisposição genética os quais resultam em instabilidade genômica. Células com múltiplas anormalidades genéticas desenvolvidas resultam em clones celulares com erros genéticos acumulados. Alguns clones adquirem vantagem proliferativa e podem desenvolver a capacidade de invasão, resultando em neoplasia (2).

Os aspectos histológicos fornecem poucas informações sobre o risco de progressão para malignidade (3,4). Numerosos estudos mencionam as alterações moleculares relacionadas com a seqüência metaplasia-adenocarcinoma enquanto que poucos relacionam a interação entre fatores moleculares e o desenvolvimento de alterações anteriores à displasia (5,6,7).

Em 1994, Neshat *et al.* revisou a literatura em relação à biologia molecular da neoplasia de esôfago. As mutações no gene supressor tumoral p53 (TP53) foram as anormalidades mais comumente descritas. A incidência de mutações tende a aumentar com a progressão metaplasia-displasia-adenocarcinoma, passando de raras no epitélio não displásico até 90% no adenocarcinoma (8,9). Uma revisão de mais de 2500 tumores analisados para mutações no TP53, mostrou maior freqüência destas alterações em tumores do pulmão (56%), cólon (50%), esôfago (45%), ovário (44%) e pâncreas (44%) (10, 11, 12).

Estudando-se a natureza e a freqüência das mutações no TP53 pode-se revelar a possibilidade deste gene funcionar como fator etiológico na patogênese de neoplasias humanas (13). Para o carcinoma esofágico, existe associação do TP53 no prognóstico dos pacientes, reduzindo sua sobrevivência (14).

Alterações no TP53 foram encontradas em 40 a 50% de todas as neoplasias esofágicas, mais frequentemente mutações do tipo *missense* (50 a 80%), mas também *nonsense* (10 a 50%), deleções e inserções (15). A maioria das mutações no TP53 em adenocarcinoma de esôfago são transições do tipo G:C para A:T, 89% das quais ocorrem em dinucleotídeos CpG *hotspot* 175, 176, 196, 213, 245, 248, 273 e 282 (16,17,18,19). Estes achados sugerem que a metilação do CpG desempenhe um importante papel no desenvolvimento de mutações em TP53 no adenocarcinoma associado ao EB (16,20,21). O adenocarcinoma de esôfago é o tipo de neoplasia que apresenta a maior proporção das mutações citadas anteriormente (22). Normalmente, localizam-se entre os éxons 5 a 8 do gene que contém o domínio de ligação do DNA com a proteína p53, correspondendo em torno de 80% das alterações (15,17,18,23,24). O mesmo perfil de mutações é encontrado para o adenocarcinoma da cárdia (17) e para tecidos pré-malignos (25,26).

Em um compilado de 16 trabalhos apresentados por Garewal *et al.*, 2003 estão resumidas as freqüências das alterações no TP53 no epitélio do Esôfago de Barrett de acordo com o grau de displasia (27). O perfil e a freqüência das alterações variam também de acordo com a região geográfica (23, 28) e com os diferentes carcinógenos aos quais os indivíduos são expostos (29). Em doenças inflamatórias crônicas, como a doença de refluxo gastroesofágico (DRGE), existe uma sobrecarga de radicais de oxigênio que promovem um número grande de alterações e mutações em muitos genes, incluindo o TP53 (30).

Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo identificar as principais alterações moleculares presentes nos éxons 5 a 8 do gene p53 em pacientes com Metaplasia Intestinal da Cárdia (MIC) e Esôfago de Barrett (EB) em pacientes com sintomas de DRGE em uma população representativa de Porto Alegre.

Materiais e Métodos

Pacientes: Foram avaliados 16 pacientes (8 femininos e 8 masculinos; idades entre 23 e 72 anos; média de 54,3 anos) que realizaram endoscopia digestiva alta, entre março de 2004 e março de 2005 no Hospital Moinhos de Vento em Porto Alegre. Estes pacientes apresentavam sintomas de DRGE, diagnosticados através de endoscopia digestiva alta e confirmados através de biópsia. As biópsias foram analisadas conforme descrito por Segal *et al.*, 2004 (31).

Extração de DNA: As amostras tiveram DNA extraído de 10mL de sangue periférico coletado em EDTA através da técnica modificada de precipitação por sais descrita por Miller *et al.*, 1988 (32). O mesmo procedimento foi realizado para amostras de tecido esofágico coletadas no momento da endoscopia.

Condições para reação em cadeia da polimerase (PCR): Foi padronizada a técnica de PCR longo envolvendo os éxons 5 a 8 do gene p53. Para isso foram utilizados *primers 5 forward* (5´ CTGCCCTGACTTTCAACTCTG 3´) e *8 reverse* (5´ TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC 3´) de acordo com Segal *et al.*, 2004 (31). As amplificações foram realizadas utilizando em torno de 200 ng de DNA, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 5µL de tampão para enzima (Tris-HCl 200mM, KCl 500mM), 5µL de dNTP 0,2mM (Invitrogen®), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,0µL de cada *primer* específico na concentração de 20 pmol para volume final de reação de 50µL. Em termociclador utilizou-se o programa com desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à temperatura de 94°C de desnaturação, temperatura de anelamento

de 55°C; 72°C de extensão e extensão final de 72°C por 10 minutos. A amplificação resulta em um fragmento de 1619 pb que é visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Sequenciamento automatizado: Os produtos de PCR purificados foram utilizados diretamente para o sequenciamento de DNA. As amostras foram seqüenciadas utilizando dois primers (forward e reverse) de acordo com o éxon a ser amplificado, conforme Segal *et al.*, 2004 (31). As reações foram realizadas utilizando o kit Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems®) baseada na fluorescência marcada dos dideoxi-nucleotídeos, conforme orientações do fabricante. A reação de sequenciamento consistia de 34 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos e 4°C por 10 minutos. As amostras foram analisadas no seqüenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Resultados

Padronização da técnica de PCR longo: A técnica de PCR longo utilizando somente os primers 5 *forward* e 8 *reverse* se mostrou adequada para análise dos 4 principais éxons do gene p53. O produto de PCR apresentou 1619 pb conforme visualizado na figura 1.

