
Juliana Gonçalves de Oliveira

**Detecção de mutação no gene supressor de tumor *p53* e
associação a cepas patogênicas do *Helicobacter pylori* em
câncer gástrico**

Botucatu
2008

Juliana Gonçalves de Oliveira

**Detecção de mutação no gene supressor de tumor *p53* e
associação a cepas patogênicas do *Helicobacter pylori* em
câncer gástrico**

**Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina a Universidade Estadual Paulista
“Júlio de mesquita Filho”
como parte de requisito
para a obtenção do título de mestre
em Pesquisa e desenvolvimento:
Biotecnologia médica**

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Profa. Dra. Nídia Alice Pinheiro

Botucatu
2008

Dedicatória

Aos meus pais Eunice e Luiz pelo amor, entusiasmo e força em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos pelo carinho e amizade, sempre.

Ao meu querido Eduardo pelo apoio, amor e compreensão.

Agradecimentos

A Deus por todo o universo.

A Prof. Dra. Nídia Alice Pinheiro pela orientação, meus sinceros agradecimentos.

As doutoras Adriana Cardoso Ferrasi e Rejane Grotto pelos intensos e contínuos ensinamentos técnicos e teóricos.

A Dra. Maria Inês Moura Campos Pardini, exemplo de sucesso acadêmico e profissional, pelo suporte técnico e científico por meio de seu Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia médica, pela riqueza de suas aulas.

Aos professores convidados do programa pela importante complementação de informações.

A Tânia Mari Cestari pelo suporte estatístico.

Aos meus amigos Juliana, Camila, Quiara, Denise, Patrícia, Luciandro, Cristiane, Bete, pelos ensinamentos técnicos e companheirismo no laboratório.

As minhas queridas amigas da república: Gisele, Luana, Juliana e Marília pelas conversas e descontração.

Ao diretor científico do Hemocentro Dr. Paulo de Abreu Machado pelo apoio técnico-científico.

Ao diretor do Hemocentro Dr. José Mauro Zanini

A todos os funcionários do Hemocentro de Botucatu.

A Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini e a todos os seus funcionários e estagiários, do Laboratório de Aconselhamento Genético da UNESP de Bauru.

Ao Prof. José Roberto Bosqueiro e todos seus estagiários do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas da UNESP de Bauru, pelo auxílio e amizade.

Aos meus amigos distantes Janete Chung e Vânia Quibao Pretti pela força e compreensão.

Aos meus amigos da Faculdade de Odontologia de Bauru: Daniele, Bruno, Angélica, Pamela, pela iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Rumio Taga pela primeira orientação científica.

A secretária do hemocentro Cleonice pela paciência e descontração.

À sessão de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.

A minha querida professora de inglês Alecssandra Hokusso pelas aulas e revisões de resumos.

**“Não sei bem onde foi que me perdi;
talvez nem tenha me perdido mesmo,
mas como é estranho pensar que isto aqui
fosse o meu destino desde o começo”^(*).**

^(*) CÍCERO, Antônio. Perplexidade. In: _____. *A cidade e os livros*. Rio de Janeiro: Record, 1997. p. 80.

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência

1.2 Classificação

1.3 Fatores de risco

1.4 *Helicobacter pylori*

1.5 p53

1.5.1 O gene *p53* e o Ciclo celular

1.5.2 O gene e a Proteína p53

1.5.3 O gene supressor de tumor *p53* e Câncer

1.5.4 O gene e a Proteína *P53* em Câncer Gástrico

2 OBJETIVO

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Coleta de material

3.2 Extração do DNA total

3.3 Amplificação e sequenciamento

3.4 Análise das seqüências dos exons 5-9 de *p53*

3.5 Identificação das mutações nos códons

3.6 Classificação das mutações

3.7 Identificação dos aminoácidos mutados

3.8 Associação aos dados clínicos

3.9 Tratamento estatístico dos dados

3.10 Questões éticas

4 RESULTADOS

4.1- Amplificação dos produtos de PCR para os exons 5 ao 9 da *p53*.

4.2- Purificação do produto de PCR para os exons 5 ao 9 da *p53*.

4.3- Análise das seqüências de bases do gene *p53*.

4.4- Caracterização das amostras em relação aos dados clínicos dos pacientes.

4.5 – Detecção de mutação em *p53* nas amostras de câncer gástrico.

4.6- Distribuição quanto à presença ou não de cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*.

4.7- Presença de cepas patogênicas e estadiamento do tumor.

4.8- Presença de mutação em *p53* e cepa patogênica de *H. pylori*.

4.9- Presença de mutação em *p53* e classificação de Laurén.

4.10- Classificação de Laurén e cepa patogênica de *H. pylori*.

4.11- Mutação em *p53* e estadiamento do tumor.

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÕES

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 ANEXOS

I - Método de purificação de produto de pCR "*in house*".

II - Tabela contendo dados clínicos dos pacientes.

III - Tratamento estatístico.

Lista de siglas e abreviações

14-3-3 proteína 14-3-3

A Adenina

AJCC The American Joint Committee on Cancer

Ala alanina

APC complexo promotor de anáfase

Arg arginina

Asn Asparagina

Asp ácido aspártico

ATM quinase mutante em ataxia-telangiectasia

babA blood group antigen adhesin

C citosina

Cag-A citotoxin-associated protein

Cdk proteinoquinas dependentes de ciclina

CG câncer gástrico

CGDH Câncer gástrico hereditário, forma difusa

Chk1 checkpoint kinase 1

COX-2 ciclooxygenase-2

Cys cisteína

DNA ácido desoxirribonucléico

DNA-PK proteína quinase dependente de DNA

FMB Faculdade de Medicina de Botucatu

G guanosina

G1 Gap 1

G2 Gap 2

Git1 kinase-interator 1

Gln Glutamina

Glu ácido glutâmico

Gly glicina

His histidina

HP *Helicobacter pylori*

iceA induced by contact with epithelium

ICQ inimucitoquímica

IHQ imunohistoquímica

Ile isoleucina

INCA Instituto Nacional do Câncer

Leu leucina

LOH perda da heterozigozidade

Lys lisina

M metástase à distância (sistema TNM)

M Mitose

MALT *mucosa associated lymphoid tissue*

Met metionina

N metástase em linfonodo regional (sistema TNM)

p16 gene p16

p21 WAF1/CIP1 proteína p21

p27 proteína p27

P53 gene p53

P53 proteína p53

P73 gene p73

pRb proteína retinoblastoma

Pro prolina

Ptprz receptor Z da proteína tirosina fosfatase

S Síntese

SCID imunodeficiência combinada grave

Ser serina

SSCP *Strand Conformational Polimorphism*

SV40 Simian vírus 40

T extensão do tumor primário (sistema TNM)

T timina

Thr treonina

Trp triptofano

Tyr tirosina Phe Fenilalanina

UICC União Internacional contra o Câncer

Unesp Universidade Estadual Paulista

VacA vacuolating cytotoxin

Val valina

Wee1 quinase inibitória Wee1

Wt selvagem

Lista de Tabelas

Tabela 1. Seqüência dos *primers* utilizados.

Tabela 2. Distribuição dos exons que sofreram alteração dentro de cada amostra.

Tabela 3. Alteração de nucleotídeo e trinca de aminoácidos nos códons do gene p53.

Tabela 4. Tipo de mutação: *frameshift*, inserção ou deleção.

Tabela 5. Tipo de mutação de ponto: *missense*, *nonsense* ou silenciosa.

Lista de Figuras

Figura 1a. Tipo intestinal de Laurén.

Figura 1b. Tipo difuso de Laurén.

Figura 2. Progressão maligna do adenocarcinoma.

Figura 3. Eletromicrografia da *Helicobacter pylori*.

Figura 4. Esquema de infecção pela *Helicobacter pylori*.

Figura 5. Proteína p53 ligada ao DNA.

Figura 6a. Distribuição das mutações por exons na *p53*.

Figura 6b. Códon com maior frequência de mutação.

Figura 7. Ativação da p53 por ATM e ATR.

Figura 8. Sinalização pela 14-3-3δ.

Figura 9. Quadro contendo a trinca selvagem para cada exon do gene *p53*.

Figura 10. Quadro contendo o código genético.

Figura 11a. Resolução de produto de PCR em gel de agarose 2%.

Figura 11b. Resolução de produto de PCR após purificação em gel de agarose 2%.

Figura 12a. Visualização de mutação em cromatograma.

Figura 12b. Visualização de mutação no programa BLAST.

Figura 13a. Distribuição quanto ao sexo.

Figura 14. Classificação de Laurén: tipo difuso ou tipo intestinal.

Figura 15. Representação das amostras quanto ao sexo: homens, em verde e mulheres em vermelho, quanto à classificação de Laurén.

Figura 16. Distribuição das amostras quanto o estadiamento do tumor.

Figura 17. Porcentagem de amostras de câncer gástrico que apresentam mutação.

Figura 18. Distribuição das mutações para cada exon da ***p53***.

Figura 19. Alterações nos códons do exon 5.

Figura 20. Alterações nos códons do exon 6.

Figura 21. Alterações nos códons do exon 7.

Figura 22. Alterações nos códons do exon 8/9.

Figura 23. Representação de cepa patogênica da *Helicobacter pylori*.

Figura 24. Representação de infecção por *H. pylori* nos pacientes do sexo masculino e feminino.

Figura 25. Representação da distribuição das cepas *CagA+* e *CagA-* nos diferentes estádios do câncer gástrico.

Figura 26. Representação gráfica das amostras que apresentaram mutação nos exons da *p53* e correlacionadas a presença ou não da cepa patogênica da *H. pylori*.

Figura 27. Representação da distribuição das amostras mutadas quanto à classificação de Laurén.

Figura 28. Representação da distribuição das amostras *CagA+* em relação à classificação de Laurén.

Figura 29. Presença de mutação em *p53* em relação ao estadiamento do tumor.

Resumo

O câncer gástrico é o quarto tipo mais comum e o segundo em mortalidade. Apesar da diminuição do número de casos nos últimos tempos ainda é um grande problema mundial. E mais, sua associação com o *Helicobacter pylori* (HP) está cada vez mais preocupante, devido à alta prevalência de cepas patogênicas dessa bactéria. Além disso, mutações em genes que agem no ciclo celular podem levar ao câncer. O gene que codifica a proteína p53 é responsável pelo reparo de lesões no DNA durante o ciclo celular funcionando como um regulador transcricional. Quando o reparo não é viável a proteína p53 induz a entrada da célula danificada em apoptose. Mutações mais freqüentes ocorrem nos *exons* 5, 6, 7 8 e 9. No atual trabalho investigou-se a possível associação da mutação no gene *p53*, correlação com presença da cepa patogênica *CagA+* e estadiamento do tumor. Foram estudadas 55 amostras de câncer gástrico extraídas por biópsia durante gastrectomia. PCR foi utilizada para os *exons* 5 ao 9, análise de mutação por sequenciamento automático e dados clínicos foram coletados incluindo infecção por *Helicobacter pylori/CagA+*. Trinta e dois casos apresentaram mutações em *p53* sendo que 6 deles apresentaram mutação em mais de um *exon*. 53% apresentaram-se infectados por HP *CagA+*. 87% dos pacientes estavam em estadiamento avançado do tumor (II, III e IV) e 80% eram do tipo intestinal. Quanto a correlação de p53 e *cagA+* a casuística é relativamente pequena, e assim a correlação de p53 e *cagA* não foi vista. Os resultados confirmam a relevância das mutações em *p53* e da presença da cepa patogênica *CagA* nos casos de câncer gástrico, contudo estudos devem ser realizados com um maior número amostral. Neste caso, o uso da *p53* mutada pode ser utilizada em diagnóstico indicando, assim um melhor tratamento, desde que há casos em que sua alteração impõe resistência a certos tipos de tratamento, independente da presença do *H pylori*. Desta forma poder-se-ia pensar em esquemas de tratamentos individualizados e menos agressivos para cada indivíduo, bem como a prevenção por meio de aconselhamento genético e erradicação da bactéria quando classificada como patogênica.

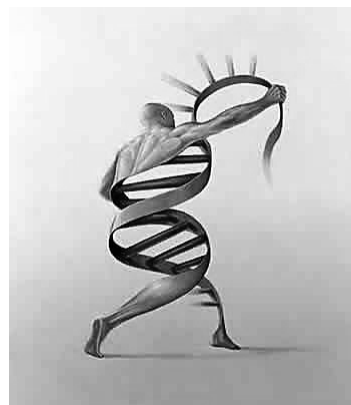
Palavras chaves: câncer gástrico, *p53*, sequenciamento de DNA, mutação, *Helicobacter pylori*.

Summary

The gastric cancer is the fourth most common type and the second in mortality. Despite the decrease in the number of cases in recent times is still a major problem worldwide. Moreover, its association with *Helicobacter pylori* (HP) is increasingly worrying, because of the high prevalence of pathogenic strains of this bacterium. Furthermore, mutations in genes that act in the cell cycle can lead to cancer. The gene encoding the p53 protein is responsible for repair of lesions in DNA during cell cycle working as a transcriptional regulator. When the repair is not viable in the p53 protein induces the entry of the cell into apoptosis damaged. Change frequently occur in exons 5, 6, 7 8 and 9. In the current work investigated is the possible association of the mutation in the p53 gene, correlation with the presence of pathogenic strain CagA + and staging of the tumor. We studied 55 samples of gastric cancer extracted by biopsy taken during gastrectomy. PCR was used to the exons 5 to 9, analysis of mutation by sequencing automatic and clinical data were collected including infection by *Helicobacter pylori* / CagA +. Thirty-two patients had mutations in p53 is that 6 of them had more than one mutation in exon. 53% showed up infected HP CagA +. 87% of the patients were in advanced staging of the tumor (II, III and IV) and 80% were of the intestinal type. As the correlation of p53 and cagA + the casuistic is relatively small, and thus the relationship of p53 and cagA was not seen. The results confirm the relevance of mutations in p53 in the presence of pathogenic strain CagA in cases of gastric cancer, but studies must be conducted with greater sample. In this case, the use of p53 mutant can be used in diagnosis indicating thus a better treatment, since there are cases where its amendment requires resistance to certain types of treatment, regardless of the presence of H pylori. Thus it could be thinking of schemes individually and less aggressive treatments for each individual, as well as prevention through genetic counseling and eradication of the bacterium when classified as pathogenic.

Key words: gastric cancer, p53, DNA sequencing, mutation and *Helicobacter pylori*.

Introdução



1- Introdução

O câncer de estômago, também chamado de câncer gástrico (CG), pode se iniciar em qualquer parte do estômago. Ele pode se espalhar pelos linfonodos próximos e para outras áreas do corpo como fígado, pâncreas, intestino grosso (cólon), pulmões e ovários. A maioria dos tumores que atingem o estômago é do tipo adenocarcinoma, que significa que se desenvolveram da camada que reveste internamente o estômago. Outros tipos de tumores gástricos incluem linfomas, sarcomas gástricos e tumores carcinóides, mas estes são raros (DE VITA, 1997).

A maioria dos cânceres gástricos é esporádica. (MALCOLM G S *et al*, 2006), sendo os adenocarcinomas responsáveis por 95% dos tumores gástricos (COTRAN RS *et al*, 1999). São classificados histologicamente, e pelo grau de estadiamento do tumor.

A tumorigenese gástrica é um processo que se desenvolve em várias fases: gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e, como neoplasia maligna (COTRAN RS *et al*, 1999) . Essas fases costumam ser seqüenciais e têm como consequência a exposição a fatores endógenos e exógenos (CÉSAR *et al*, 2002).

1.1- Incidência

Apesar do marcado declínio na incidência do câncer gástrico em muitos países industrializados, este permanece sendo a segunda causa mais comum de mortes relacionadas à neoplasia no mundo (DE VITA, 1997) e o 4º tipo mais comum no mundo em incidência (INCA, 2007). Entre 1978 a 1996 o Brasil esteve em primeiro lugar com o maior índice de mortalidade (Cad. Saúde Pública, 2006).

Para o ano de 2008, estimam-se 14.080 casos de câncer de estômago entre homens e 7720 casos entre mulheres, correspondendo a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e de 8 para cada 100 mil mulheres. Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos. O pico de incidência se dá, em sua maioria em homens, predominantemente, por volta dos 70 anos de idade (INCA, 2007).

Apesar da incidência mundial de câncer de estômago estar decaindo e da melhora no tratamento e diagnóstico, menos de 20% dos pacientes têm uma sobrevida de até 5 anos após serem diagnosticados (MALCOLM G S *et al*, 2006).

Macroscopicamente os tumores gástricos estão agrupados em cinco tipos. O carcinoma infiltrante superficial é a forma menos agressiva do tumor. A neoplasia não ultrapassa a camada muscular da mucosa nem apresenta ulceração. Infelizmente é um estágio assintomático da doença e só poderá ser encontrada com uma busca ativa, com endoscopia em massa das populações de risco. Os resultados do tratamento podem levar a uma sobrevida de 10 anos em 75% dos casos (YAN-QUIROZ *et al*, 2002).

Os tumores sintomáticos, por outro lado, são profundamente infiltrativos e geralmente apresentam metástases. Seu componente luminal, acessível à endoscopia, pode assumir o aspecto vegetante (polipóide) ou ulcerado com áreas circunjacentes de infiltração (YAN-QUIROZ *et al*, 2002).

A **linitis plastica** é um tipo específico de tumor que infiltra extensamente a parede gástrica sem se concentrar num "tumor" nem produzir ulceração. O estômago se transforma numa bolsa de paredes rígidas facilmente reconhecível à radiologia (YAN-QUIROZ *et al*, 2002).

1.2 - Classificação

Classificação segundo Laurén

Laurén, em 1965, classificou os tumores gástricos em dois tipos histológicos básicos: o tipo intestinal e o tipo difuso (figura 1). O câncer de estômago tipo intestinal origina-se por meio de situações pré-cancerosas, como a atrofia gástrica ou metaplasia intestinal e é caracterizado por substituir o epitélio do estômago por um epitélio com características histológicas do epitélio do intestino (porção duodenal). Apresenta células neoplásicas formando um tecido de estruturas tubulares juntamente com uma massa discreta. (HOWSON *et al*, 1986). As células neoplásicas se apresentam de forma coesa formando uma estrutura globular definida, algumas vezes com papila ou componentes sólidos. (HOWSON *et al*, 1986; HWANG *et al*, 1994). Durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica em pacientes com gastrite, é observada a metaplasia intestinal, decorrente da transformação do epitélio

de revestimento e glandular em células absortivas colunares metaplásicas intercaladas por células caliciformes de morfologia intestinal. Essa lesão está associada à infecção pelo *Helicobacter pylori* e, embora as características do intestino delgado predominem, em algumas situações as características do epitélio do cólon estão presentes, originando a metaplasia do tipo incompleto, que é o mais relacionado ao câncer gástrico (CÉSAR *et al*, 2002).

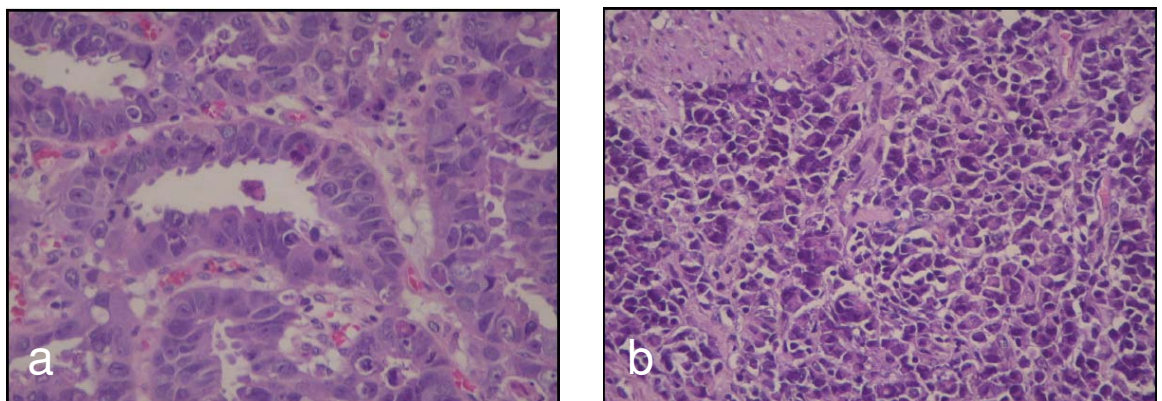


Figura 1. a) Representa neoplasia gástrica do tipo intestinal de Laurén. Observando-se estruturas tubulares, revestidas por células pseudoestratificadas, com intensa hiper cromasia nuclear, alteração da relação núcleo citoplasmática e diminuição dos espaços interglandulares. (400x). b) Representa neoplasia gástrica do tipo difuso de Laurén. Ocorrem células neoplásicas difusamente distribuídas, caracterizadas por alteração da relação núcleo-citoplasmática, hiper cromasia nuclear, presença de muco intracitoplasmático e nucléolo evidente (400x).

Já o câncer de estômago tipo difuso está associado à origem familiar e não se relaciona a condições pré-neoplásicas, sugerindo, assim uma predisposição genética. Este apresenta células que se infiltram no estômago de forma difusa (HOWSON *et al*, 1986). É composto por células separadas umas das outras ou em pequenos grupos que produzem secreção mucinosa distribuída por todo o citoplasma dessas células. Pode apresentar também secreção extracelular dispensando-a no estroma (AMOROSI *et al*, 1988). Pode-se observar a progressão do câncer maligno dos dois tipos na figura 2.

Com gastrite crônica de longa duração, o epitélio desenvolve alterações citológicas, incluindo as de tamanho, formato e orientação das células epiteliais com

atipia dos núcleos. Essas alterações displásicas podem se tornar tão graves a ponto de constituírem um carcinoma *in situ*, principalmente do tipo intestinal proveniente de formas atróficas de gastrite. Já o tipo difuso surge originalmente, sem evolução por meio de displasia (CÉSAR *et al*, 2002).

Há uma diferença quanto ao tempo de invasão do câncer. No tipo intestinal os estágios pré-cancerosos são prolongados e bem definidos transformando a mucosa gástrica normal em uma mucosa de tipo intestinal. As mudanças morfológicas observadas são classificadas basicamente em três categorias: inflamação, atrofia e perda de diferenciação celular. Os estágios pré-cancerosos do tipo difuso já não são tão longos e tão bem definidos quanto o tipo intestinal (TEH & LEE, 1987; CORREA, 1988).

Quanto à distribuição, o tipo intestinal é mais freqüente em áreas onde o risco de desenvolver a doença é mais elevado, enquanto o tipo difuso tem freqüência similar em áreas de alto e baixo risco. Do ponto de vista da distribuição por gênero e idade, o tipo intestinal é mais freqüente em homens, sobretudo em faixas etárias mais avançadas; por outro lado, o tipo difuso apresenta número similar entre homens e mulheres e acomete indivíduos mais jovens. (MUÑOZ *et al*, 1968; HOWSON *et al*, 1986; HOLBURT & FREEDMAN, 1987; AMOROSI *et al*, 1988; ANTONIOLI, 1994). Em função destas diferenças, Howson *et al*. (1986) sugerem que os tumores gástricos do tipo intestinal e do tipo difuso são, na realidade, doenças distintas, com características próprias e fatores de risco específicos.

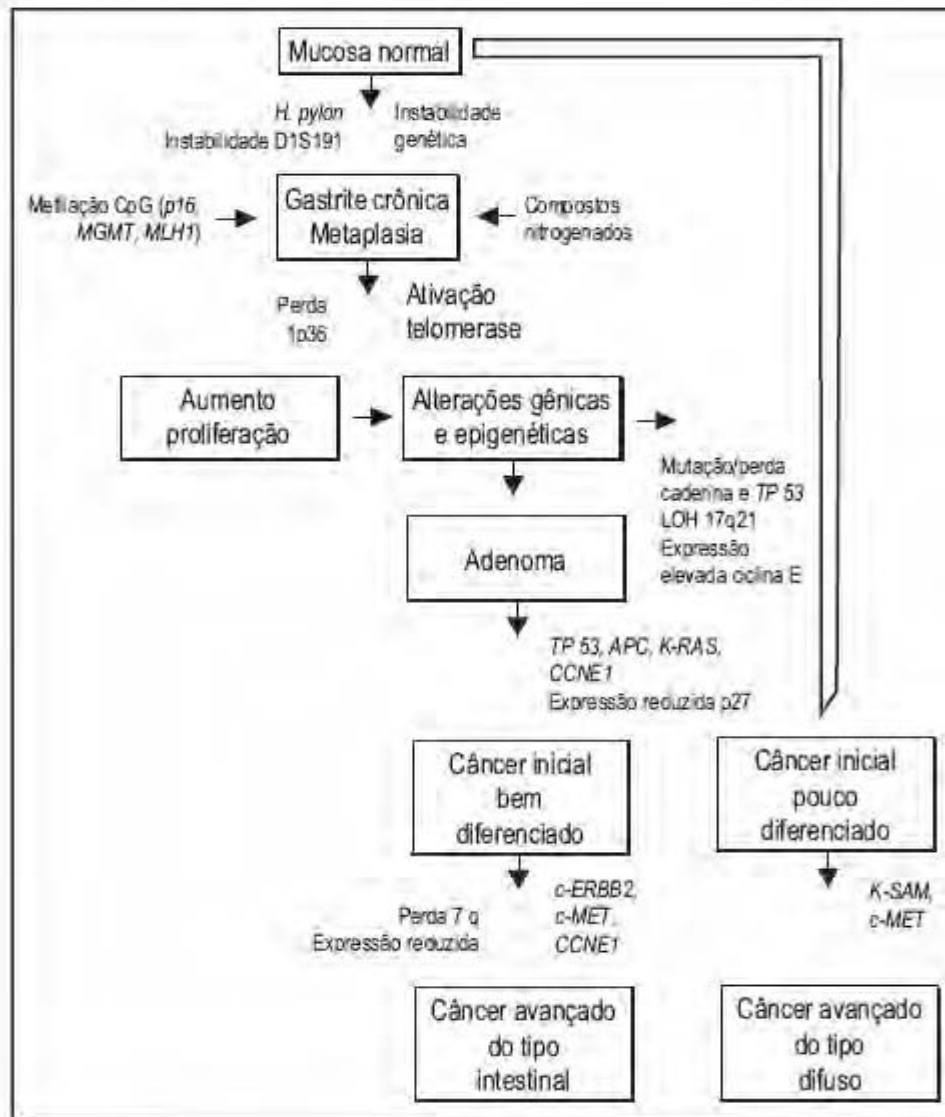


Figura 2. Progressão maligna do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso com as alterações genéticas e epigenéticas associadas (extraído de Cesar *et al*, 2002)

Estadiamento do câncer gástrico

Durante muito tempo foi usada uma classificação dos tumores gástricos proposta por **Borrmann** (1926). Apesar da idade, esta classificação ainda é utilizada em muitos trabalhos científicos, embora só represente aspectos macroscópicos dos tumores.

Em 1971, uma Comissão para Estadiamento de Câncer propôs, em Chicago, a Classificação TNM modificada em 1997 pela União Internacional contra o Câncer-UICC/97.

Com a informação do TNM coletada, a combinação das três informações resulta na classificação do estágio da doença, segundo o manual *AJCC Cancer Staging*, publicado em 2002.

- Estágio 0 (Tis, N0, M0): É um tumor precocemente diagnosticado chamado de câncer *in situ*. O tumor é bastante localizado na superfície da camada que reveste o estômago internamente.

- Estágio IA (T1, N0, M0): O tumor invade camadas mais profundas mas não atinge os linfonodos.

- Estágio IB: O estágio IB é dado nas seguintes condições:
O tumor penetrou em camadas mais profundas do estômago e atinge de 1 a 6 linfonodos regionais. (T1, N1, M0).

O tumor cresce até a camada muscular, mas não atinge os linfonodos. (T2a, T2b, N0, M0).

- Estágio II: O tumor é classificado como II nas condições abaixo:
O tumor invade camadas mais profundas do estômago e atinge de 7 a 15 linfonodos regionais (T1, N2, M0).

O tumor invade a camada muscular do estômago e atinge de 1 a 6 linfonodos regionais (T2a, T2b, N1, M0).

O tumor cresce atingindo toda a espessura da parede do estômago, mas não atinge linfonodos regionais (T3, N0, M0).

- Estágio IIIA: O tumor é classificado como IIIA nas condições abaixo:
O tumor invade a camada muscular do estômago e de 7 a 15 linfonodos (T2a, T2b, N2, M0).

O tumor cresce atingindo toda a espessura da parede do estômago e atinge de 1 a 6 linfonodos (T3, N1, M0).

O tumor invade órgãos ou estruturas vizinhas ao estômago, mas nenhum linfonodo é atingido (T4, N0, M0).

- Estágio IIIB (T3, N2, M0): O tumor cresce atingindo toda a espessura da parede do estômago e atinge de 7 a 15 linfonodos.

- Estágio IV: O tumor é classificado como IV nas condições abaixo:
Presença de qualquer metástase à distância, independente do tumor ou linfonodos (qualquer T, qualquer N, M1).

O tumor invade mais de 15 linfonodos, independente do comprometimento da parede do estômago (qualquer T, N3, M0).

O tumor invade estruturas vizinhas ao estômago e atinge linfonodos (T4, N1-3, M0).

O carcinoma gástrico pode ser diagnosticado em estádios precoces ou avançados. Como definição, o câncer gástrico precoce apresenta invasão até no máximo, a camada submucosa do órgão independente da presença de metástase linfonodal. O conceito de tumor localmente avançado, não é empregado uniformemente entre os autores. Com maior frequência, os autores ocidentais consideram como neoplasia localmente avançada aquela cuja invasão atingiu a serosa gástrica (T3 e T4), enquanto outros autores só aplicam esse conceito quando o limite da parede gástrica foi ultrapassado e já houve difusão do tumor para estruturas adjacentes (ROUKOS, 2000)

Classificação do câncer gástrico quanto à hereditariedade

Dentre as duas formas intestinal e difusa, a segunda é a que mais se associa à hereditariedade. (BONNEY *et al*, 1986). O exemplo clássico é a família de Napoleão Bonaparte, onde ele, seu pai, seu avô paterno, suas quatro irmãs e um irmão faleceram da doença, muitos em idade jovem (CUTAIT *et al*, 2001). Observações epidemiológicas de um padrão autossômico dominante em certos grupos com câncer gástrico, juntamente com a recente descrição de mutações germinativas no gene da caderina-E em famílias com adenocarcinomas do estômago tipo difuso, permitiram a caracterização de uma nova síndrome familiar de predisposição às lesões malignas, denominada de câncer gástrico difuso hereditário (CGDH). De fato, a maioria das famílias envolvidas apresenta a forma difusa do tumor, porém, portadores da variedade metaplásica intestinal também vêm sendo descritos, mas sem correlação com mutações gênicas específicas (SHINMURA *et al*, 1999).

Câncer gástrico hereditário, forma difusa (CGDH)

Alterações no gene da caderina-E associadas a neoplasias malignas do estômago foi relatada pela primeira vez em três famílias Maori (GUILFOURD *et al*, 1998), Nova Zelândia, no ano de 1998, produzindo a primeira evidência concreta da

identificação de defeitos genéticos associados a parentes próximos com alto risco para neoplasias gástricas malignas. No CGDH, como em outras síndromes autossômicas dominantes, o portador apresenta um alelo do gene da caderina-E mutado presente tanto em suas células somáticas quanto nas germinativas. Em 1999, foram descritos casos de famílias européias e afro-americanas com mutações no gene da caderina-E e câncer de estômago (GUILFOURD *et al*, 1999, KELLER *et al*, 1999). Todas apresentaram lesões da linhagem difusa, sendo que nenhuma família com câncer do tipo intestinal apresentou, até o momento, mutações neste gene (SHINMURA *et al*, 1999, GUILFOURD *et al*, 1998, BECKER *et al*, 1994).

Câncer gástrico hereditário, forma intestinal

Este tipo é mais encontrado no Japão e em Portugal. Esta é uma informação de grande interesse para o Brasil por causa da imigração desses dois países. Vale destacar que esta síndrome foi relatada há muito pouco tempo, e ainda não foi associada com um genótipo específico. De fato, todos os casos da variedade intestinal estudados até o momento não apresentam mutações no gene da caderina-E, sugerindo fortemente que mutações neste gene definem um fenótipo histológico único, o câncer gástrico difuso hereditário (CUTAIT *et al*, 2001).

1.3- Fatores de risco

O câncer gástrico apresenta um prognóstico ruim, dessa forma, vários estudos estão voltados para a prevenção da doença e melhora na qualidade de vida. A reeducação alimentar, com base no consumo de frutas e vegetais é bem citado na literatura como forma preventiva no combate ao câncer gástrico (JI BT *et al*, 1996; BUIATTI E *et al*, 1990; CALLE EE, *et al*, 2003; HSING AW, *et al*, 1993) e também o consumo de chá verde (SETIAWAN VW, *et al* 2001; YU GP, *et al*, 1995). Relações entre risco para aparecimento de câncer e consumo de álcool e cigarros, (CHAO A, *et al*, 2002; JI BT, *et al*, 1996) e entre sobrepeso e obesidade também são citados relacionando-se ao câncer gástrico (CALLE EE, *et al*, 2003).

Outros fatores ambientais também estão descritos na literatura: o consumo elevado de sal, cirurgia gástrica anterior, infecção pelo *H. pylori* e história de lesões benignas (AICR, 1997; COTRAN RS *et al*, 1999; DE VITA VT Jr *et al*, 1997).

A patogênese do câncer gástrico representa um exemplo clássico de interação gene-meio ambiente. Por muitas décadas era bem definido que o câncer desenvolvia-se ao longo dos estágios histológicos e patofisiológicos bem definidos. Tanto a inflamação crônica como a atrofia gástrica era demonstrada como sendo a maior entidade patológica tendo como maior disfunção patológica a hipocloridia. Também foram associadas ao alto risco de câncer gástrico a acloridia, anemia perniciosa e indivíduos do grupo sanguíneo A (WEEKS, *et al*, 2000).

Levando em conta a hipótese etiológica genética pode-se afirmar que pacientes com câncer de cólon hereditário não polipóide e polipose adenomatosa familiar apresentam risco maior de desenvolver câncer gástrico (COTRAN RS *et al*, 1999).

E como resultados da exposição a fatores endógenos e exógenos podem ocorrer mutações somáticas nos proto-oncogenes os transformando em oncogenes ativados e nos genes supressores de tumor desativando-os, conferindo as células sua imortalização (CHO KR, *et al*, 1992).

Quanto aos fatores genéticos na tumorigênese gástrica, 4% dos casos são familiares (COTRAN RS, *et al*, 1999). Apoiando esses dados estão os estudos sobre as variações na incidência da doença em migrantes em decorrência de mudanças ambientais, principalmente dieta e fatores culturais. Na China, a frequência de câncer de estômago em homens foi 4 a 6 vezes mais elevada, quando comparada aos migrantes de mesma nacionalidade residentes nos EUA. Isso demonstra que o fator ambiental tem grande influência sobre a doença (AICR, 1997).

Diferentes mecanismos moleculares estão associados à etiologia do tumor gástrico. No tipo intestinal, por exemplo, ocorrem amplificações em *c-ERBB2*, *c-MET* e *ciclina E*, mutações no *K-RAS* – responsável pela transdução de mensagens da membrana ao núcleo, inativação da *APC*, *P53* – responsáveis pela regulação do ciclo celular, *p16*, *MGMT* e *MLH1*, perda de heterozigosidade (LOH) do *P73* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23. No tipo difuso, há redução ou perda de função das caderinas (proteínas de adesão), inativação do *P53*, LOH da região 17q21, amplificação dos genes *K-SAM*, *c-MET* – receptores de fatores de

crescimento e *ciclina E*, e redução na expressão das proteínas p27 e nm23. (CHAN AO *et al*, 2001; ENDOH Y *et al*, 2000; MAETA M *et al*, 2000; PARK WS *et al*, 2000).