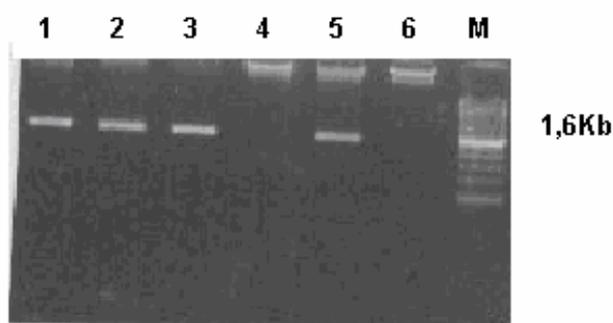


Figura 1: Gel de agarose 1,5% demonstrando resultado do PCR longo nas posições 1, 2, 3 e 5. As posições 4 e 6 demonstram produto de reação não amplificado. M representa marcador de peso molecular de 1kb.

Análise molecular do gene p53: Um total de 16 pacientes foram analisados, dos quais 37,5% (6/16) eram portadores de metaplasia intestinal da cárdia (MIC) e 56,2% (9/16) eram portadores de Esôfago de Barrett. Um único paciente, incluído no estudo, era portador de esofagite.

As análises de sequenciamento de DNA foram realizadas na região compreendida entre os éxons 5 e 8 do gene p53 tanto para as amostras de sangue como para as amostras de tecido obtidas a partir de biópsias para todos os pacientes. A análise direta do DNA por sequenciamento revelou alterações em 37,5% (6/16) dos pacientes analisados, conforme tabela 1. Estratificando os pacientes por tipos histológicos, observamos que todas alterações (100%) aconteceram em pacientes portadores de Esôfago de Barrett. A prevalência de alterações no sangue destes pacientes foi 31,3% (5/16). As alterações mais comuns encontradas neste estudo foram mutações do tipo *missense*, correspondendo a 80% (8/10). Três das oito mutações missense foram em sítios CpG.

Dois pacientes mostraram as mesmas alterações no sangue (controle) e no tecido (casos 1 e 7); um paciente mostrou alterações somente no sangue (caso 12); um paciente mostrou alteração somente no tecido (caso 5); dois pacientes apresentaram alterações diferentes no sangue e tecido (casos 3 e 11).

Caso	Sangue Tipo Histológico	Alteração (Éxon)	Troca de Nucleotídio	Tipo de Mutação
1	Sangue	G14483 (E8)	14483delG	Deleção
	EB	G14483 (E8)	14483delG	Deleção
2	Sangue	---	---	---
	EB	---	---	---
3	Sangue	R156G (E5) S260P (E7)	CGC -> GGC TCC -> CCC	Missense Missense
	EB	R156G (E5)	CGC -> GGC	Missense
4	Sangue	---	---	---
	Esofagite	---	---	---

Caso	Sangue Tipo Histológico	Alteração (Éxon)	Troca de Nucleotídio	Tipo de Mutação
5	Sangue	---	---	---
	EB	S227C (E7)	TCT -> TGT	Missense
6	Sangue	---	---	---
	MIC	---	---	---
7	Sangue	V156L (E5)	GTA -> CTC	Missense
	EB	V156L (E5)	GTA -> CTC	Missense
8	Sangue	---	---	---
	EB	---	---	---
9	Sangue	---	---	---
	MIC	---	---	---
10	Sangue	---	---	---
	MIC	---	---	---
11	Sangue	Q192H (E6)	CAG -> CAT	Missense
	EB	R156P (E5)	CGC -> CCC	Missense
12	Sangue	IVS6+8 (I6)	IVS6+8insA	Inserção
	EB	---	---	---
13	Sangue	---	---	---
	EB	---	---	---
14	Sangue	---	---	---
	MIC	---	---	---
15	Sangue	---	---	---
	EB	---	---	---
16	Sangue	---	---	---
	MIC	---	---	---

Tabela 1: resultados das análises por sequenciamento dos 16 pacientes analisados. Cada paciente foi analisado para sangue (controle) e tecido, classificado de acordo com a alteração encontrada no momento da biópsia (Esofagite, Metaplasia Intestinal da Cárdia MIC e Esôfago de Barrett EB). A terceira coluna apresenta a alteração molecular evidenciada, utilizando a classificação do código genético padrão e sua localização (E: éxon, I: intron) A quarta coluna mostra a troca do nucleotídeo e a quinta coluna classifica o tipo de alteração.

Discussão

Em um fluxo hipotético de alterações genéticas em direção ao adenocarcinoma de esôfago, aneuploidias e mutações no TP53 parecem ser

eventos iniciais fortemente associados ao aparecimento de displasia (1). Entretanto, os resultados referentes a estágios anteriores ao desenvolvimento de Esôfago de Barrett ainda são escassos. A prevalência de mutações no TP53 detectadas através do sequenciamento dos éxons 5 a 8 já foi previamente descrita em lesões pré-malignas e malignas (10,27,33). A utilização de diferentes primers e populações analisadas em cada estudo contribuem para a grande variação nos resultados (34).

A observação de mutações no TP53 em tecidos pré-malignos (como o EB) sugere que estas podem ocorrer mesmo antes das alterações morfológicas se desenvolverem. Além disso, devido ao pequeno número de células que possuem alterações moleculares nestes estágios, os resultados podem ser subestimados, principalmente pela grande quantidade de células inflamatórias e de estroma, consequência de alelos do tipo selvagem oriundos de células normais coletadas no momento da biópsia (35). Além disso, devido à heterogeneidade histológica desta mucosa, as alterações moleculares podem não ocorrer em todos os sítios da biópsia (36). O baixo valor preditivo positivo de análises em estágios anteriores a metaplasia certamente contribui para o baixo número de publicações. O objetivo de nosso estudo foi avaliar a presença de alterações moleculares no gene p53 em pacientes que apresentavam MIC e EB.