1.4- *Helicobacter pylori* (H. Pylori)

A *H. pylori* é um bacilo gram negativo, descoberto em 1983 por Marshall e Warren. (Figura 3) (MARSHALL & WARREN, 1984). É considerada a bactéria de maior patogenicidade do mundo. Aproximadamente metade da população mundial é infectada pela *H. pylori*, sendo que em países em desenvolvimento apresentam 80-90% de infectados e em países desenvolvidos de 30-50% (GOODMAN *et al*, 2001). Foi classificada pela Organização Mundial da Saúde, em 1994, como agente carcinogênico do grupo I para a ocorrência de câncer gástrico (IARC, 1994). Apresenta características genéticas e fatores de virulência que lhe permitem sobreviver no estômago mesmo com seu pH muito ácido. Está tão bem adaptado ao estômago humano que, após a primeira infecção, que pode ocorrer precocemente na infância, ele estabelece uma infecção crônica para a vida toda (AGOSTINHO JÚNIOR, 2003). Os fatores de colonização utilizados pelo *H. pylori* são: a mobilidade conferida pelos flagelos; as adesinas, que se ligam a receptores específicos do hospedeiro e a produção de urease (SILVA *et al*, 1999).

Pesquisas demonstram que esta bactéria é responsável por muitas doenças gastroduodenais – gastrite crônica, úlcera péptica e linfoma de MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) (NIH Consensus Conference, 1994, Current European *in* ITO *et al*, 2006).

As principais causas para a promoção da gastrite são: a *H. pylori* e fatores auto-imunes como os anticorpos anti-células parietais (ITO *et al*, 2006). Estudos com a população japonesa confirmam esses dados. Uemura *et al* (2001), demonstrou que o câncer de estômago desenvolveu-se apenas em pacientes que tinham infecção por *H. pylori*. Esse estudo teve duração de 7,8 anos com uma amostragem de 1246 japoneses. Em 36 pacientes foi detectado câncer gástrico e presença de *H. pylori*. Não foi encontrado câncer nos pacientes *H. pylori* negativo (UEMURA *et al*, 2001).

A infecção por *H. pylori* é caracterizada pela inflamação da mucosa gástrica onde, no corte histológico, vê-se a presença de células mononucleares e neutrófilos. Os superóxidos, como o óxido nítrico na mucosa gástrica desenvolve um papel importante na carcinogênese como um mediador da formação da nitrosamina

carcinogênica, dano ao DNA e injúria tecidual. Goto e colaboradores (1999), demonstraram em seu trabalho que a expressão de óxido nítrico e de nitrotirosina em pacientes com gastrite crônica tem maior propensão ao desenvolvimento do câncer gástrico (GOTO *et al*, 1999).

Tem sido sugerido por alguns autores, que a erradicação da infecção reverte o processo inflamatório e, conseqüentemente, a atrofia, a metaplasia e a instabilidade genômica (César *et al*, 2002).

As vias oral-oral e fecal-oral parecem ser as principais formas de transmissão. (MARSHALL, 2000). Eslick, em 2001, relatou que a transmissão pode ocorrer sexualmente por via oral-anal.

Inflamações crônicas resultam na destruição das células parietais as quais são responsáveis pela produção de ácido clorídrico, seguida de alteração patofisiológica. O pH do suco gástrico é o maior determinante das concentrações de nitrito e da vitamina C. Quando está com a acidez diminuída, aumenta a concentração de nitrito e N-nitroso no suco gástrico. A vitamina C atua ativamente no suco gástrico eliminando nitritos e prevenindo, assim a formação de nitrosaminas. Baixas concentrações de vitamina C foram encontradas em pacientes com hipocloridia (REED *et al*, 1981).

Além disso, os fatores de crescimentos e as citocinas que atuam na resposta inflamatória são responsáveis pela promoção e proliferação de células cancerosas no estômago. Fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) têm sido reportados como agente desencadeador de células epiteliais tumorais na presença de *H. pylori* (ITO *et al*, 2006), pois esta atua no receptor da HGF estimulando-o (GOTO *et al*, 1999).

Para estabelecer-se no estômago a *H. Pylori* usa um mecanismo de neutralização da acidez (figura 4). Através da enzima urease, proteína de alto peso molecular (500 a 600KDa), hidrolisa a uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H⁺, gerando pH neutro no local onde há a colônia de bactérias, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez gástrica.

A urease catalisa a hidrólise da uréia para produzir amônia e carbamato. O ultimo composto decompõe-se em outra molécula de amônia e uma de ácido carbônico:

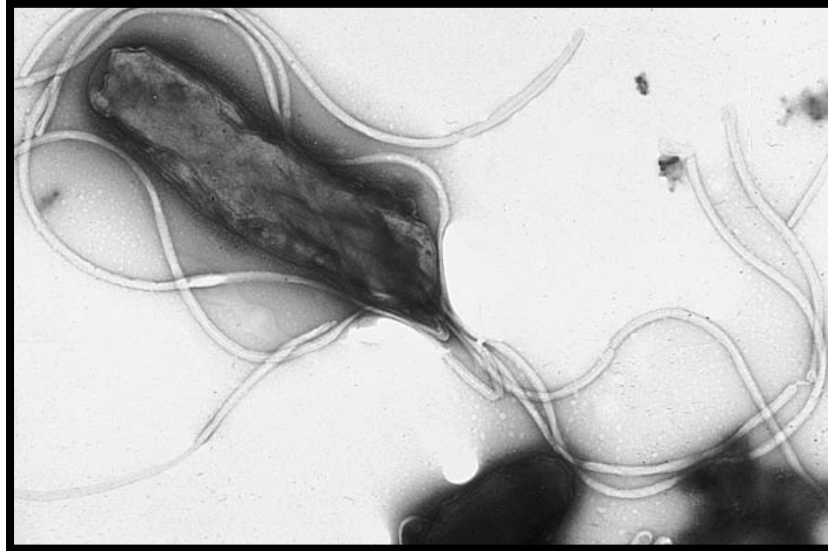
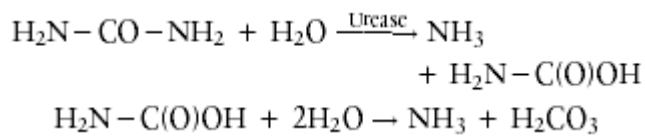


Figura 3. Eletromicrografia de *H. pylori* aumento de 600 × 400 pixel, tipo MIME: image/jpeg. Sua morfologia é homogênea, apresentando-se com estrutura encurvada ou espiralada, de superfície lisa e extremidades arredondadas, móvel, não-esporulada e microaerófila. Mede aproximadamente 0,5µm a 0,1µm de largura e 3µm de comprimento, possuindo de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e bulbos terminais nas extremidades lisas. (<http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/photo/photo002-6.htm>).

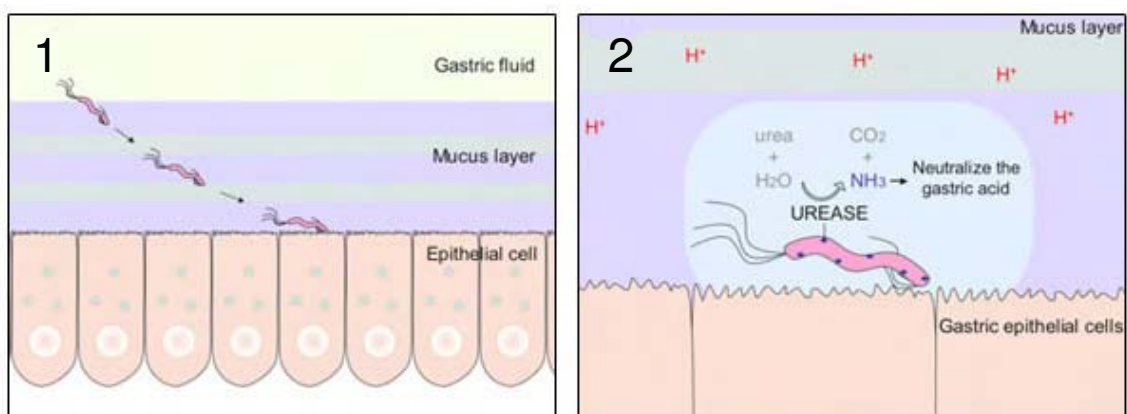


Figura 4. Esquema de infecção pela *H. pylori*. 1. *H. pylori* penetra na mucosa do estômago do hospedeiro e adere-se a superfície das células epiteliais. 2. Produção de amônia pela transformação de uréia através da uréase, tendo como resultado a neutralização do meio ácido do estômago. http://h.pylori.info/images/H_pylori_ulcer_diagram.jpg. Acesso: 10/10/2007.

Para sintetizar a urease, a bactéria tem um gasto energético de 6% do total de proteínas sintetizadas por ela (JENKS & KURTERS, 2000). Atuando juntamente com a urease, a urel, uma proteína de membrana que controla a entrada e saída de amônia na *H. pylori*. Quanto maior a necessidade de alcalinização da colônia, maior é a entrada de amônia no citoplasma da bactéria. A urel é codificada pelo gene *urel* da família urease. Estudos mostraram que a urease produzida pela *H. pylori* é liberada para o microambiente evitando o acúmulo no seu interior. Assim, a uréia que é um componente tóxico é sintetizada fora da bactéria (WEEKS *et al*, 2000).

Muitos estudos com *H. pylori* tem sido abordados em biologia molecular quanto ao mecanismo de inflamação. Recentemente foram identificados dois fatores de virulência bacteriana: a citotoxina vacuolizante (*vacuolating cytotoxin*, VacA) e a proteína associada a citotoxina (*citotoxin-associated protein*, Cag-A) as quais são codificadas pelos genes *vacA* e *cagA*, respectivamente.

Debellis *et al*, reportou que a VacA liga-se ao receptor Z da proteína tirosina fosfatase (Ptpz), a qual é um receptor específico encontrado nas células epiteliais do estômago. Ao ligar-se, estimula a via intracelular através da proteína G associada ao receptor Git1 (kinase-interator 1) e pleiotropina que induz a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando à exsudação de uréia para a luz da mucosa gástrica. VacA é considerada importante fator de virulência, pois produz alcalóides na síntese de urease, que podem induzir danos no DNA e consequentemente apoptose celular (DEBELLIS *et al*, 2001).

Parsonnet *et al*, em 1997, demonstraram em seus pacientes que os infectados pelas cepas que expressavam genes *cagA* tinham probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico comparado aos pacientes infectados por cepas *cagA*-. A proteína CagA produzida na bactéria é translocada para o interior da célula do hospedeiro através do sistema secretor tipo IV. Esse sistema é responsável por modular vias de metabolismo celular nas células hospedeiras incluindo a expressão de proto-oncogenes como *c-fos* e *c-jun*). O responsável pela codificação dos componentes desse sistema é a ilha *cag-PAI*, sendo o gene *cagA* o marcador dessa ilha de patogenicidade (COVACCI, A. *et al*, 1999). Por esse motivo, os níveis de expressão de citocinas estão muito elevados na presença de CagA. (BLASER *et al*, 2001).

Parece que a infecção por *Helicobacter pylori* atua como co-fator na carcinogênese gástrica, favorecendo o aparecimento de danos no DNA e alterando os processos de proliferação celular e apoptose (CÉSAR *et al*, 2002).

A taxa de apoptose é significativamente maior nos indivíduos infectados por cepas *cagA*-positiva concluído por estudos realizados com cultura celular. Por esse motivo há controvérsias (TARGA *et al*, 2005).

Outros dois genes envolvidos são: *babA* e *iceA*. O gene *babA* está envolvido a fatores de aderência da bactéria ao epitélio gástrico. É denominado fator de aderência *blood group antigen adhesin (babA)* e está ligado ao grupo sanguíneo Lewis^b (ILVER, D. *et al.*, 1998). Já *iceA* é conhecido como *induced by contact with epithelium (iceA)*, porém sua função ainda é incerta. Está associado a úlcera péptica e ao câncer gástrico (PEEK *et al*, 1999).

1.5 p53

1.5.1 - O gene p53 e o ciclo celular

Em condições normais, nas espécies multicelulares, a divisão celular ocorre por toda a vida substituindo células danificadas, que perderam sua função ou que sofreram apoptose (ALBERTS *et al*, 1997)

Experimentos recentes forneceram uma perspectiva diferente e simplificada demonstrando que um sistema-controle do ciclo celular é o que coordena o ciclo na íntegra. As proteínas desse sistema-controle estão em regiões conservadas do DNA e estão presente durante a evolução (ALBERTS *et al*, 1997)

A célula dos mamíferos apresenta uma estratégia de divisão com duração desse ciclo de aproximadamente 24 horas. O ciclo é tradicionalmente distinto em duas fases: a mitose - divisão celular propriamente dita. Compreendendo todo o processo de prófase, metáfase, anáfase e telófase. Neste último ocorre a citocinese a qual é considerada o fim da mitose, ou fase M do ciclo celular. Essa fase tem duração de 1 hora. A segunda fase do ciclo é conhecida como interfase onde o DNA do núcleo é replicado (ALBERTS *et al*, 1997)

A replicação do DNA é realizada na fase S da interfase (S = síntese). O intervalo entre o término da mitose e o início da fase S é conhecido de fase G1 (G = gap ou lacuna) e o intervalo final da síntese de DNA e o início da fase M é chamado

de fase G2. A importância da fase G1 e G2 durante a divisão é que nestas fases ocorre uma regulação quanto à replicação do DNA. Na fase G1 a célula controla seu crescimento por meio de sinalizadores. A fase G2 tem a função de assegurar a replicação total do DNA (ALBERTS *et al*, 1997)

O sistema controle do ciclo celular é um dispositivo bioquímico que opera ciclicamente através de proteínas que interagem entre si e que induzem e coordenam os processos dependentes essenciais responsáveis pela duplicação e divisão dos conteúdos celulares. Em um ciclo celular padrão, o sistema controle pode parar em pontos estratégicos específicos (pontos de checagem). Nestes pontos existem sinais de retro alimentação que são enviados ao próprio sistema controle que o estágio anterior foi cumprido para que ele possa ativar o próximo (ALBERTS *et al*, 1997).

O sistema controle está baseado em duas famílias de proteínas: as proteoquinases dependentes de ciclina (Cdk), as quais induzem processos dependentes da fosforilação de serinas e treoninas em proteínas específicas. A segunda família é a das proteínas ativadoras de ciclinas, que se ligam as moléculas de Cdk e controlam sua habilidade de fosforilar proteínas-alvo. A formação, ativação e a segregação dos complexos ciclinas - Cdk são eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular. As ciclinas são assim denominadas, pois sofrem um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo de divisão celular. Existem duas classes de ciclinas: ciclinas mitóticas, que se ligam às moléculas de Cdk durante a fase G2 para iniciar a mitose, e as ciclinas G1, que se ligam às moléculas de Cdk durante a fase G1 e são requeridas para o início da fase S (NURSE, 2000).

Estudos genéticos em leveduras revelaram que o ciclo celular é uma via dependente, ao longo do quais novos eventos do ciclo celular ocorrem somente quando processos anteriores já foram completados. Assim, mutações em genes essenciais para a progressão do ciclo celular podem fazer com que toda a cultura de leveduras se acumule em um determinado ponto do ciclo celular. Este ponto é definido como o ponto de retenção. Os mutantes que preenchem esses critérios são denominados mutantes do ciclo de divisão celular ou mutantes CDC (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Muitos tipos de câncer são causados por uma desregulação do crescimento celular nas fases G1 e G2. As células que perderam esta característica de regulação do crescimento são denominadas transformadas (SHERR, 1996).

O mau funcionamento do ponto de restrição é um fator que contribui para a transformação celular. Um ou mais componentes do sistema *p16/ciclina D/Cdk-4/Rb* estão mutados em parte nos cânceres humanos. Além disso, vários vírus causadores do câncer, como o *Simian vírus 40* (SV40) e o adenovírus, produzem proteínas que facilitam a transição G1/S através de ligação com a pRb (proto-oncogene) e liberação da E2F (fator transcricional que age como supressor de tumor) (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

As células cancerosas possuem anormalidades em duas classes de genes: oncogenes e genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes cuja ativação indevida pode causar transformação oncogênica das células. Quando ativados dessa forma são conhecidos como oncogenes. Os produtos protéicos da maioria dos proto-oncogenes são reguladores do crescimento e da proliferação celular, sendo então componentes das vias de transdução de sinais controlados por mecanismos de retroalimentação. Já os genes supressores de tumor são genes cuja inativação pode levar a transformação cancerosa. Seus produtos protéicos inibem caracteristicamente os produtos de oncogenes ou regulam negativamente a proliferação celular (SHERR, 1996).

Como resultados de exposição danosa ao DNA, ocorrem mutações somáticas nos proto-oncogenes os transformando em oncogenes ativados e nos genes supressores de tumor, conferindo as células sua imortalização (CHO KR *et al*, 1992).

Pontos de checagem no período anterior a fase S são de suma importância, pois, devido a mecanismo semiconservativo da replicação do DNA, pelo qual fitas de DNA existentes servem de molde para as fitas recém-sintetizadas, qualquer defeito no DNA nessa fase torna-se perpetuado como uma mutação que é transmitida a toda progênie futura da célula. Pontos de checagem são vias moduladoras que atuam no ciclo celular. Quando ativados, os pontos de checagem bloqueiam a progressão ao longo do ciclo, temporária ou, em alguns casos, permanentemente. Em certos casos, a ativação do ponto de checagem leva à apoptose. Os pontos de checagem são ativados por proteínas-sensores que por sua vez ativarão proteínas-quinase que modificam proteínas-alvo, que então bloqueiam a progressão do ciclo celular (HARTWELL & WEINERT, 1989).

1.5.2- O gene e a proteína p53

Na região 17p13.1 está localizado o supressor de tumor *TP53* ou *p53*. Este é formado por 11 exons e 10 introns, e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD (figura 5) (HOLLSTEIN *et al*, 1991).

Seu produto tem papel essencial na regulação da proliferação celular e, em presença de lesões no DNA, é responsável pelo retardo do ciclo celular entre as fases G1-S. Nos casos em que o DNA não é reparado adequadamente, a proteína p53 ativa o processo de apoptose por meio da regulação transcricional e da interação direta com as proteínas bcl-2 e bax. (CÉSAR *et al*, 2002).

A proteína p53 foi primeiramente identificada em 1979 em estudo com o vírus "simian 40 (SV40)" e o antígeno T. Esta proteína tem elevado nível de expressão em tumores e em células transformadas (HARRIS *et al*, 1993). É composta por 393 aminoácidos e tem sido dividida estruturalmente e funcionalmente em quatro domínios. (LEVINE, 1997). É alvo de outros vírus, como o Adenovírus, HPV16 e HPV18 (STRACHAN & READ, 2002; SARNOW & WILLIAMS, 1982).

O primeiro domínio, com 42 aminoácidos, está localizado na porção N-terminal e é considerado como um domínio de ativação transcricional basal para a regulação positiva da expressão do gene. Já são conhecidas as funções de alguns aminoácidos da p53. Os aminoácidos F19, L22 e W23, por exemplo, são responsáveis pela ativação transcricional *in vivo* (LIN *et al*, 1995). Estes mesmos aminoácidos ligam-se (*in vitro*) a fatores associados ao TATA— TAF₁₁₇₀ e TAF₁₁₃₁, ambos são subunidades da TF11D (LU e LEVINE, 1995). A ativação transcricional da p53 é regulada negativamente pelo adenovírus E1B-55kd e pela proteína humana MDM2 os quais se ligam a p53, através dos aminoácidos 22 e 23 da p53. Assim, a regulação negativa da p53 interfere na ativação transcricional (LIN *et al*, 1995).

O sítio de ligação da p53 está localizado entre os aminoácidos 102 e 292. Ele é protease-resistente e contém um íon zinco (Zn⁺²), o qual é necessário para que ocorra a ligação específica no DNA. Este domínio se localiza na porção β da proteína e faz ligação de forma antiparalela as duas α hélices interagindo diretamente com o DNA (CHO *et al*, 1994). A proteína p53 tetramérica (dímero de um dímero), liga-se a quatro repetições de uma seqüência específica do DNA (5' PuPuPuC (A/T)-3'), e esta seqüência se repete em dois pares um em frente ao outro. Os aminoácidos K120, S241, R273, A276 e R283, fazem contato no DNA, com o fosfato na maior curvatura

enquanto os K120, C277 e R280, interagem na porção de hidrogênio, de menor curvatura (CHO *et al*, 1994).

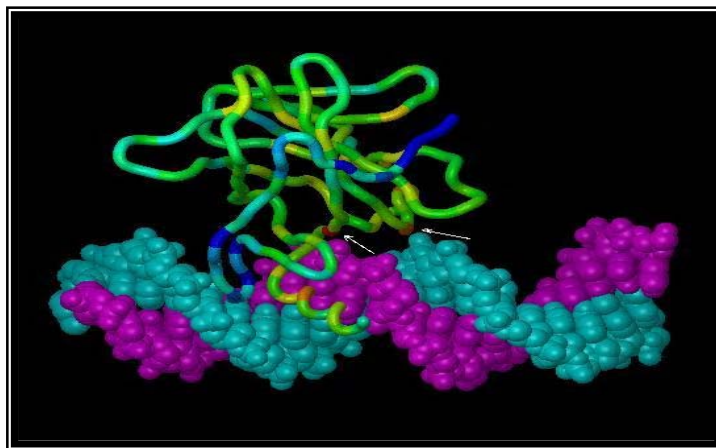


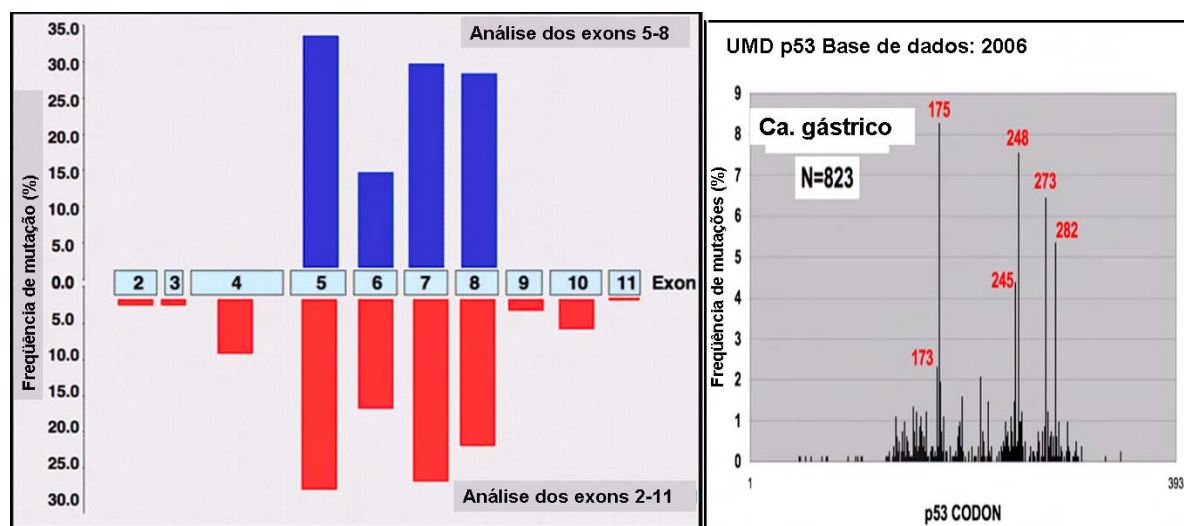
Figura 5. Modelo estrutural da proteína p53 ligada ao DNA.. A molécula p 53 está colorida de acordo com a frequência de mutações nas células tumorais. (azul, muito pouca, vermelho, muitas). Dois resíduos de alta frequência de mutação está indicado pelas setas brancas. (CHO *et al*, 1994) (<http://www.bioinf.org.uk/p53/>). Acesso em: 10/10/2007.

A proteína p53 selvagem é um tetrâmero em solução, e os aminoácidos 324 a 355 são necessários para que haja essa oligomerização. A estrutura desse domínio contém um dímero com duas cadeias β e α hélices. Esses dois dímeros são unidos por uma grande superfície hidrofóbica e cada par dessas hélices formam mais quatro feixes de hélices. Essa tetramerização liga-se a porção específica do DNA por um ligante de 37 aminoácidos (287 a 323) (JEFFREY *et al*, 1995).

Os 26 aminoácidos da porção C-terminal formam uma abertura (protease-sensitiva) composta por 9 aminoácidos básicos que se ligam facilmente ao DNA ou RNA por meio de alguma seqüência ou estrutura preferencial (LEE *et al*, 1995).

Mais de 90% das mutações da p53 ocorrem na seqüência específica de ligação ao DNA no domínio central e são codificadas pelos exons 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e 50% alteram os códons 175, 248, 249, 273 ou 282 dentro desse domínio (regiões chamadas de “*hot spot*”) (Figura 6). Estas mutações estão divididas em duas classes. A primeira classe é a das mutações em aminoácidos com R248 e R273. São as mais freqüentes e resultam em ligações defeituosas ao DNA e também a perda da atividade da p53 como fator transcricional. A segunda é quando ocorre ruptura da

base estrutural da porção β da hélice do DNA. Isso prejudica a ação de ligação a esse domínio. Esta alteração estrutural, ou seja, mudança na sua conformação produz uma proteína que reage com um anticorpo monoclonal denominado Pab240 o qual não é possível se a p53 se encontra na conformação original (CHO *et al*, 1994).



a. Distribuição de mutações em cada exon do gene *p53*. Estudos direcionados a região central (exons 5-8). b. Códons que apresentam maior frequência de mutações.

Alterações genéticas têm papel decisivo no aparecimento de várias neoplasias humanas e estas, geralmente, ocorrem em uma única célula somática, que então se divide e continua se desenvolvendo até formar um câncer. É raro, porém, quando a neoplasia maligna ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditário, as alterações iniciais são herdadas por meio de linhagem germinativa e, portanto estão presentes em todas as células do organismo (MALCOLM *et al*, 2006)

Mutações e polimorfismos são duas alterações genéticas freqüentes. As mutações são representadas pela substituição de bases, alterações na organização ou no tamanho das seqüências, incorporação do DNA extracromossômico e alterações anafásicas ou da citocinese. Elas podem ser tipo *missense* (substituição de um nucleotídeo, alterando um códon de modo que há substituição de aminoácido), *nonsense* (mutação sem sentido, resultando na expressão de uma proteína truncada) e *frameshift* (deleção ou inserção de bases que causam um deslocamento na fase de leitura, que alteram a seqüência de aminoácidos a partir do ponto de mutação). Essas alterações estão associadas à frequência de alelos heterozigotos presentes em menos de 2% da população (BRASILEIRO-FILHO *et al*,

1998). Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas uma base. A frequência de alelos heterozigotos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 2% da população. Algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em sequências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (ANSCHAU *et al*, 2005).

No fim da década de 80, por meio de experimentos, definiu-se que a p53 era uma proteína anti-oncogênica. Genes *p53* selvagens foram introduzidos em células e agiram como supressor de crescimento. Testes em ratos homozigotos “*null*” para *p53* apresentaram alta predisposição para desenvolvimento de tumores (KO *et al*, 1996).

A expressão de altos níveis de *p53* selvagem revela duas situações: reparo no ciclo celular ou indução a apoptose. Dessa forma atua como um “*check point*” em resposta ao estresse genotóxico atuando como um “breque” de emergência, protegendo o genoma do acúmulo excessivo de mutações (KO *et al*, 1996).

É essencial no ponto de checagem na fase G1, pois ativa um conjunto de genes-alvo, incluindo a proteína inibidora universal de CDK, a p21, codificada pelos genes *cdk* e *p21*. A p53 também participa em outros pontos de checagem durante a fase G2 e mitose (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Uma alternativa de atuação da p53 a danos não reparados, caso a via com a proteína pRb não esteja intacta, é a indução da apoptose (morte celular programada). Quando pRb está desfosforilada, se liga a E2F, e o ponto de restrição é fechado, bloqueando a progressão do ciclo celular. A fosforilação de pRb pelas CDKs libera o fator de transcrição E2F, de modo que a barreira do ponto de restrição é rompida e a progressão do ciclo celular procede. Além disso, *p53* também promove um *check point* de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene. Portanto, quando *p53* sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno (WEINERT, 1998).

Quando p53 sofre alguns tipos de mutações pode exercer um efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo mutado interage e inativa o alelo normal,

induzindo o câncer e atuando, portanto, como um oncogene (LEVINE, 1997). Caso a célula receba uma dose de radiação a qual danifica a base de um nucleotídeo no gene da proteína p53 na fase S ou G2, por exemplo, a informação na cópia inalterada do gene pode ser usada para reparar o dano. O atraso no ciclo celular aumenta a chance de um reparo bem-sucedido. Por outro lado, se o ponto de checagem falhar, a célula entra em mitose, as cromátides irmãs são separadas uma das outras, e este dano nunca será reparado. Como consequência, uma célula filha desta divisão carregará o dano no gene *p53*, e debilidade em sua capacidade de regulação do crescimento no ponto de restrição na próxima fase G1. A perda de genes supressores de tumor tais como *p53* e *pRb*, é a principal causa de câncer (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Apesar das mutações em *p53* serem observadas principalmente em células somáticas, as que ocorrem em células germinativas são responsáveis pela Síndrome de Li-Fraumeni. Trata-se de uma síndrome rara de câncer hereditário, com padrão de herança autossômico dominante, que se caracteriza pela predisposição a tumor cerebral, sarcomas, leucemias e carcinoma adrenocortical em crianças e adultos jovens (LI FP *et al*, 1988). Entretanto, as taxas elevadas de câncer que ocorrem nessa síndrome indicam que, embora a p53 não seja essencial para a passagem de cada ciclo celular, ela é essencial para a estabilidade genética e para manutenção de um equilíbrio adequado entre proliferação, diferenciação e morte celular (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

A p53 é regulada por uma proteína denominada Mdm2, uma ubiquitina-ligase (E3) que mantém os níveis de p53 baixos durante o ciclo celular. Funciona como um mecanismo de retroalimentação negativo. Tanto a p53 quanto a Mdm2 movem-se do núcleo ao citoplasma e quando estas estão no citoplasma a Mdm2 promove a rápida degradação de p53 pelo sistema ubiquitina-proteassomo. (PICKART, 2001).

Como consequência de dano ao DNA, a p53 é fosforilada por várias proteínas - quinases incluindo a quinase mutante em ataxia-telangiectasia (ATM) e a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK). DNA-PK também fosforila Mdm2. Por mecanismos incertos estas fosforilações previnem a ligação de Mdm2 a p53. Assim, a concentração de p53 é aumentada no núcleo resultando na transcrição de genes regulados por ela (PRIVES, 1998).

Mutações em ATM provocam uma doença conhecida como ataxia-telangiectasia, com defeitos na indução do ponto de checagem de reparo do DNA

podendo levar ao câncer. Em camundongos, a carência de DNA-PK, promove a imunodeficiência combinada grave (SCID) devido a defeitos no rearranjo gênico durante a maturação das imunoglobulinas (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

A progressão desregulada do ciclo celular estimula a expressão da proteína supressora de tumor p14^{ARF}, que liga e seqüestra Mdm2 no nucléolo, permitindo, assim o acúmulo de p53 no núcleo onde irá ativar uma via que promoverá a apoptose celular. Os genes-alvos ativado pela transcrição da p53 envolvidos na apoptose são: *Bax*, *CD-95 (Faz/Apo1)* e o *Apaf-1* (SHERR, 1996).

O ponto de checagem em G2 envolve três tipos de componentes: sensores, quinases e efetores. Os sensores detectam um dano no DNA e ativam proteínas-quinase especializadas que transmitem esta informação a uma série de moléculas efetoras. Os efetores, então, bloqueiam direta ou indiretamente a progressão do ciclo celular (POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Pelo menos cinco genes estão envolvidos na detecção de danos ao DNA. Três deles traduzem um complexo em células humanas: hRad9, hRad1 e hHus1. Estas células apresentam seqüências similares ao PCNA, um co-fator essencial da DNA-polimerase, a qual tem um papel importante no reparo do DNA. PCNA (antígeno nuclear da proliferação nuclear) é uma molécula trimérica que circunda o DNA e desliza ao longo dele (SMITS & MEDEMA, 2001 *in* POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Ao detectar o dano, os vários sensores transmitem esta informação a uma família de proteínas-quinase que fosforilam proteínas que interrompem a transição G2/M. A quinase mais conhecida é a ATM já mencionada acima. Outro membro da família de quinases relacionado ao ponto de checagem é a ATR (ataxia-telangiectasia relacionada à Rad3) (SMITS & MEDEMA, 2001 *in* POLLARD & EARNSHAW, 2006).

Quando ATM e ATR são informadas de dano no DNA, fosforilam ao menos dois substratos importantes: a p53 e a proteína Chk1 (checkpoint kinase 1) (figura 7). A Chk1 é ativada por fosforilação e, em resposta, fosforila o indutor mitótico essencial Cdc25C inibindo sua atividade. Em consequência da fosforilação de Chk, também é produzido um sítio de ligação para um grupo de proteínas adaptadoras, as 14-3-3. Essas proteínas ligam-se a proteínas-alvo. Como resultado da ligação de 14-3-3, a Cdc25C é seqüestrada no citoplasma contribuindo para o bloqueio da transição G2/M (SMITS & MEDEMA, 2001 *in* POLLARD & EARNSHAW, 2006).

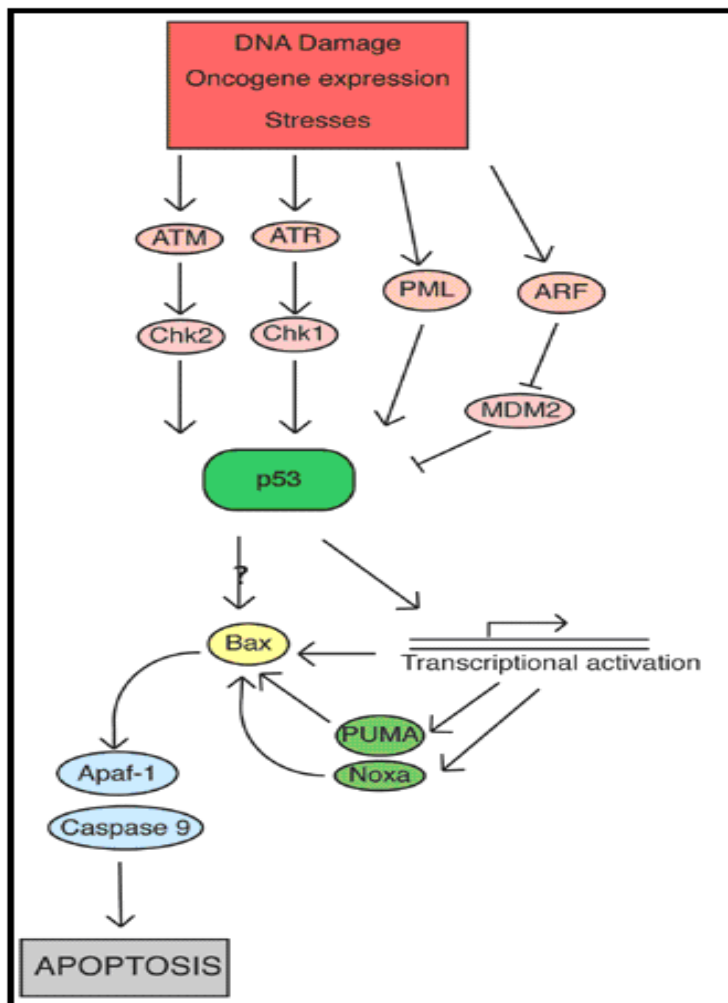


Figura 7. Esquema representativo da ativação da p53 por ATM e ATR levando a célula à apoptose. (Genesetbank, 2000, acesso em 16/07/2007).

A p53 é outro principal alvo de ATM/ATR em resposta aos danos no DNA. Ela regula a expressão de proteínas como a p21 (WAF1/CIP1), que inibe a Cdk1-ciclina B1. A expressão da p21 proporciona o bloqueio efetivo do início da prófase por Cdk1-ciclina A. A p21 também participa do ponto de checagem em G1 (COUTTS *et al*, 2005).