Segundo a IARC (International Agency for Research no Cancer), a prevalência de mutações do TP53 é de 12,5% para tecidos normais e em torno de 17% para Esôfago de Barrett. Em nosso trabalho a prevalência foi mais elevada quando comparados aos resultados apresentados pela IARC e outros grupos (10,27,33) para os dois tipos histológicos analisados. Isto poderia ser explicado pelo baixo número de amostras.

As alterações mais comuns encontradas neste estudo foram mutações do tipo *missense*, correspondendo a 80% (8/10). Estes resultados estão de acordo com os previamente descritos na literatura. Todas as alterações

encontradas já haviam sido previamente descritas em diversos tipos de tumores (12,16,17,18, 19).

Já foi demonstrado que mutações no TP53 raramente acontecem fora dos éxons 5-8 do gene (35). Nossos resultados mostram que com exceção de uma mutação (localizada no íntron 6), todas as outras ocorrem nos éxons 5 a 8, uma região altamente conservada do gene. Não foram encontradas mutações em códons *hotspots*.

As alterações no TP53 não foram associadas a distribuição por sexo o que poderia refletir o maior predomínio de adenocarcinoma de esôfago em homens (34).

A alta prevalência de alterações no sangue de pacientes portadores de Esôfago de Barrett pode refletir uma predisposição genética destes indivíduos a progredirem a estágios mais avançados em direção a neoplasia. Neste sentido, parece evidente que a associação de predisposição genética e fatores ambientais, como DRGE, desempenha papel fundamental no prognóstico dos pacientes.

No futuro, métodos de rastreamento populacional baseados em testes de suscetibilidade genética e endoscopia podem ajudar a identificar uma grande proporção de indivíduos com EB (9). Devido à natureza multifatorial da progressão neoplásica no EB e a complexidade genética do adenocarcinoma, serão necessárias a utilização de uma painel de biomarcadores para estratificar o risco dos pacientes (37).

Assim sendo, é a expressão de dano no DNA que precede a malignidade. O indicador mais precoce de neoplasia deveria ser a detecção das alterações ocorridas diretamente no DNA, antes das manifestações de displasia (38). Marcadores moleculares utilizados no diagnóstico das neoplasias esofágicas podem fornecer aos clínicos a possibilidade de estabelecer o diagnóstico de malignidade em estágios mais precoces do que outros exames

diagnósticos de imagem. O impacto de efetivos marcadores moleculares para distinguir metaplasia e displasia de adenocarcinoma será um avanço importante (39).

O prognóstico para pacientes com neoplasias esofágicas permanece bastante desfavorável. Por esta razão, os benefícios do diagnóstico precoce têm sido enfatizados, uma vez que a sobrevida está intimamente ligada ao grau de invasão tumoral (40).

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio editorial do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brasil) e apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Referências Bibliográficas

1. Campomenosi P, Conio M, Bogliolo M, Urbini S, Assereto P, Aprile A, et al. p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia of intestinal type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996; 5:559-565.
2. Blount PL, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Reid BJ. Barrett's adenocarcinoma arises within a single aneuploid population. *Gastroenterol*. 1990; 98:A273.
3. Ramel S. Barrett's Esophagus: model of neoplastic progression. *World J Surg*. 2003; 27:1009-1013.
4. Schneider PM, Stoeltzing O, Roth JA, Hoelscher AH, Wegerer S, Mizumoto S, et al. p53 mutational status improves estimation of prognosis in patients with curatively resected adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *Clin Can Res*. 2000; 6: 3153-3158.
5. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine CS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterol*. 1992; 102: 1212-1219.

6. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's Esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol.* 1987; 93:1-11.
7. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's Esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest.* 1989; 60:65-71.
8. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC. Barrett's esophagus: a model of human neoplastic progression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1994; 59:577-583.
9. Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2005; 166: 35-46
10. Ireland AP, Clarck GWB, DeMeester TR. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg.* 1997; 225(1):17-30.
11. Dillenburg CF, Moreira LF. Biologia molecular dos tumores do trato digestivo. *Revista HCPA.* 2001; 21(1):59-70.
12. IARC Homepage – International Agency for Research no Cancer – p53 polymorphisms [periodico da Internet] 2005 [acesso em 23 dezembro 2005] Disponível em: <http://www.iarc.fr/p53/index.html>
13. Hainaut P, Vanakangas K. p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lesions from p53 gene mutations. *Pathol Biol.* 1997; 45:112-126.
14. Casson A, Tammermagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophagus cancer: association with clinicalpathological features, risk factors and survival. *Mol Pathol.* 1998; 51:71-79.
15. Pütz A, Hartmann A, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer.* 2002; 98:99-105.
16. Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, et al. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:1729-1735.
17. Wang LD, Zheng S, Zheng, ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(6): 1156-1164.
18. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: current knowledge and perspectives. *Mut Res.* In press 2005.
19. Soussi T, Bérout C. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mut.* 2003; 21:192-200.