Um segundo alvo da p53 do ponto de checagem de G2 é uma outra proteína 14-3-3, a 14-3-3 δ (Sua função está ilustrada na figura 8). A 14-3-3 δ liga-se à Cdk1-ciclina B1 e interfere em seu tráfego entre o núcleo e o citoplasma. Como resultado, a Cdk1-ciclinaB1 permanece no citoplasma. O complexo 14-3-3 δ /Cdk1-ciclinaB1 também contém a quinase inibitória Wee1, o que aparentemente fornece um nível adicional de garantia de que a quinase Cdk1, quando associada à ciclina B1,

permanece inativa. A ruptura do gene que codifica a 14-3-3 δ é fatal para as células se estas forem portadoras de dano no DNA. Ao invés de ativarem seu ponto de checagem de G2, estas células entram em um estado aberrante, com características tanto de mitose quanto de apoptose e morrem (HARRIS & LEVINE, 2005).

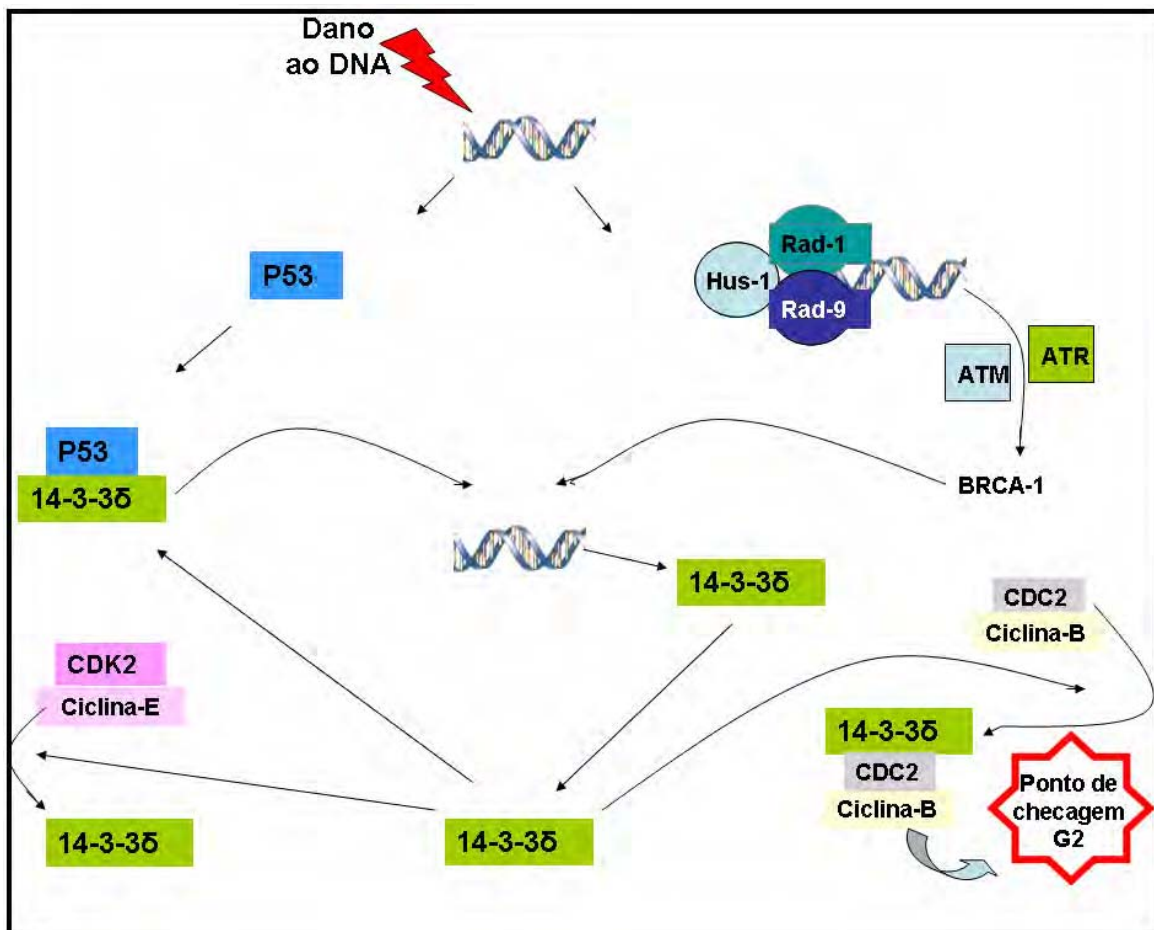


Figura 8. Após ocorrer dano ao DNA a 14-3-3 δ sinaliza a p53 e esta desempenha sua função como fator de transcrição (AMBION, 2006 modificado, Acesso em 12/11/07).

1.5.3- O gene supressor de tumor *p53* e Câncer

Alguns artigos tentam demonstrar a associação das mutações no gene *p53* aos tumores. Os exons 5 a 8 são os que sofrem maior número de mutações, já que compreendem regiões altamente conservadas durante a evolução dos vertebrados, sugerindo alto grau de importância funcional. A proteína p53 normal tem efeito

inibitório na proliferação e na transformação celular, mantendo as células em repouso na fase G1 do ciclo celular, como citado anteriormente. (FINLAY CA *et al*, 1989). Vega e colaboradores realizaram um estudo imunohistoquímico relacionando mutações dos exons 5 ao 9 com a evolução clínica de um tipo de câncer de pulmão – o NSCLC (*non-small cell lung câncer*). Eles demonstraram que a presença de mutação no exon 5 está associada com a baixa sobrevida de pacientes com esse tipo de câncer (VEGA *et al*, 1997).

Para o mesmo tipo de câncer de pulmão outros autores demonstraram por meio de sequenciamento de DNA, que os exons 7 e 8 contribuem para um prognóstico ruim. Os piores índices de sobrevivência ocorreram na presença de mutações no exon 7 em comparação ao pacientes que apresentaram a p53 selvagem nos cânceres NSCLCs e adenocarcinomas (42.9% vs 56.0%; P=0.025 e 33.3% vs 53.8%; P=0.048, respectivamente). No entanto a sobrevida dos pacientes com mutações no exon 5 foi semelhante a aquelas de pacientes com p53 do tipo selvagem (HUANG *et al*, 1998).

Em mutações no exon 8 os resultados de sobrevida são piores em comparação aos pacientes com p53 do tipo selvagem em NSCLCs, adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas (22.9% vs 56.0%; P<0.001, 19.0% vs 53.8%; P=0.004 e 33.3% vs 62.5%; P=0.042, respectivamente) (HUANG *et al*, 1998).

Análise dos exons 5 a 9 por sequenciamento de DNA demonstrou que mutações no exon 7 da p53 prevaleceram nos pacientes com carcinogêneses colorretais nos estágios tardios e assim indicando um prognóstico ruim da doença. Por esse motivo, de acordo com esses resultados, mutações afetando o exon 7 da p53 podem ser consideradas um importante marcador biológico nos cânceres colorretais (INIESTA *et al*, 1998).

Mutações no gene *p53* relacionam-se também a cânceres retais em mulheres. Um estudo realizado na Finlândia associou mutações nos exons 4 ao 8 da p53 a mutações no gene K-ras. Por meio de sequenciamento automático, foi demonstrado um alto índice de mutações nos dois casos, indiferente da herança genética. A frequência de mutações no gene *p53* apresentou-se acima de 56%. No gene K-ras, a frequência foi de 15%, significativamente menor em comparação a que ocorre em cânceres de cólon (51%) (SERVOMAA *et al*, 2000).

Em câncer de ovário mutações ocorrem em alta frequência segundo análises por sequenciamento automático do DNA. Mutações foram detectadas em média de 14% dos tumores. O tipo de mutação mais encontrado foi a deleção na frequência de 7 para 1. Seis deleções ou inserções afetaram o exon 5 e outras deleções o exon 7. Duas deleções ou inserções não prejudicaram a leitura do fragmento, o produto da proteína foi expresso em altas concentrações em todos os casos. Em suma, mutações tanto inserções como deleções que acontecem no gene *p53* não são raras em cânceres de ovário, principalmente no exon 5 do gene (88%) dos casos (ANGELOPOULOU *et al*, 1998).

1.5.4- O gene e a Proteína P53 em Câncer Gástrico

Em carcinomas gástricos, a frequência de mutações do p53 varia de 4% a 64%, dependendo principalmente do tipo de técnica utilizada para a detecção. Numerosos trabalhos têm sido realizados na tentativa de se demonstrar a relevância clínica das alterações do p53 nos pacientes com carcinomas gástricos, porém os resultados são controversos em diversos aspectos: a relação entre a expressão de p53 e a diferenciação dos carcinomas (tipos intestinal vs. difuso) (LEE *et al*, 1995, BEGNAMI *et al*, 2005), a associação com prognóstico ruim e a resposta clínica ao tratamento quimioterápico (BEGNAMI *et al*, 2005; NAKATA *et al*, 1998).

Ao ocorrer mutação ou deleção desse gene inicia-se a tumorigênese gástrica, também observada em lesões benignas ou pré-cancerosas, como gastrite atrófica, metaplasia, intestinal e displasia. (SHIAO YH *et al*, 1994).

Quando ocorre a inativação do gene supressor de tumor - por perda de LOH, mutação *missense* e deleção *frameshift* - o câncer se manifesta, pois se inicia uma desordem no ciclo celular. Este fato é observado em mais de 60% dos cânceres gástricos. (SANO T *et al*,1991; OCHIAI A *et al*, 1996; MALCOLM G SMITH *et al*, 2006). Há referências a respeito de perdas da região do braço curto do cromossomo 17 em 43% dos adenomas e 67% dos carcinomas e perda da heterozigosidade em 73% dos adenocarcinomas (CÉSAR *et al*, 2002)

Dependendo da localização do câncer, mutações podem ocorrer em diferentes sítios de nucleotídeos. Nos cânceres de intestino de tipo difuso, por exemplo, ocorre a troca das bases AT por CG. Esta transição pode ser causada por N-nitrosaminas carcinogênicas que estão presentes em alimentos e também podem ser produtos dos

ácidos gástricos. (MIRVISH,1971 *in* MALCOLM G SMITH *et al*, 2006). Mutações no códon 72 do exon 4 da p53 têm sido associadas ao aumento do risco para aquisição de câncer gástrico (PEREZ-PEREZ GI, *et al*, 2005).

Mecanismos moleculares associados ao câncer de estômago podem ser citados: amplificações em *c-ERBB2*, *c-MET* e *ciclina E*, mutações no *K-RAS*, inativação do *APC*, *TP53*, *p16*, *MGMT* e *MLH1*, perda de heterozigosidade (LOH) do *TP73* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23, nos tipos intestinais e redução ou perda de função das caderinas, inativação do *TP53*, LOH da região 17q21, amplificação dos genes *K-SAM*, *c-MET* e *ciclina E* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23 em casos de tipo difuso Estes genes tem papel importante na: codificação de receptores de membrana, receptores de fatores de crescimento, controle do ciclo celular e adesão celular (CÉSAR *et al*, 2002).

Alterações epigenéticas também estão envolvidas no processo da tumorigênese: a ativação da telomerase (enzima responsável pela adição de seqüências teloméricas às extremidades dos cromossomos, com a finalidade de compensar as perdas que ocorrem em cada divisão celular) foi observada em vários casos de metaplasia intestinal e adenomas gástricos (OCHIAI A *et al*, 1996).

Alguns estudos mostram uma relação entre alterações no gene *p53* e infecção por *Helicobacter pylori*. DEGUCHI *et al*. observaram freqüências mais elevadas de mutações neste gene em pacientes com câncer gástrico infectados pelo *H. pylori cagA+* do que nos grupos *H. pylori*-positivo/*cagA*-negativo e *H. pylori*-negativo (DEGUCHI *et al*, 2001). KONTUREK *et al*, em 2006 mencionou que o *Helicobacter pylori* é o maior iniciador de mudanças inflamatórias e alterações na mucosa gástrica acompanhada por uma super expressão de certos fatores de crescimento como a gastrina e a COX-2 (ciclooxigenase-2) e de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, levando a proliferação de células atróficas mutadas, excesso de angiogenese, inibição da apoptose e formação de tumor gástrico. (KONTUREK *et al*, 2006).

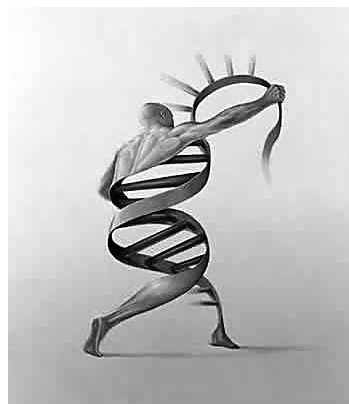
Há também indicações de que a infecção crônica pelo *H. pylori* é responsável pela instabilidade genômica observada em alguns casos de gastrite atrófica crônica (HIBI K *et al*, 1997).

Apesar dos inúmeros estudos envolvendo o câncer gástrico, ainda faltam detalhes importantes para o auxílio na prática clínica. O gene supressor de tumor *p53* pode ser um modelo utilizado como diagnóstico e prognóstico para essa doença através do sequenciamento de DNA. Alterações do gene *p53* são consideradas

críticas para o desenvolvimento de muitos cânceres. As mutações podem servir como indicadores moleculares de pacientes com propensão a cânceres ou com uma identificação prévia de mutação, em se tratando de tumores primários. Segundo Goh e colaboradores, (1995), o prognóstico do câncer deve ser analisado de acordo com a natureza das mutações da *p53*. Desde a descoberta do gene *p53*, mais de 6000 mutações têm sido reportadas. Assim, selecionamos os exons 5, 6, 7, 8.e 9, pois apresentam grande número de mutações.

Neste trabalho foi averiguado o padrão de mutações do gene *p53* nas amostras de câncer gástrico armazenadas no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, as quais já têm sido examinadas para diferentes questões concernentes ao desenvolvimento do câncer gástrico. Tais resultados nos proporcionaram uma maior clareza e riqueza nas discussões do processo de carcinogênese em tal casuística.

Objetivo



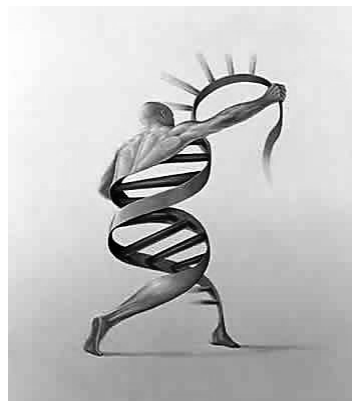
2- Objetivo geral

Detectar mutação nos *exons 5-9* do gene *p53* em amostras de câncer gástrico e associar dados com cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*.

Objetivos específicos

1. Levantamento das amostras de DNA de câncer gástrico estocadas em nitrogênio líquido que foram coletadas para pesquisas anteriores.
2. Padronização da amplificação da região gênica a ser analisada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).
3. Análise, quantificação e purificação do produto da PCR para os exons 5 a 9 de *p53*.
4. Sequenciamento dos produtos de PCR para os exons 5 a 9 purificados.
5. Análise da reação e comparação das seqüências aos bancos de dados.
6. Classificação quanto ao tipo de mutação.
7. Avaliação estatística dos resultados obtidos e associação com dados clínicos dos pacientes.

Casuística e métodos



3- Casuística e métodos

3.1- Coleta de material.

Para a realização deste projeto, foi utilizada uma casuística de 55 pacientes portadores de tumores do sistema gástrico de diferentes tipos histológicos e estadiamento clínico. Tais amostras foram obtidas de peças cirúrgicas (gastrectomia total ou parcial) removidas nos centros cirúrgicos do Departamento de Gastrocirurgia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú e do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Todos os pacientes admitidos foram devidamente informados com relação a pesquisa e após exauridas todas as suas dúvidas quanto à pesquisa e detalhes da coleta, estes assinaram o Termo de Informe e consentimento, retendo uma cópia. Tais amostras foram coletadas seguindo o mesmo padrão de protocolo adotado para as peças destinadas ao Projeto Genoma Clínico. Logo após a coleta em tubo de polipropileno ideal para congelamento, as amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e estocadas em bujão devidamente etiquetadas, até o momento de sua microdissecção e utilização para a extração de seu DNA. As amostras que foram utilizadas neste projeto fizeram parte dos projetos de pesquisa *Análise de tumores gástricos infectados pelos agentes tumorigênicos Helicobacter pylori e vírus Epstein Barr* (aprovação Comitês de Ética 191/02 Prot. 65/02 e CEPFHAC 056/06) e *Deteção de agentes tumorigênicos e sua correlação com o padrão de metilação de promotores de genes da caderina-E e MLH I no câncer gástrico* (aprovação Comitê de Ética 306/2004).

Dos 11 exons existentes na *p53* foram analisados os exons 5, 6, 7, 8 e 9 por serem pontos conservados do DNA que apresentam elevado índice de mutações.

3.2- Extração do DNA total.

A extração do DNA genômico foi realizada com a utilização do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo o protocolo do fabricante a partir de tecidos tumorais do estômago, preservados em água milli-Q. Após a extração a qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etideo.

3.3- Amplificação e seqüenciamento.

As reações de amplificação ou PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas em termociclador MJ Research, INC, modelo PTC- 100 TM, em volume total de 25 µl, contendo diferentes concentrações de reagentes para cada exon. Os oligonucleotídios iniciadores utilizados encontram-se na tabela1.

Tabela 1. Seqüência dos *primers* utilizados.

Exon 5	5'-TACTCCCCTGCCCTCAACAA-3', <i>sense</i>
	5'-CACCATCGCTATCTGAGCA-3', <i>antisense</i> ,
Exon 6	5'-CAGGGCTGGTTTCCCAGGGTCCCCA-3', <i>sense</i>
	5'-CAGGCGGCTCATAGGGCA-3', <i>antisense</i>
Exon 7	5'- CTTGCCACAGGTCTCCCCAA -3', <i>sense</i>
	5'- AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA -3', <i>antisense</i>
Exon 8 e 9	5'-AGTGGTAATCATCTGGGACGG-3', <i>sense e</i>
	5'-TATCTCCATCCAGTGGTTTC-3', <i>antisense</i>

Amplificação por PCR do exon 5 do gene *p53*.