20. Ortiz-Hidalgo. The histopathology and biologic prognostic factors of Barrett's Esophagus. *J Clin Gastroenterol.* 1998; 26(4):324-333.
21. Harris CC, Holstein M. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene. *N Eng J Med.* 1993; 329:1318-1327.
22. Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125:1121-1131.
23. Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RNK. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (India): a high-incidence area. *Int J Cancer.* In press 2005.
24. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis.* 1999; 14:229-233.
25. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. P53-mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Res.* 1999; 59:4784-4787.
26. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton S. Genetic alterations in Barrett's Esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol.* 1998; 153(1):287-294.
27. Garewal HS. What is the comparative rate of p53 overexpression in Barrett's patients with and without dysplasia? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 390-391.
28. 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 Gen Cytogen.* 2003; 140:20-30.
29. Soussi T. Focus on the p53 gene and cancer: advances in the TP53 mutation research. *Hum Mut.* 2003; 21:173-175.
30. Ambs S, Hussain SSP, Marrogi AJ, Harris CC. Cancer-prone oxiradical overload disease. *IARC Sci Publ.* 1999; 150:295-302.
31. Segal F, Kaspariy APB, Prolla JC, Leistner S. p53 overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus. *Cancer Letters.* 2004; 210:213-218
32. Miller SA, Dikes DD, Polensky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res.* 1998; 16(7): 1215.
33. Kubba AK, Poole NA, Watson A. Role of p53 assessment in management of Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci.* 1999; 44(4): 659-667.

34. Dolan K, Walker J, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's Esophagus. *Dis Esophagus*. 2003; 16:83-89.
35. Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(19):2998-3001.
36. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren L, Holmberg L, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:173-182.
37. Sager R. p53 and neoplastic progression in Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(5):1321-1323.
38. Feagins LA, Souza RF. Molecular targets for treatment of Barrett's Esophagus. *Dis Esophagus*. 2005; 18:75-86.
39. Lau C, Mary-Bcith H, Moore BA, Brooks KR, D'Amico TA, Harpole DH. Molecular staging of lung and esophageal cancer. *Surg Clin N Am*. 2002; 82:497-523.
40. Moreira LF, Tiburi M. Lesões pré-malignas do esôfago e câncer precoce: considerações sobre o tratamento. *Revista HCPA*. 2001; 21(1): 73-82.

X. ARTIGO 3
VERSÃO EM INGLÊS

Artigo ainda não submetido

Molecular analysis of the p53 gene in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus: characterization by sequencing

Diogo André Pilger¹; Patrícia Luciana da Costa Lopez²; Fábio Segal³; Sandra Leistner-Segal²

1. Postgraduate Program in Medical Sciences from the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul
2. Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas in Porto Alegre
3. Institute of the Digestive Tract (Instituto do Aparelho Digestivo -IAD)

Correspondence to the author at:

Diogo André Pilger
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-3316-8011
Fax: +55-51-33168010
E-mail: pilger@terra.com.br

Abstract

Objectives: numerous studies have focused the metaplasia-dysplasia-esophageal adenocarcinoma sequence while a few relate the interaction between molecular factors and the alterations development before dysplasia. Gene mutations in the tumor-suppressing p53 gene (TP53) were the abnormalities most commonly described in these stages. This work has the objective of identifying the main molecular alterations present in exons 5 to 8 of gene p53 in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) symptoms, intestinal metaplasia of cardia (IMC) and Barrett's Esophagus (BE) diagnosed by upper digestive endoscopy and confirmed by biopsy.

Results: the analysis by sequencing showed alterations in 37,5% of the patients analyzed. The alterations in the TP53 were found only in BE patients and the most frequent were missense mutations, which corresponded to 80% (8/10). Three of the eight missense mutations described were in CpG sites.

Conclusions: the observation of mutations in the TP53 in pre-cancerous tissues suggests that these may occur even before morphological alterations develop.

Key Words: p53, intestinal metaplasia of the cardia, Barrett's Esophagus, sequencing

Introduction

Barrett's Esophagus (BE) is a complication of the gastroesophageal reflux disease (GERD) in which, around 10% of patients, the normal squamous epithelium is replaced by specialized columnar metaplasia (1). The progressive evolution of the normal esophageal epithelium into the columnar-type epithelium is characterized by a complex sequence of events that begin by an inflammation of the normal squamous epithelium (esophagitis), resulting from chronic reflux, followed by intestinal metaplasia of the cardia and BE, increasing levels of dysplasia, and adenocarcinoma. This process is modulated by environmental stimuli and genetic predisposition that result in genomic instability. Cells with multiple, developed genetic abnormalities result in cellular clones with accrued genetic errors. Some clones acquire proliferative advantage and may develop capacity for invasion, resulting in neoplasia (2).

The histological aspects provide little information in predicting the risk of progression toward malignancy (3,4). Numerous studies mention the molecular alterations related with the metaplasia-adenocarcinoma transition while few relate the interaction between molecular factors and the development of alterations previous to dysplasia (5,6,7).

In 1994, Neshat *et al.* revised the literature concerning the molecular biology of esophageal cancer. Gene mutations in the tumor-suppressor p53 gene (TP53) were the abnormalities most commonly described. The incidence of mutations tends to increase with the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma progression, ranging from rare in non-dysplastic epithelium to up to 90% in adenocarcinoma (8,9). A revision of more than 2500 tumors analyzed for mutations in the TP53 showed greater frequency of these alterations in tumors in the lung (56%), colon (50%), esophagus (45%), ovary (44%), and pancreas (44%) (10,11,12).

By investigating the nature and frequency of mutations in the TP53 gene, it is possible to reveal the likelihood of this gene functioning as an etiologic factor for the pathogenesis of human cancer (13). With respect to esophageal carcinoma, there are strong evidences showing the involvement of TP53 for the prognosis of the patients, reducing their life span (14).

Alterations in the TP53 were found in 40 to 50% of all the esophageal cancers, most frequently mutations of the missense type (50 to 80%), but also of the nonsense type (10 to 50%), deletions and insertions (15). Most of the mutations in the TP53 in esophageal adenocarcinoma are transitions of the G:C to A:T type, 89% which occurred in CpG dinucleotide hotspot 175, 176 196, 213, 245, 248, 273, and 282 (16,17,18,19). These findings suggest that the methylation of the CpG have an important role in the development of mutations in TP53 in Barrett cancers (16,20,21). Esophageal adenocarcinoma is the type of cancer that presents the greatest proportion of mutations cited previously (22). generally, they are located between exons 5 to 8 of the gene that contains the DNA-binding domain with protein p53, which corresponds to about 80% of the alterations (15,17,18,23,24). The same profile of mutations is found for the adenocarcinoma of the cardia (17) and for pre-malignant tissues (25,26).