Para a amplificação de um fragmento com 196 pares de bases do exon 5 de *p53* foi utilizado tampão de PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8.4) e 50 mM KCl], 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (Pharmacia) 0,24 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen) (tabela1), 1 unidade de *Easy Taq DNA Polymerase* (LGC), 25 ng de DNA, sob as seguintes condições térmicas: temperatura inicial 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto., anelamento a 62°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles negativos e positivos para a amplificação do exon mutado do gene *p53*, assim como um controle negativo para contaminação (água) foi utilizado em cada reação de amplificação.

Amplificação por PCR do Exon 6 do gene *p53*.

Para a amplificação de um fragmento de 165 pares de bases foi utilizado: tampão de PCR 1X [20 mM Tris–HCl (pH 8.4) e 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (Pharmacia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1 unidade de *Easy Taq DNA Polymerase* (LGC), 25 ng de DNA, sob as seguintes condições térmicas: temperatura inicial 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 67 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Controles negativos e positivos para a amplificação do exon mutado do gene *p53*, assim como um controle negativo para contaminação (água) serão utilizados em cada corrida.

Amplificação por PCR do Exon 7 do gene *p53*.

Para a amplificação de um fragmento de 200 pares de bases foi utilizado: Tampão de PCR 1X [20 mM Tris–HCl (pH 8.4) e 50 mM KCl], 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (Pharmacia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1 unidade de *Easy Taq DNA Polymerase* (LGC), 25 ng de DNA, sob as seguintes condições térmicas: temperatura inicial 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Controles negativos e positivos para a amplificação do exon mutado do gene *p53*, assim como um controle negativo para contaminação (água) serão utilizados em cada corrida.

Amplificação por PCR dos exons 8 e 9 do gene *p53*.

Para a amplificação de um fragmento de 290 pares de base utilizou-se: tampão de PCR 1X [20 mM Tris–HCl (pH 8.4) e 50 mM KCl], 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (Pharmacia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1 unidade de *Easy Taq DNA Polymerase* (LGC), 25 ng de DNA, sob as seguintes condições térmicas: temperatura inicial 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Controles negativos e positivos para a amplificação do exon mutado do gene *p53*, assim como um controle negativo para contaminação (água) serão utilizados em cada corrida.

O produto da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), em tampão TBE (EDTA 2mM; Tris 89mM; Borato 89mM), a uma

voltagem de 100 V. Foi utilizado como marcador de peso molecular o 100bp DNA ladder (Invitrogen). A coloração dos géis foi realizada com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) e a imagem foi capturada sob luz ultra-violeta e registrada em computador no programa acessório *Pain t*- Windows XP. Para purificação do produto de PCR foi utilizado método *in house* padronizado pelo laboratório (anexo 1).

A quantificação da PCR purificada foi revelada utilizando eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e comparada com *ladder "Low DNA Mass"* de peso molecular conhecido.

O produto da PCR purificado, depois de quantificado, foi utilizado para as reações de sequenciamento, na presença de bases marcadas com corantes fluorescentes (Kit *BigDye Sequence Terminator* v. 3.0 - *Applied Biosystems*). As duas cadeias complementares de DNA foram seqüenciadas utilizando os mesmos *primers* da reação inicial de amplificação.

Após a PCR de sequenciamento, as amostras foram precipitadas utilizando isopropanol e etanol e ressuspendidas em formamida conforme protocolo sugerido pelo fabricante.

O produto de sequenciamento foi analisado em seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer* (modelo 3100) *Applied Biosystems*.

Foram seqüenciadas uma fita sense e uma fita antisense para cada exon da *p53*, exceto para o exon 7 onde foi realizado apenas a fita antisense.

3.4- Análise das seqüências dos exons 5-9 de *p53*.

Todas as seqüências obtidas foram visualizadas e editadas com a utilização do programa *BioEdit 7.0.0* (Isis Pharmaceuticals, Inc.), através de inspeções visuais e análises simultâneas das seqüências e seus respectivos eletroferogramas. Esta etapa foi de especial importância para identificação de possíveis erros de leitura eletrônica e sua posterior correção.

Em seguida as seqüências foram comparadas às seqüências homólogas dos exons do gene *p53* (*locus* HSU94788) armazenadas no *GenBank* para a confirmação da homologia do fragmento amplificado. Para esta etapa utilizou-se a ferramenta *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov, acesso em 09/2007).

3.5 Identificação das mutações nos códons.

As seqüências que apresentavam valor diferente de 100% de homologia foram comparadas com os códons de referência (figura 9).

Figura 9. Quadro contendo a trinca selvagem para cada exon do gene *p53*.

Exon 5

CODON	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
NUC	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	CTG
AA	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	Leu
CODON	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
NUCL	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC
AA	Ala	Asp	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser
CODON	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
NUCL	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC
AA	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala
CODON	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173
NUCL	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG
AA	Isso	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val
CODON	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185
NUCL	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	AGC
AA	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser
CODON	186	187										
NUCL	GAT	GGT										
AA	Asp	Gly										

Exon 6

CODON	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199
NUC	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA
AA	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Iso	Arg	Val	Glu	Gly
CODON	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
NUCL	AAT	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT
AA	Asn	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asg	Asn	Thr
CODON	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223
NUCL	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT
AA	Phe	Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro
CODON	224											
NUCL	GAG											
AA	Glu											

Exon 7

CODON	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236
NUC	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC
AA	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Isso	His	Tyr	Asn	Tyr
CODON	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248
NUCL	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG
AA	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg
CODON	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260

NUCL	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC
AA	Arg	Pro	Isso	Leu	Thr	Isso	Isso	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser

Exon 8

CODON	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
NUC	AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG
AA	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val
CODON	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
NUCL	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	GAC	CGG	CGC	ACA
AA	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg	Thr
CODON	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296
NUCL	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC
AA	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His
CODON	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306		
NUCL	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA		
AA	His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg		

Exon 9

CODON	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318
NUC	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA
AA	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro
CODON	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
NUCL	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT
AA	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu
CODON	331											
NUCL	CAG											
AA	Gln											

3.6- Classificação das mutações.

Após confirmar o nucleotídeo mutado, foi realizada a classificação da mutação quanto ao tipo e inserida em tabela.

3.7- Identificação dos aminoácidos mutados.

Após classificação das mutações foi realizada a constatação do novo aminoácido formado a partir do nucleotídeo mutado. Para isso foi utilizado o quadro da figura 10.

Figura 10. Quadro contendo o código genético.

	T	C	A	G	
T	TTT - Phe	TCT - Ser	TAT - Tyr	TGT - Cys	T
	TTC - Phe	TCC - Ser	TAC - Tyr	TGC - Cys	C
	TTA - Leu	TCA - Ser	TAA - Stop	TGA - Stop	A
	TTG - Leu	TCG - Ser	TAG - Stop	TGG - Trp	G
C	CTT - Leu	CCT - Pro	CAT - His	CGT - Arg	T
	CTC - Leu	CCC - Pro	CAC - His	CGC - Arg	C
	CTA - Leu	CCA - Pro	CAA - Gln	CGA - Arg	A
	CTG - Leu	CCG - Pro	CAG - Gln	CGG - Arg	G
A	ATT - Ile	ACT - Thr	AAT - Asn	AGT - Ser	T
	ATC - Ile	ACC - Thr	AAC - Asn	AGC - Ser	C
	ATA - Ile	ACA - Thr	AAA - Lys	AGA - Arg	A
	ATG - Met	ACG - Thr	AAG - Lys	AGG - Arg	G
G	GTT - Val	GCT - Ala	GAT - Asp	GGT - Gly	T
	GTC - Val	GCC - Ala	GAC - Asp	GGC - Gly	C
	GTA - Val	GCA - Ala	GAA - Glu	GGA - Gly	A
	GTG - Val	GCG - Ala	GAG - Glu	GGG - Gly	G

3.8- Associação com dados clínicos.

Os resultados obtidos quanto a mutação foram comparados com os seguintes dados clínicos: idade, sexo, localização do tumor (corpo, antro), sistema TNM, estadiamento do tumor, classificação de Laurén e infecção por *Helicobacter pylori*.

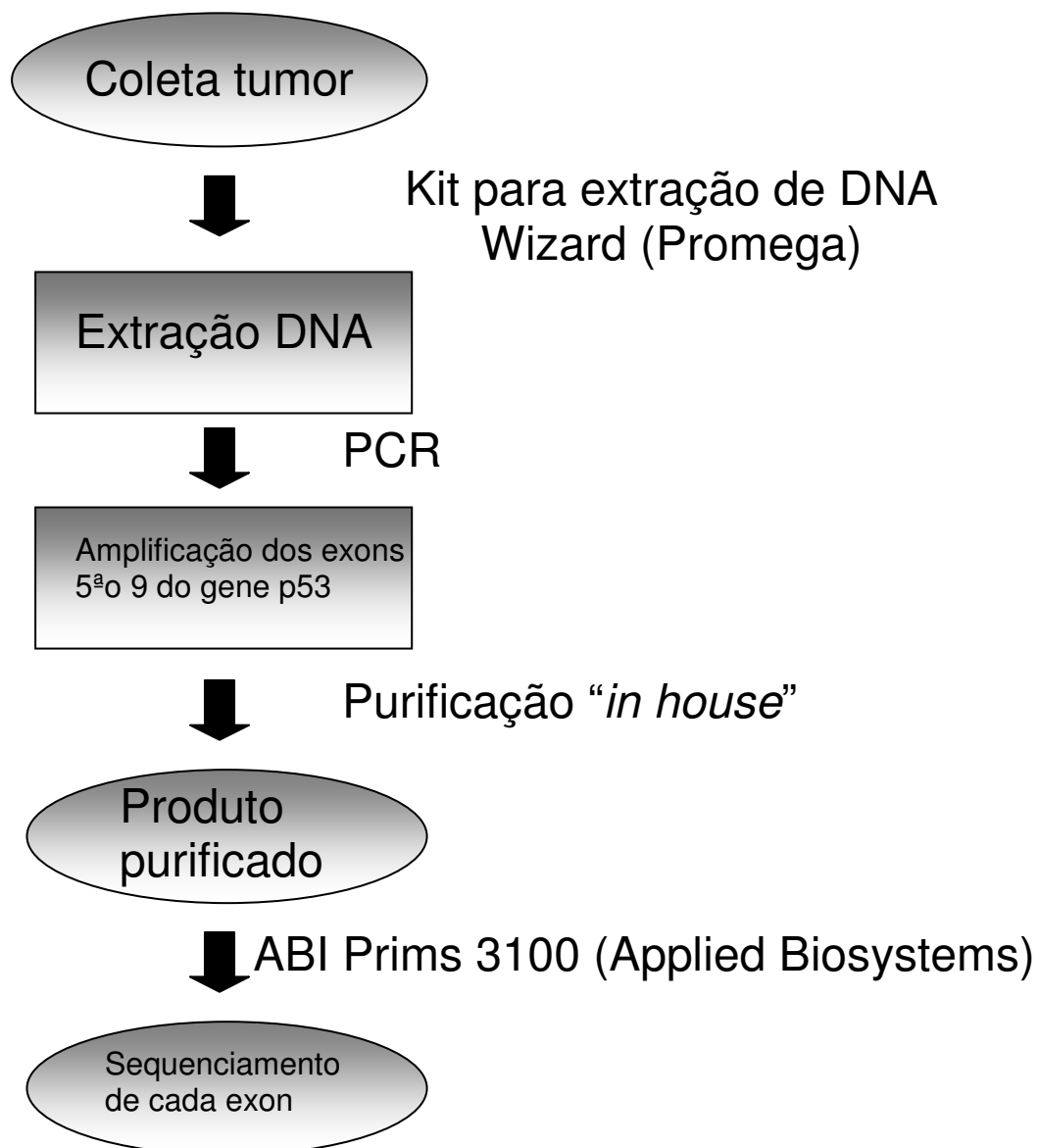
3.9- Tratamento estatístico dos dados.

Todos os dados serão confrontados através da análise de *Qui- quadrado de Associação e Fisher* utilizando o software *SigmaStat* – Jadel Scientific (Jadel Corporation), para saber se os mesmos apresentam entre si valores de um dado nível de significância ($P > 5$).

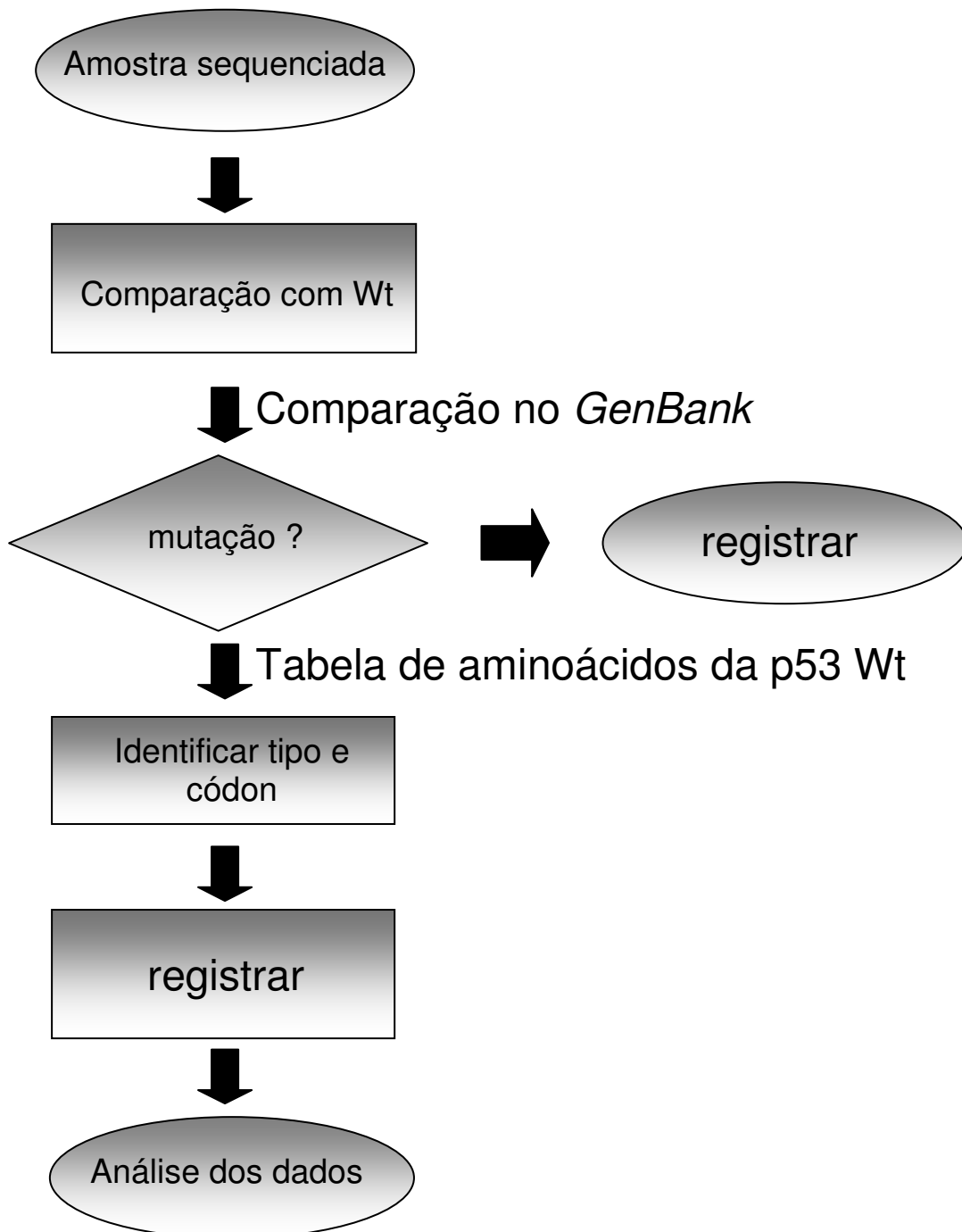
3.10 Questões éticas

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em reunião de 06 de agosto de 2007 (Protocolo n. 212/07). Anexos 2 e 3.

Fluxograma para procedimento com amostra:



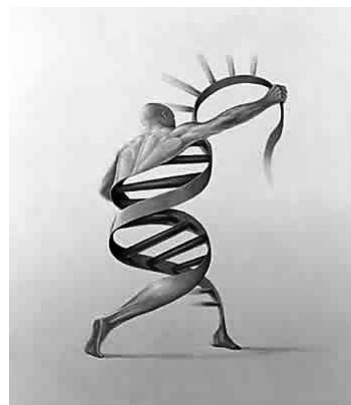
Fluxograma pós sequenciamento:



Fluxograma pós análise:



Resultados



4- Resultados

4.1- Amplificação dos produtos de PCR para os exons 5 ao 9 da *p53*.

Após a amplificação os produtos de PCR dos exons 5, 6, 7,8 e 9 foram resolvidos em gel de agarose e observadas as bandas específicas para cada par de oligonucleotídeo iniciador utilizado (Figura 11a).

4.2- Purificação do produto de PCR para os exons 5 ao 9 da *p53*.

Todos os produtos de PCR foram purificados por método “*in house*” e resolvidos em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio. A purificação do produto de PCR para o exon 5.pode ser visualizado na figura 9 b.

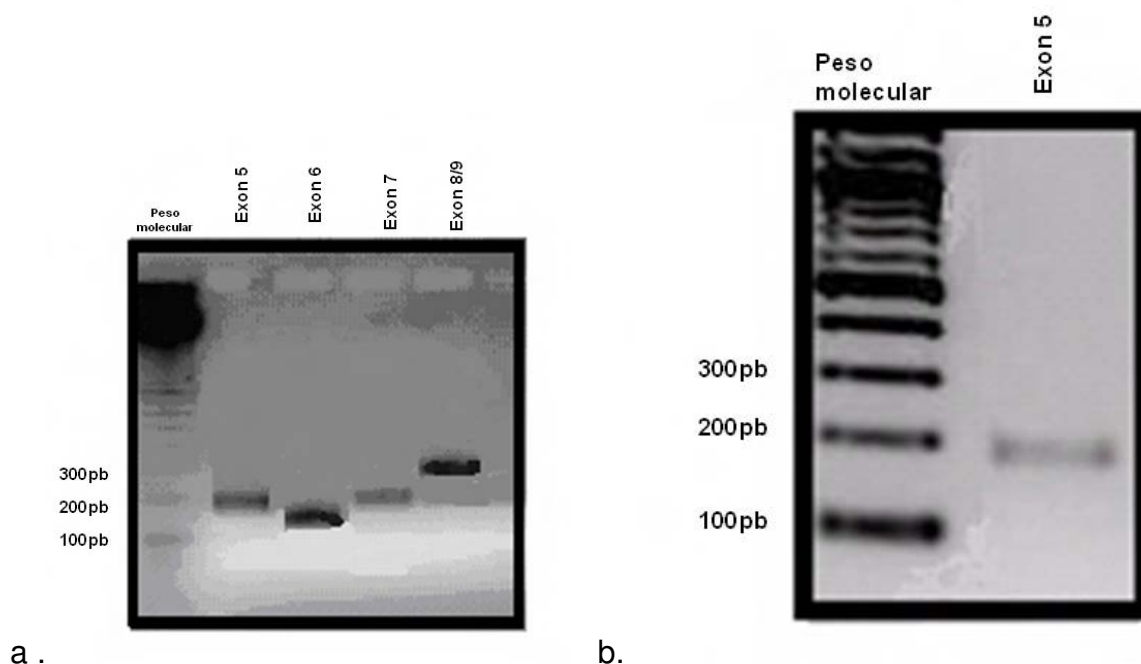
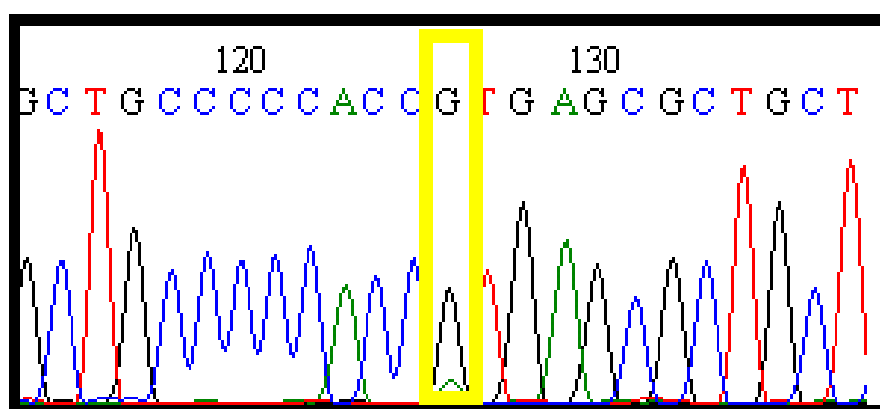


Figura 11 a) Produto de PCR de amostra de DNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores para os exons 5, 6, 7 e 8/9, respectivamente, revelados em gel de agarose 2% corado por brometo de etideo. A direita peso molecular de 100 pares de base(pb) (Invitrogen) Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram de 196pb, 165pb, 200pb e 290pb, respectivamente.b. Produto de PCR de amostra de DNA utilizando oligonucleotídios iniciadores para exon 5 (196pb) após purificação por método “*in house*” revelado em gel de agarose 2% corado por brometo de etideo e peso molecular de 100pb.

4.3- Análise das seqüências de bases do gene *p53*.

Após o sequenciamento automático das amostras amplificadas para cada exon revelou-se cromatogramas similares ao da figura 12a. Estes foram analisados e as alterações de bases foram demarcadas como exemplificado abaixo.

A análise no programa BLAST nos forneceu resultados semelhantes ao mostrado na figura 12b. Nesta figura pode-se comparar a seqüência da região do exon 5 do gene *p53* selvagem (seqüência superior) e a seqüência obtida para as amostras pesquisadas (seqüência inferior).



a.



b.

Figura 12 a. Cromatograma apresentando mutação no exon 5 da *p53* (retângulo em amarelo). Programa de bioinformática: *BioEdit 7.0.0* b. Mutação visualizada no programa *Blast*, (retângulo em amarelo).

4.4- Caracterização das amostras em relação aos dados clínicos dos pacientes.

Das 55 amostras coletadas, 38 (69%) eram do sexo masculino e 17 (31%) do sexo feminino (figura 13), sendo que a média de idade para homens foi de 60 anos, variando entre 37 a 82 anos, e para mulheres, 56 anos, variando entre 37 e 74 anos.

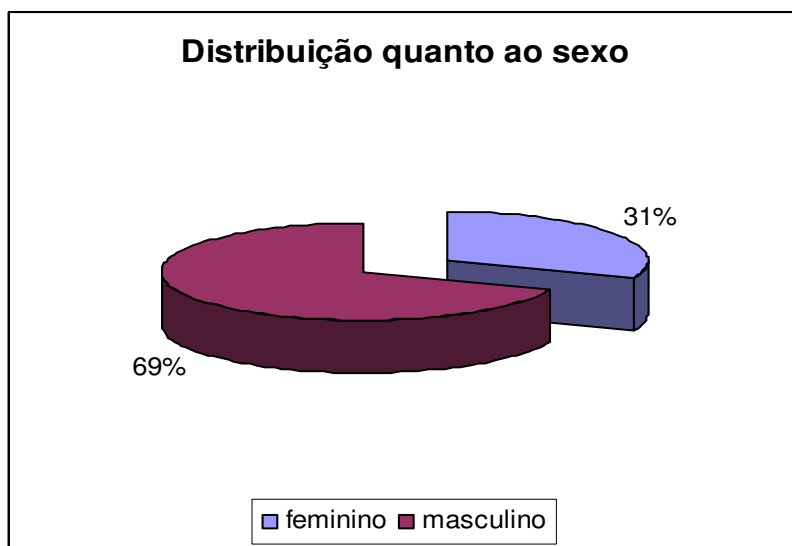


Figura 13. Distribuição quanto ao sexo.

Quanto à classificação de Laurén, 43 casos eram do tipo intestinal e 11, do tipo difuso. Um caso apresentou os dois tipos de tumor (difuso e intestinal) representados na figura 14.

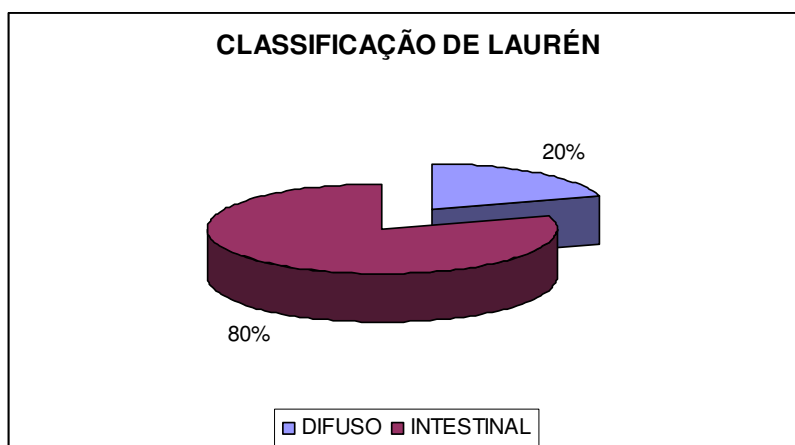


Figura 14. Classificação de Laurén: tipo difuso ou tipo intestinal.

Quanto a relação entre sexo e a classificação de Laurén, pode-se observar 26,3%(10/38) dos homens como tipo difuso e média de idade de 57,4 anos e 73,7% (28/38) como tipo intestinal, com idade média de 61,3 anos. Em mulheres, observou-se 6,2% (1/16) do tipo difuso com idade de 43 anos e 93,8% (15/16) do tipo intestinal com idade média de 60 anos. Uma mulher de 74 anos apresentou os dois tipos 6%(1/17). (Figura 15).

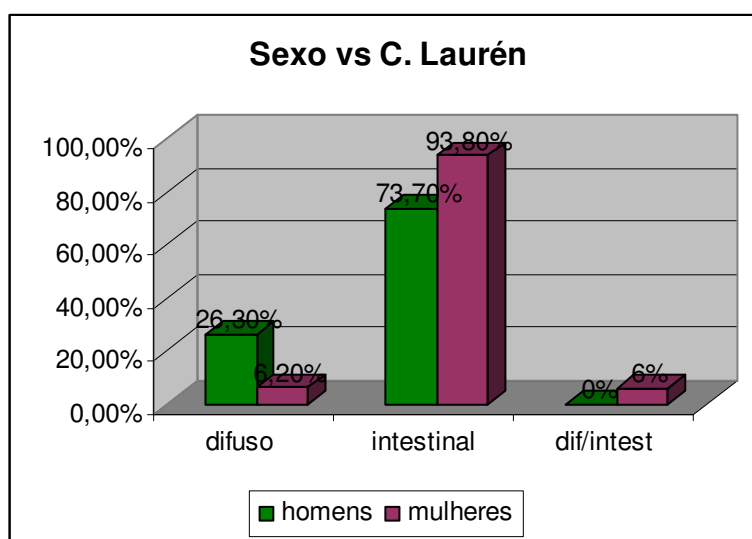


Figura 15. Representação das amostras quanto ao sexo: homens, em verde e mulheres em vermelho, quanto à classificação de Laurén.

Quanto à localização do tumor 3 estavam presentes no corpo, 33 no antro 1 tanto no corpo como no antro gástrico e 18 não estavam especificados no prontuário médico.

Quanto ao estadiamento do tumor gástrico, 7 casos apresentam-se em estágio inicial do câncer (I) e 48 casos em estágio avançado, sendo que 6, no estágio II, 30, no estágio III e 10 no estágio IV. Há um caso com estágio zero onde o tumor encontra-se *in situ* e outro caso onde o estágio encontra-se indeterminado Este último está em tratamento inicial multimodal (INCA), por isso recebe uma classificação diferente.

. A figura 16 apresenta a distribuição das amostras quanto ao estadiamento do tumor, destacando o estadio III com o maior número de indivíduos.

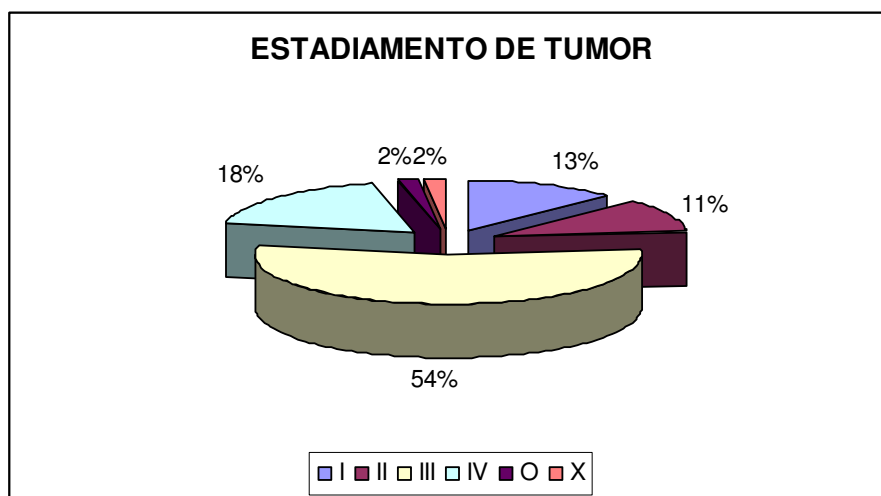


Figura 16. Distribuição das amostras quanto o estadiamento do tumor.

4.5 – Detecção de mutação em *p53* nas amostras de câncer gástrico.

Das 55 amostras estudadas, 32 apresentaram algum tipo de alteração no nucleotídeo, sendo esta considerada mutação. Os resultados obtidos quanto ao número de mutações estão presentes na figura 17.



Figura 17. Porcentagem de amostras de câncer gástrico que apresentam mutação.

Das 32 amostras alteradas 6, apresentaram mutação em mais de um exon, sendo que a distribuição está representada na tabela 2.

amostra	EXON 5	EXON 6	EXON 7	EXON 8/9
JO13			X	X
JO35		X		X
JO36	X	X		
JO43	X			X
JO44	X	X		
JO47	X		X	

Tabela 2. Distribuição dos exons que sofreram alteração dentro de cada amostra. X representa a presença de mutação no exon referido na tabela.

Das 32 amostras que apresentaram alteração de nucleotídeos, 14 estavam presentes no exon 5; 12 alterações no exon 6; 5 no exon 7, e 7 no exon 8/9. A distribuição está representada na figura 18. Nas figuras 19, 20, 21 e 22 estão representados os códons que sofreram alterações em suas trincas.

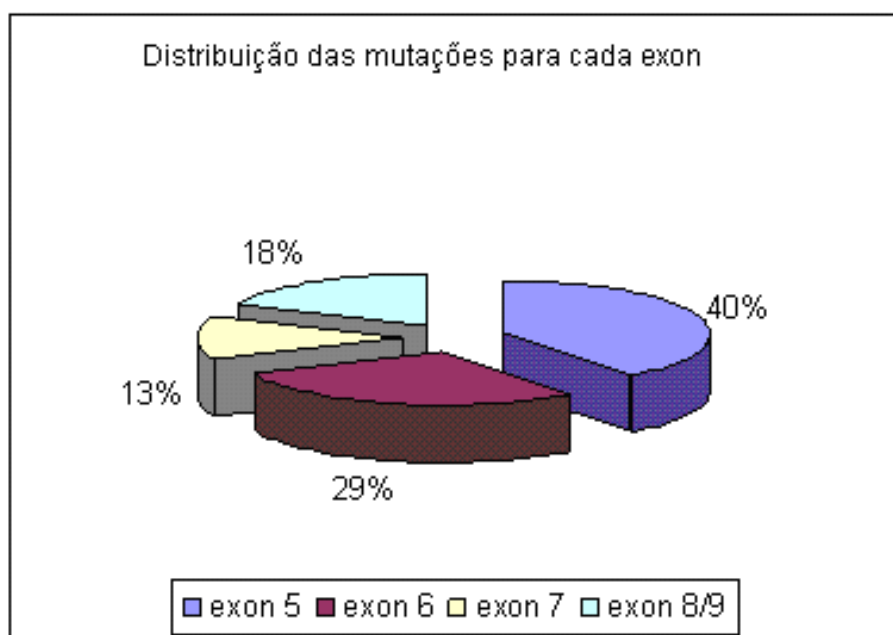


Figura 18. Distribuição das mutações para cada exon da **p53**.

Distribuição de alteração de nucleotídeo para cada códon:

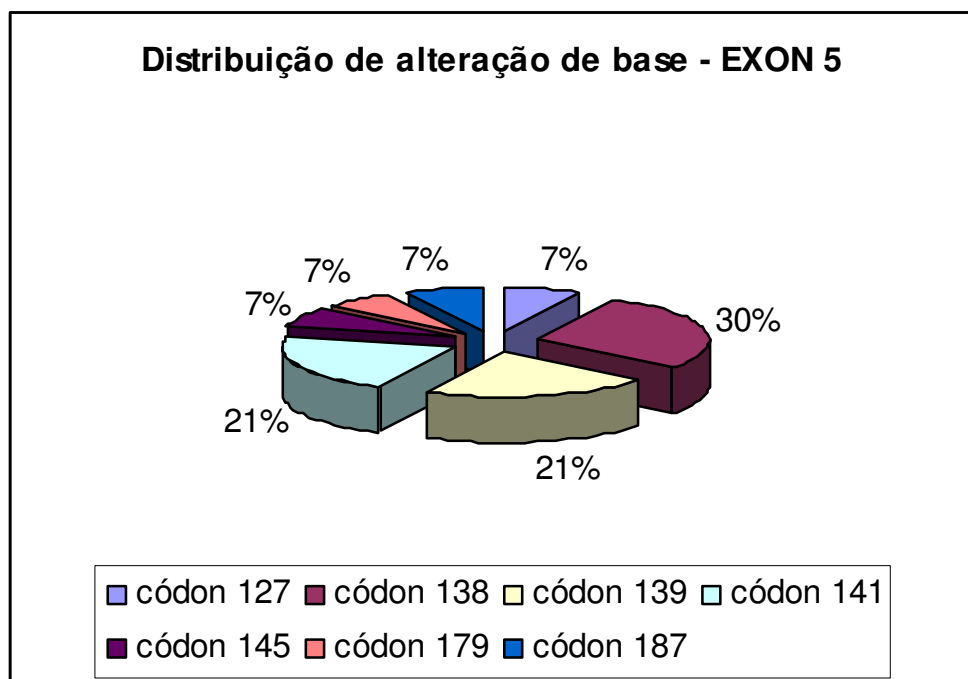


Figura 19. Alterações nos códons do exon 5.

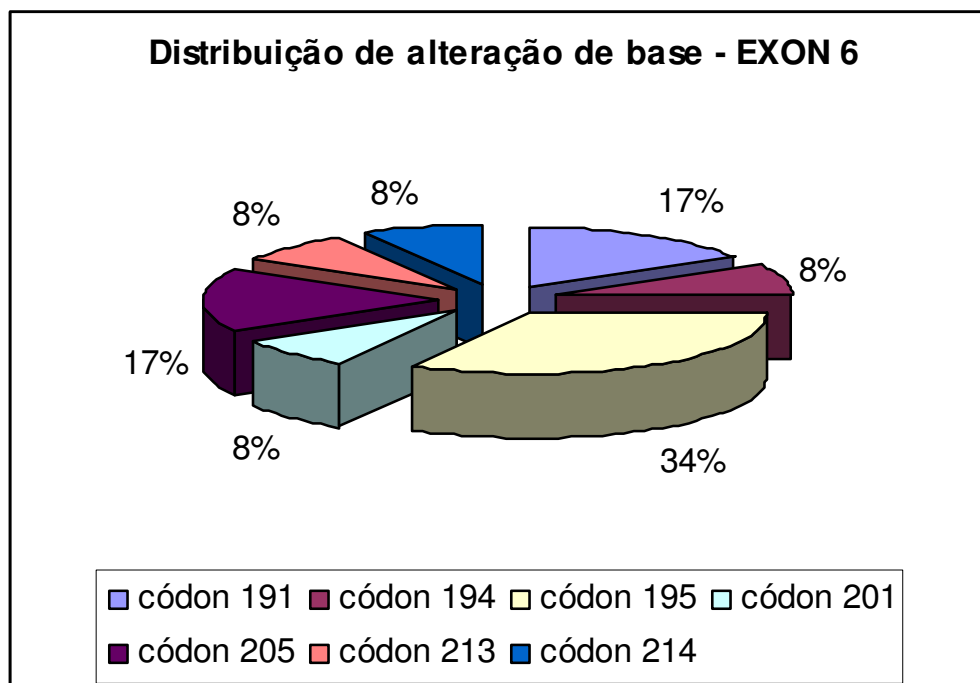


Figura 20. Alterações nos códons do exon 6.