A compilation of 16 papers presented by Garewal *et al.*, 2003 summarizes the frequencies of the alterations in the TP53 in the epithelium of Barrett's Esophagus depending on the degree of dysplasia (27). The profile and the frequency of the alterations vary also according with the geographic region (23, 28) and with the various carcinogens that individuals are exposed (29). In chronic inflammatory diseases, such as the gastroesophageal reflux disease (GERD), there is an overload of oxygen radicals that promote a great number of alterations and mutations in many genes, including TP53 (30).

In this sense, this work has the objective of identifying the main molecular alterations present in exons 5 to 8 of the p53 gene in patients with

intestinal metaplasia of the cardia (IMC) and Barrett's Esophagus (BE) representing Porto Alegre.

Materials and Methods

Patients: Sixteen patients were evaluated (8 women and 8 men, ages 23 to 72, with an average of 54.3 years old) who underwent upper digestive endoscopy between March 2004 and March 2005 at Moinhos de Vento Hospital in Porto Alegre. These individuals had GERD symptoms diagnosed by upper digestive endoscopy and confirmed by biopsy. The biopsies were analyzed as described by Segal *et al.*, 2004 (31).

DNA Extraction: The samples had DNA extracted from 10mL of peripheral blood collected in EDTA through the same modified salt precipitation technique described by Miller *et al.*, 1988 (32). The same protocol was performed with respect to tissue samples collected at the time of endoscopy.

Conditions for polymerase chain reaction (PCR): The long PCR technique on exons 5 to 8 of the p53 gene was set as standard. Hence, 5 forward (5'CTGCCCTGACTTTCAACTCTG3') and 8 reverse (5'TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC 3') primers were used, according to Segal *et al.*, 2004 (31). Amplifications were carried out using approximately 200 ng of DNA, 1U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 5µL of enzyme buffer (Tris-HCl 200mM, KCl 500mM), 5µL of dNTP 0.2mM (Invitrogen™), 1.5µL of MgCl₂ (50mM), and 1.0µL of each specific primer at a concentration of 20 pmol for a final reaction volume of 50µL. Using a thermocycler, a program was started with initial denaturation at 94°C for 1 minute, followed by 35 cycles of 40 seconds at denaturation temperature of 94°C, annealing temperature of 55°C, extension temperature of 72°C, and final extension at 72°C for 10 minutes. The amplification results in a 1619 pb fragment that is visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Automated Sequencing: The purified PCR products were used directly for the DNA sequencing. The samples were sequenced using two primers (forward and reverse) depending on the exon to be amplified according to Segal *et al.*, 2004 (31). The reactions were performed using the kit Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems™) based on the marked fluorescence of the dideoxynucleotides, as described by the manufacturer. The sequencing reaction consists of 34 cycles of 96°C during 10 seconds, 50°C for 5 seconds, 60°C for 4 minutes, and 4°C for 10 minutes. The samples were analyzed in the sequencer ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

Results

Long PCR Technique Standardization: The long PCR technique using only the 5 forward and 8 reverse primers proved to be adequate for analyzing the 4 main exons of the p53 gene. The PCR product presented 1619 pb as shown in figure 1.

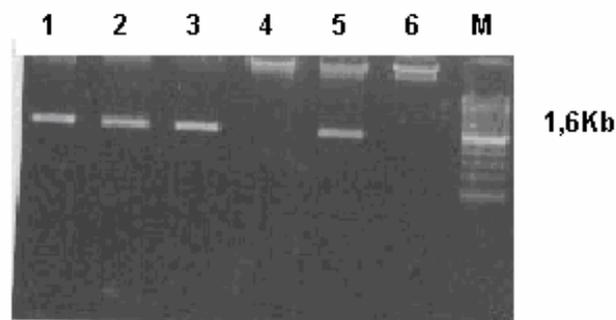


Figure 1: 1.5% agarose gel demonstrating the result of long PCR in positions 1, 2, 3, and 5. Positions 4 and 6 demonstrate a product of non-amplified reaction. M represents a 1kb molecular weight marker.

Molecular analysis of the p53 gene: A total of 16 patients were analyzed, of which 37,5% (6/16) were patients with intestinal metaplasia of the cardia (IMC) and 56,2% (9/16) were patients with Barrett's Esophagus. Only one patient that was included in the study showed esophagitis.

The DNA sequencing analyses were done on the p53 gene in the regions between exons 5 and 8 both for the blood samples as well as the tissue samples obtained from the biopsies for all the patients. The direct analysis of the DNA by sequencing showed alterations in 37,5% (6/16) of the patients analyzed as shown on table 1. Stratifying the patients by histology types, we can observe that all alterations (100%) occurred with Barrett's Esophagus patients. The prevalence of alterations in the blood of these patients was 31,3% (5/16). The most common alterations found in this study were mutations of the missense type, which corresponded to 80% (8/10). Three of the eight missense mutations were in CpG sites.

Three patients showed the same alterations in the blood (control) and in the tissue (cases 1, 3, and 5), two patients showed alterations only in the blood (cases 3 and 12), one patient showed alteration only in the tissue (case 5), and one patient presented different alterations in the blood and tissue (case 11).

Case	Blood Histology Type	Alteration (Exon)	Nucleotide Exchange	Mutation Type
1	Blood	G14483 (E8)	14483delG	Deletion
	BE	G14483 (E8)	14483delG	Deletion
2	Blood	---	---	---
	BE	---	---	---
3	Blood	R156G (E5) S260P (E7)	CGC -> GGC TCC -> CCC	Missense Missense
	BE	R156G (E5)	CGC -> GGC	Missense
4	Blood	---	---	---
	Esophagitis	---	---	---
5	Blood	---	---	---
	BE	S227C (E7)	TCT -> TGT	Missense
6	Blood	---	---	---
	IMC	---	---	---
7	Blood	V156L (E5)	GTA -> CTC	Missense
	BE	V156L (E5)	GTA -> CTC	Missense
8	Blood	---	---	---
	BE	---	---	---

Case	Blood Histology Type	Alteration (Exon)	Nucleotide Exchange	Mutation Type
9	Blood	---	---	---
	IMC	---	---	---
10	Blood	---	---	---
	IMC	---	---	---
11	Blood	Q192H (E6)	CAG -> CAT	Missense
	BE	Q192H (E6)	CAG -> CAT	Missense
12	Blood	IVS6+8 (I6)	IVS6+8insA	Insertion
	BE	---	---	---
13	Blood	---	---	---
	BE	---	---	---
14	Blood	---	---	---
	IMC	---	---	---
15	Blood	---	---	---
	BE	---	---	---
16	Blood	---	---	---
	IMC	---	---	---

Table 1: results of the analyses by sequencing of the 16 patients analyzed. Each patient was analyzed for blood (control) and tissue, classified according to the alteration found at the moment of the biopsy (Esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia (IMC), and Barrett's Esophagus (EB). The third column presents the molecular alteration evidenced, using the classification of the standard genetic code and its location (E: exon, I: intron). The fourth column shows the exchange of the nucleotide and the fifth column classifies the type of alteration.

Discussion

In a hypothetical flow of genetic alterations in direction of esophageal adenocarcinoma, aneuploidies and mutations in the TP53 seem to be initial events strongly associated to the rise of dysplasia (1). However, the results related to the stages previous to the development of Barrett's Esophagus are still scarce. The prevalence of mutations in the TP53 detected by the sequencing of the exons 5 to 8 has already been previously described in precancerous and cancerous tissues (10,27,33). The utilization of different primers and populations analyzed in each study contribute to the great variation in the results (34).

The observation of mutations in the TP53 in pre-cancerous tissues suggests that these may occur even before morphological changes develop. Furthermore, due to the small number of cells that have molecular alterations at this stage, the results may be underestimated especially due to the great quantity of inflammatory cells and stroma, which is a consequence of wild-type alleles coming from normal cells collected at the time of biopsy (35). Also, due to the histological heterogeneity of this mucous, the molecular alterations may not occur at all the sites of the biopsy (36). The low positive predictive value of analyses in stages before metaplasia certainly contributes to the low number of publications. The objective of our study was to evaluate the presence of molecular alterations in the p53 gene in patients that presented IMC and BE.

According to IARC (International Agency for Research on Cancer), the prevalence of mutations of the TP53 is 12.5% for normal tissues and around 17% for Barrett's Esophagus. In our research, the prevalence was higher when compared to the results presented by IARC and other groups (10,27,33) for both histological types analyzed. This could be explained by the low number of samples.

The most common alterations found in this study were mutations of the missense type, which corresponded to 80% (8/10). These results are in accordance with those previously described in the literature. All alterations found had already been previously described in various types of tumors (12,16,17,18,19).

It has already been demonstrated that mutations in the TP53 rarely happen outside the exons 5 to 8 of the gene (35). Our results show that except for one mutation (located in intron 6) all of the other ones occurred in exons 5 to 8, which is a highly conserved region of the gene. Mutations in codon hotspots were not found.

The alterations in the TP53 were not associated to distribution by gender, which could reflect the predominance of esophageal adenocarcinoma in men (34).

The high prevalence of alterations in the blood of patients with Barrett's Esophagus may reflect a genetic predisposition of these individuals to progress to more advanced stages in the direction of neoplasia. In this sense, it seems evident that the association of genetic predisposition and environmental factors, such as GERD, has a fundamental role in the patients' prognosis.

In the future, population tracking methods based on genetic susceptibility tests, nomograms for symptoms, and endoscopy may help in identifying a great portion of individuals with BE (9). Due to the multifactorial nature of neoplastic progression in BE and the genetic complexity of adenocarcinoma, it will be necessary to use a panel of biomarkers in order to break down the risk of the patients (37).

Because of this, it is the expression of damage in the DNA that precedes malignity. The earliest indicator of cancer should be the detection of the alterations occurred directly in the DNA before the manifestations of dysplasia (38). Molecular markers used in diagnosing cancer of the esophagus may provide the clinical doctors with the possibility of making the diagnosis of malignity in earlier stages than the radiographic and histopathological techniques. The impact of effective molecular markers for distinguishing metaplasia and dysplasia from adenocarcinoma is an important step forward (39).

The prognosis for patients with esophageal neoplasias remains very unfavorable. For this reason, the benefits of the early diagnosis have been emphasized considering that life span is intimately linked to the level of tumor invasion (40).

Acknowledgments

This work received editorial support from the Research and Postgraduate Group of Hospital de Clínicas in Porto Alegre (RS, Brazil) and financial support from the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Research Support Fund/Hospital de Clínicas in Porto Alegre (FIPE-HCPA).

References

1. Campomenosi P, Conio M, Bogliolo M, Urbini S, Assereto P, Aprile A, et al. p53 is frequently mutated in Barrett's metaplasia of intestinal type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996; 5:559-565.
2. Blount PL, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Reid BJ. Barrett's adenocarcinoma arises within a single aneuploid population. *Gastroenterol*. 1990; 98:A273.
3. Ramel S. Barrett's Esophagus: model of neoplastic progression. *World J Surg*. 2003; 27:1009-1013.
4. Schneider PM, Stoeltzing O, Roth JA, Hoelscher AH, Wegerer S, Mizumoto S, et al. p53 mutational status improves estimation of prognosis in patients with curatively resected adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *Clin Can Res*. 2000; 6: 3153-3158.
5. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine CS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterol*. 1992; 102: 1212-1219.
6. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's Esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol*. 1987; 93:1-11.
7. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's Esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest*. 1989; 60:65-71.
8. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC. Barrett's esophagus: a model of human neoplastic progression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1994; 59:577-583.
9. Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res*. 2005; 166: 35-46
10. Ireland AP, Clark GWB, DeMeester TR. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg*. 1997; 225(1):17-30.

11. Dillenburg CF, Moreira LF. Biologia molecular dos tumores do trato digestivo. Revista HCPA. 2001; 21(1):59-70.
12. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphisms. Available at: <http://www.iarc.fr/p53/index.html> Accessed 23 December, 2005.
13. Hainaut P, Vanakangas K. p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lessons from p53 gene mutations. *Pathol Biol.* 1997; 45:112-126.
14. Casson A, Tammermagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophagus cancer: association with clinical-pathological features, risk factors and survival. *Mol Pathol.* 1998; 51:71-79.
15. Pütz A, Hartmann A, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer.* 2002; 98:99-105.
16. Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, et al. Characterization of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:1729-1735.
17. Wang LD, Zheng S, Zheng, ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(6): 1156-1164.
18. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mut Res.* In press 2005.
19. Soussi T, Bérout C. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mut.* 2003; 21:192-200.
20. Ortiz-Hidalgo. The histopathology and biologic prognostic factors of Barrett's Esophagus. *J Clin Gastroenterol.* 1998; 26(4):324-333.
21. Harris CC, Holstein M. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene. *N Eng J Med.* 1993; 329:1318-1327.
22. Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125:1121-1131.
23. Mir MM, Dar NA, Gochhait S, Zargar SA, Ahangar AG, Bamezai RNK. P53 mutation profile of squamous cell carcinomas of the esophagus in Kashmir (India): a high-incidence area. *Int J Cancer.* In press 2005.
24. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis.* 1999; 14:229-233.

25. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. P53-mutant clones and field effects in Barrett's Esophagus. *Cancer Res.* 1999; 59:4784-4787.
26. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton S. Genetic alterations in Barrett's Esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol.* 1998; 153(1):287-294.
27. Garewal HS. What is the comparative rate of p53 overexpression in Barrett's patients with and without dysplasia? In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, editores. *Barrett's Esophagus.* 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2003. P. 390-391.
28. 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 Gen Cytogen.* 2003; 140:20-30.
29. Soussi T. Focus on the p53 gene and cancer: advances in the TP53 mutation research. *Hum Mut.* 2003; 21:173-175.
30. Ambs S, Hussain SSP, Marrogi AJ, Harris CC. Cancer-prone oxiradical overload disease. *IARC Sci Publ.* 1999; 150:295-302.
31. Segal F, Kaspary APB, Prolla JC, Leistner S. p53 overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus. *Cancer Letters.* 2004; 210:213-218
32. Miller SA, Dikes DD, Polensky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res.* 1998; 16(7): 1215.
33. Kubba AK, Poole NA, Watson A. Role of p53 assessment in management of Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci.* 1999; 44(4): 659-667.
34. Dolan K, Walker J, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's Esophagus. *Dis Esophagus.* 2003; 16:83-89.
35. Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(19):2998-3001.
36. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren L, Holmberg L, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88:173-182.
37. Sager R. p53 and neoplastic progression in Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96(5):1321-1323.
38. Feagins LA, Souza RF. Molecular targets for treatment of Barrett's Esophagus. *Dis Esophagus.* 2005; 18:75-86.

39. Lau C, Mary-Bctth H, Moore BA, Brooks KR, D'Amico TA, Harpole DH. Molecular staging of lung and esophageal cancer. *Surg Clin N Am.* 2002; 82:497-523.
40. Moreira LF, Tiburi M. Lesões pré-malignas do esôfago e câncer precoce: considerações sobre o tratamento. *Revista HCPA.* 2001; 21(1): 73-82.

XI. ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Número:** _____

Prezado Paciente:

Para o desenvolvimento deste trabalho, gostaríamos do seu consentimento no que diz respeito ao uso do material que já encontra-se armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Portanto não será necessária a coleta de sangue ou biópsia por endoscopia, uma vez que os pacientes já foram convidados a participar da 1ª fase deste estudo (projeto 96-304 “Estudo da Carcinogênese do Adenocarcinoma do Esôfago: análise da perda de heterozigotidade”) e, naquele momento, os mesmos foram submetidos à endoscopia digestiva diagnóstica eletiva no Hospital Moinhos de Vento e concordaram em participar do estudo através de termo de consentimento informado, assinado pelo paciente ou familiar responsável. No momento da coleta, os pacientes foram informados dos objetivos, riscos e benefícios para o paciente e sua família.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos convidando o(a) senhor(a), tem como objetivo principal levantar dados mais precisos sobre as mutações gênicas presentes no gene p53 que encontra-se alterado em pacientes que sofrem de Esôfago de Barrett. Com as informações obtidas, poderemos planejar programas que oferecem uma melhor qualidade de atendimento, diagnóstico e orientação aos pacientes, principalmente sobre a possibilidade de tratamento preditivo. Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico de uma

doença genética e oferecer alternativas de tratamento e de aconselhamento familiar com finalidade de reprodução.

Assim sendo, ao concordar com este estudo, os casos selecionados não estarão expostos a nenhum risco maior, considerando que o material necessário para a realização da pesquisa já encontra-se em poder dos pesquisadores.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue comum. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, uma pequena mancha roxa no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função.

Gostaríamos de solicitar também a sua autorização para que seu material continue armazenado em nosso laboratório para que possa eventualmente ser utilizado em outros projetos.

Todos os resultados obtidos serão reencaminhados para o seu médico, o qual ficará responsável pelo aconselhamento e acompanhamento do paciente.

Eu, _____, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual meu material biológico será utilizado, e dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional _____ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

Paciente

Pesquisador

Data: _____

Pesquisador Responsável: Dra. Sandra Leistner Segal

Telefone: 33168011

XI. ANEXO II

Instruções aos autores *Cancer Genetics and Cytogenetics*

Guide for Authors

Manuscripts should be submitted to Editor-in-Chief: Dr. Avery A. Sandberg, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Department of DNA Diagnostics, St. Joseph's Hospital and Medical Center, 350 West Thomas Road, Phoenix, AZ 85013, USA (Tel: 602-406-3588; Fax: 602-406-4118; E-mail: jvaughn@chw.edu). In addition to full-length research papers, Short Communications (no longer than 4 printed pages) and Letters-to-the-Editor (no longer than 2 printed pages) may be submitted. Review and Special articles will be published from time to time by invitation or arrangement with the Editor-in-Chief. Editorials may also be published from time to time. Book Reviews will be published as space permits. Manuscripts are submitted with the understanding that they are original unpublished work and are not being submitted elsewhere.

Manuscript. A computer disk must accompany the manuscript. Type double-spaced on 8½ x 11 in. bond paper. All materials are to be submitted in triplicate. On the title page, include full names of authors (no degrees), academic or professional affiliations, and complete address for the corresponding author. The phone and fax number and e-mail address (if available) of the corresponding author must be included. Except for Letters-to-the-Editor, all articles must include an abstract of up to 200 words. All tables, numbered with Arabic numerals, should have brief descriptive titles. Please use horizontal rules only. Authors not fluent in the English language should have their manuscripts edited by an expert in the language, prior to submission to the journal, thus avoiding delays in the review and publication of their papers. The journal will follow strictly the cytogenetic nomenclature and karyotype depictions given in ISCN 1995. Human gene names should be written in italicized capital letters and Arabic numbers. Any abbreviations should be defined when first used and be consistent throughout the text. Normal laboratory values should be provided in parentheses when first used. Authors seeking information about the status of their accepted papers can log-in at <http://authors.elsevier.com> (the reference number needed to track the paper will be sent by Elsevier as soon as the paper is received for publication).

Revised manuscript. Two copies of the revised text and pictorial materials with disk should be returned to the Editor-in-Chief, along with a detailed list of the revisions made. If changes suggested by the reviewers are not made by the authors, justification of this must also be submitted.

Computer disks. Please, observe the following: 1. Send a hard copy of your paper together with a disk (a disk should be included with the first submission and each subsequent revision). 2. Make sure that the disk and the hard copy match exactly. Please, note that failure to submit a computer disk will result in delays in publication. 3. Specify what software was used, including which release, e.g., Word 2000. 4. Specify what computer was used (IBM-compatible PC, Apple Macintosh, etc.). 5. The article file should include all textual material (text, references, tables, figure captions, etc.) and separate illustration files, if available. 6. The file should follow the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of this journal as given below. 7. The file should be single-spaced and should use the wrap-around end-of-line feature, i.e., returns at the end of the paragraphs only. Place two returns after every element such as title, headings, paragraphs, figure and table call-outs. 8. Keep a backup disk for reference.

Illustrations. At least 3 glossy or high-quality prints of karyotypes are to be submitted with the manuscript. Authors must label in black numbers the chromosomes accurately, both normal and abnormal, but refrain from including annotations, which should appear in the legend. For line artwork, submit black-ink drawings of professional quality or glossies of originals. Duplicates may be photocopies. On the back of each illustration, give the first author's name, number of the figure, and indication of "top." The legends to figures must match the information in the illustrations, and must be typed on separate pages. For more information on submission guidelines for figures, visit <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Color art. Authors must enclose a letter agreeing to pay the color charge upon submission of their manuscript because such agreement must be received by the journal before the article can be published. Once a manuscript is accepted for publication, the exact charge will be determined by the publisher and a color agreement faxed or e-mailed to you in the form of a PDF. As a guideline, color artwork supplied with your article will appear in color on the web - at no charge.

For reproduction of color illustrations in print, there is a \$350 charge per color picture.

References. Authors must follow the instructions given. References are to be listed and numbered consecutively in the order in which they are cited in the text and not presented alphabetically. Include names of all authors for each reference. Authors are responsible for completeness and accuracy of all references. Citation in the text is by number in brackets, i.e. [1]. Periodical abbreviations should follow those given by *Index Medicus*. References must be styled as follows:

Journal. Maarek O, Salabelle A, Le Coniat MB, Daniel MT, Berger R. Chromosome 16 inversion-associated translocation: two new cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:126-9.

Book. Sandberg AA, Bridge JA. The cytogenetics of bone and soft tissue tumors. Austin: RG Landes Co., 1994.

Chapter. Sandberg AA, Chen Z. Cancer cytogenetics: nomenclature and clinical applications. In: Kurzrock R, Talpaz M, editors. *Molecular biology in cancer medicine*. London: Martin Dunitz Ltd, 1995; pp.54-84

Online publication. Health Care Financing Administration. 1996 statistics at a glance. Available at: <http://www.hcfa.gov/stats/stathili.htm> Accessed December 2, 1996.

Proofs and reprints. The corresponding author will receive proofs via e-mail in PDF format, which should be corrected and returned **within 48 hours of receipt**. Proofs must be carefully checked by the authors, as it is their responsibility to see that all errors are corrected and queries from editors answered. Any paid color art will be included in the PDF proof.

Copyright. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer form is to be signed and returned to the publisher at the address shown on the form, which will ensure the widest possible dissemination of information under the U.S. Copyright Law.