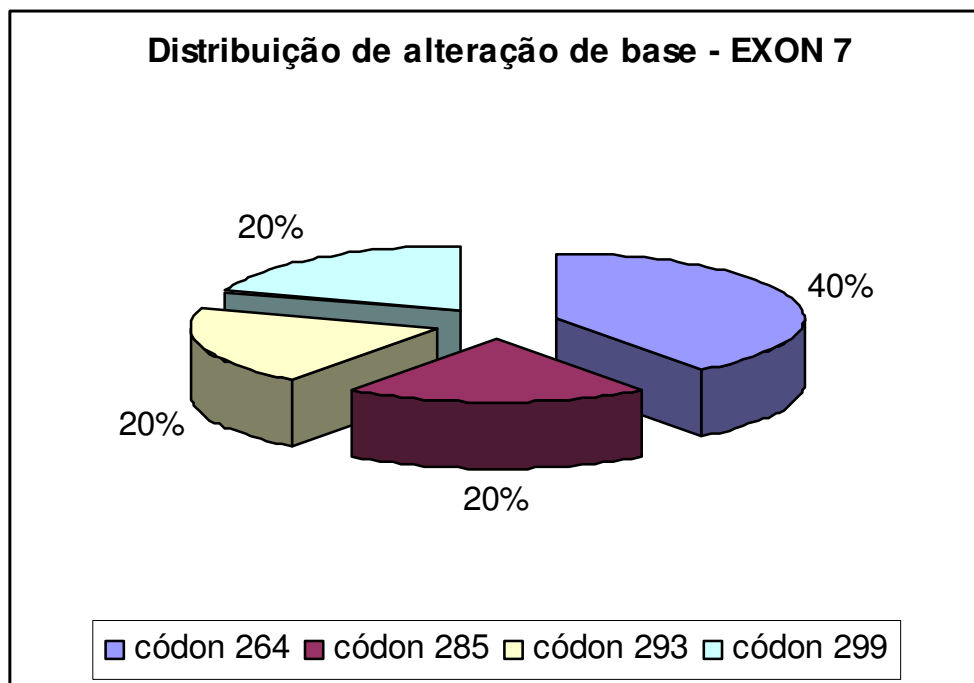


Figura 21. Alterações nos códons do exon 7.

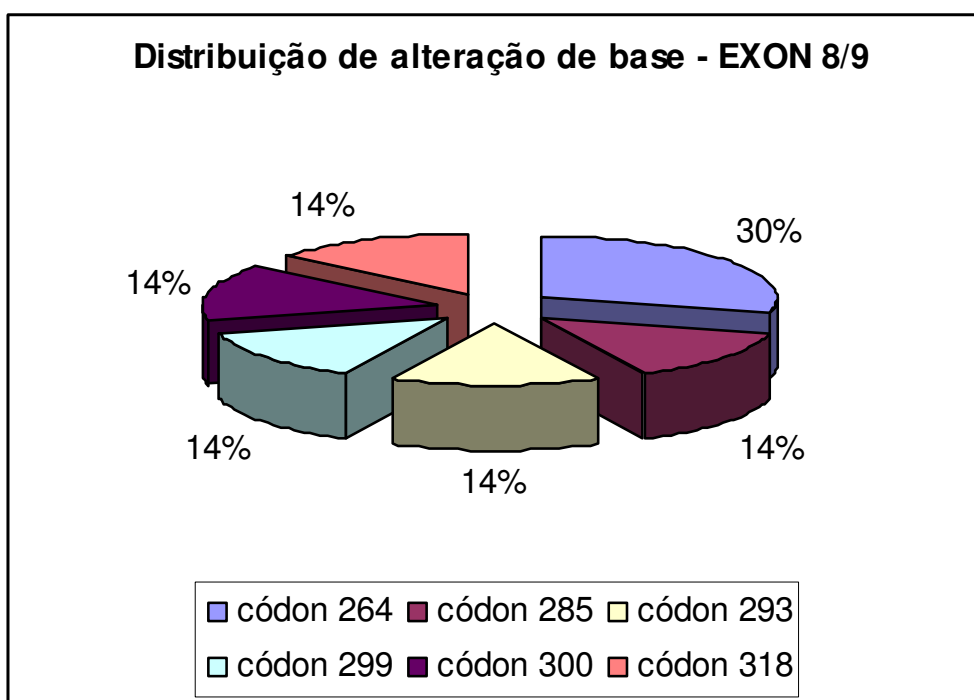


Figura 22. Alterações nos códons do exon 8/9.

Na tabela 3 encontram-se a amostra, a base mutada o aminoácido selvagem e o aminoácido formado com a mutação da base em relação à seqüência selvagem.

EXON 5		CODON	AA WT	AA MUT	TIPO
JO10	GCC - GAC	138	Ala	Asp	PONTO
JO15	CAT - CGT	179	His	Arg	PONTO
JO34	GGT - GAT	187	Gly	Asp	PONTO
JO36	GCC - GAC	138	Ala	Asp	PONTO
JO37	GCC - GAC	138	Ala	Asp	PONTO
JO38	AAG - AAC	139	Asp	Asn	PONTO
JO39	GCC - GAC	138	Ala	Asp	PONTO
JO42	AAG - AAC	139	Asp	Asn	PONTO
JO43	AAG - AAC	139	Asp	Asn	PONTO
JO44	TGC - TCC	141	Cys	Ser	PONTO
JO45	TGC - TCC	141	Cys	Ser	PONTO
JO46	CTG - CAT	145	Leu	His	PONTO
JO47	TCC - TCA	127	Ser	Ser	PONTO
JO53	TGC - TCC	141	Cys	Ser	PONTO
EXON 6		CODON	AA WT	AA MUT	TIPO
JO4	ATC - ATG	195	Iso	Met	PONTO
JO6	ATC - ATG	195	Iso	Met	PONTO
JO28	TAT - AAT	205	Tyr	Asn	PONTO
JO29	ATC - ATG	195	Iso	Met	PONTO
JO30	ATC - ATG	195	Iso	Met	PONTO
JO32	CTT - CT-A	194	Leu	Leu	DELEÇÃO
JO33	TTG - TAG	201	Leu	stop	PONTO
JO35	CCT - CCGT	191	Pro	Pro	INSERÇÃO
JO36	CCT - CCGT	191	Pro	Pro	INSERÇÃO
JO44	TAT - AAT	205	Tyr	Asn	PONTO
JO49	CGA - CGGA	213	Arg	Arg	INSERÇÃO
JO54	CAT - CAG	214	His	Gln	PONTO
EXON 7		CODON	AA WT	AA MUT	TIPO
JO7	AGT - AGC	240	Ser	Ser	PONTO
JO13	AAC - TCC	230	Thr	Ser	PONTO
JO24	TAC - CAC	234	Tyr	His	PONTO
JO55	GAC - GGC	228	Asp	Gly	PONTO
JO47	ACC - TCC	230	Thr	Ser	PONTO
EXON 8/9		CODON	AA WT	AA MUT	TIPO
JO11	CCA - CCG	318	Pro	Pro	PONTO
JO13	CTA - CTC	264	Leu	Leu	PONTO
JO22	GAG - GCG	285	Glu	Ala	PONTO
JO23	CTA - CTC	264	Leu	Leu	PONTO
JO35	GGG - TGG	293	Gly	Trp	PONTO
JO40	CCC - CCT	300	Pro	Pro	PONTO
JO43	CTG - CTT	299	Leu	Leu	PONTO

Tabela 3. Alteração de nucleotídeo e trinca de aminoácidos nos códons do gene **p53**. **AAWT** (aminoácido tipo selvagem) e **AA MUT** (aminoácido mutado).

A maior parte das mutações encontradas foram mutações de ponto. Outras mutações encontradas foram inserções, em 3 casos e um caso de deleção.

As amostras classificadas quanto ao tipo de mutação estão representadas nas tabelas 4 e 5.

P 53 N=55	% de mutação detectada	Inseção	Deleção	<i>Frameshift</i>
EXON 5	18% (14/55)	0	0	0
EXON 6	22%(12/55)	25%(3/12)	8,33%(1/12)	33,33%(4/12)
EXON 7	7,3%(4/55)	0	0	0
EXON8/9	13%(7/55)	0	0	0

Tabela 4. Tipo de mutação: *frameshift*, inserção ou deleção.

P 53 N=55	Ponto	<i>Missense</i>	<i>Nonsense</i>	Silenciosa
EXON 5	100%(14/14)	%(13/14)	0	10%(1/14)
EXON 6	66,66%(8/12)	58,33%(7/12)	8,33%(1/12)	0
EXON 7	100%(5/5)	80%(4/5)	0	20%(1/5)
EXON8/9	100%(7/7)	28,6%(2/7)	0	71,4%(5/7)

Tabela 5. Tipo de mutação de ponto: *missense*, *nonsense* ou silenciosa.

4.6- Distribuição quanto à presença ou não de cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*.

As cepas patogênicas *CagA* foram detectadas por PCR em trabalho anterior como mencionado no item casuística e métodos. A distribuição quanto à presença de cepas patogênicas de *H.pylori* está representada na figura 23. A distribuição quanto ao sexo está representado na figura 24, onde mostra maior frequência nos homens 79%(15/19) em relação as mulheres 21% (4/19).

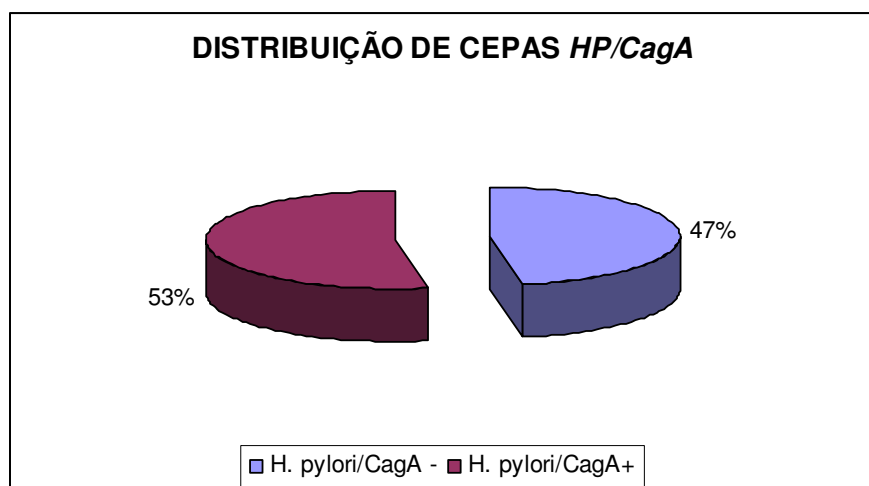


Figura 23. Representação da detecção de cepa patogênica da *Helicobacter pylori*.

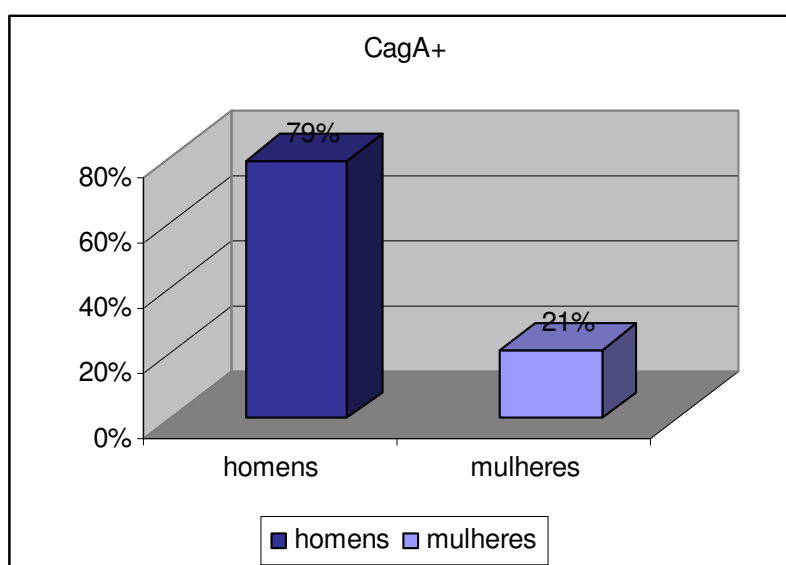


Figura 24. Representação de infecção por *H. pylori* nos pacientes do sexo masculino e feminino.

4.7- Presença de cepas patogênicas e estadiamento do tumor.

Quanto a correlação entre cepas *CagA* + pode-se observar que está presente nos estádios: I ao IV. Sendo que em estadio I, 71%(5/7), II, 17%(1/6), III 67%(20/30) e em estadio IV 30% (3/10). Com um número relevante no estadio III (100% de diferença quando comparado a *CagA*-). Este dado é estatisticamente significativo ($p > 5$). A cepa *CagA*- está presente em todos os estádios com distribuição menos acentuada quando comparada a *CagA*+ para as mesmas amostras: 29% (2/7) em estadio I, 83%(5/6) em II, 33%(10/30) em III e em estadio IV 70% (7/10). A relação

CagA- e estadiamento apresentou maior diferença nas amostras do estadio III, porém não apresentou diferença estatística. Essa distribuição pode ser observada na figura 25.

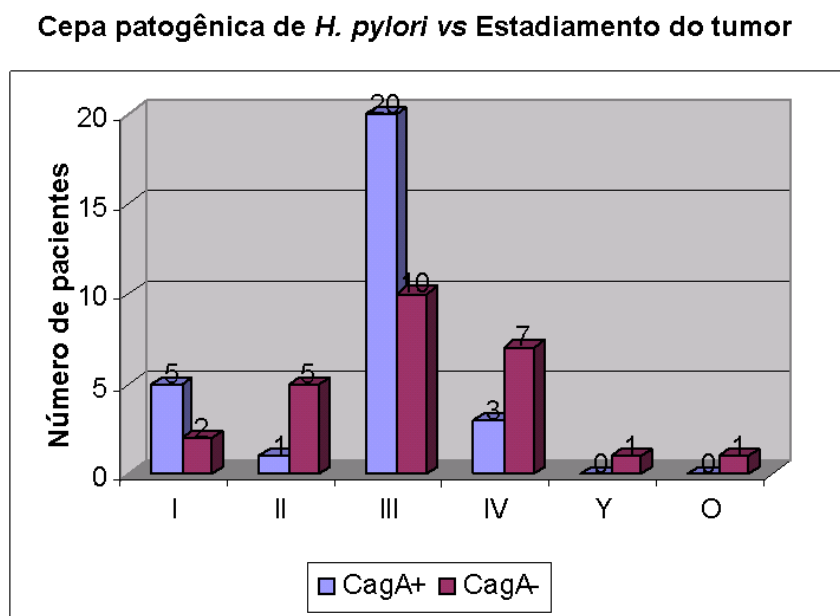


Figura 25. Representação da distribuição das cepas CagA+ e CagA- nos diferentes estádios do câncer gástrico.

4.8- Presença de mutação em *p53* e cepa patogênica de *H. pylori*.

Mais da metade das amostras de tumor 59%(19/32) apresentaram tanto mutação em um dos exons da *p53*, e a cepa CagA+ da *H. pylori*. Já os pacientes com mutação em *p53*, porém não apresentou a cepa patogênica, corresponderam a 41% (13/32) (Figura 26). No tratamento estatístico não houve diferença significativa, porém observa-se uma tendência a relação de CagA+ e mutação em *p53*.

Cepa patogênica de *H.pylori* vs mutação em *p53*

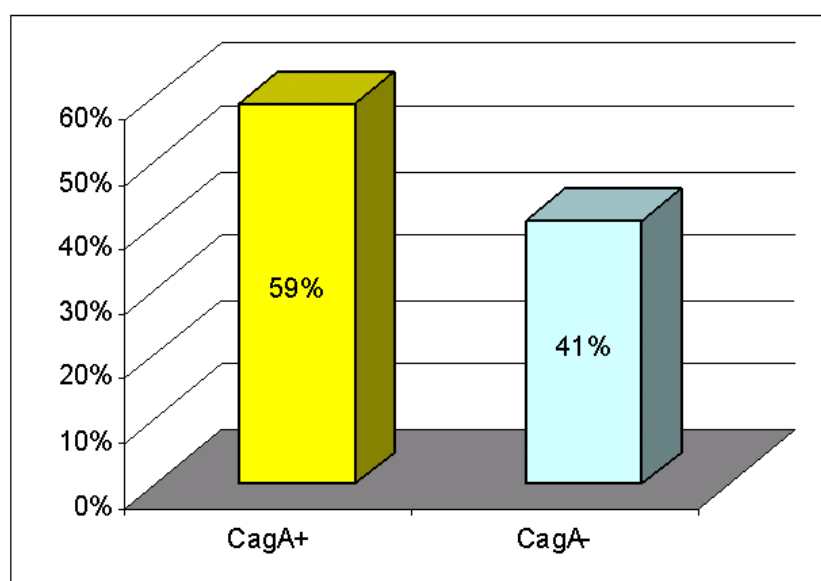


Figura 26. Representação gráfica das amostras que apresentaram mutação nos exons da *p53* e correlacionadas a presença ou não da cepa patogênica da *H. pylori*.

4.9- Presença de mutação em *p53* e classificação de Laurén.

Das 32 amostras de tumor que se apresentaram mutadas, 75% (24/32) eram do tipo intestinal de Laurén, 22% (7/32) eram do tipo difuso e 3,2% (1/32) apresentou os dois tipos na mesma amostra. Estes dados estão representados na figura 27.

Mutação em *p53* vs classificação de Laurén

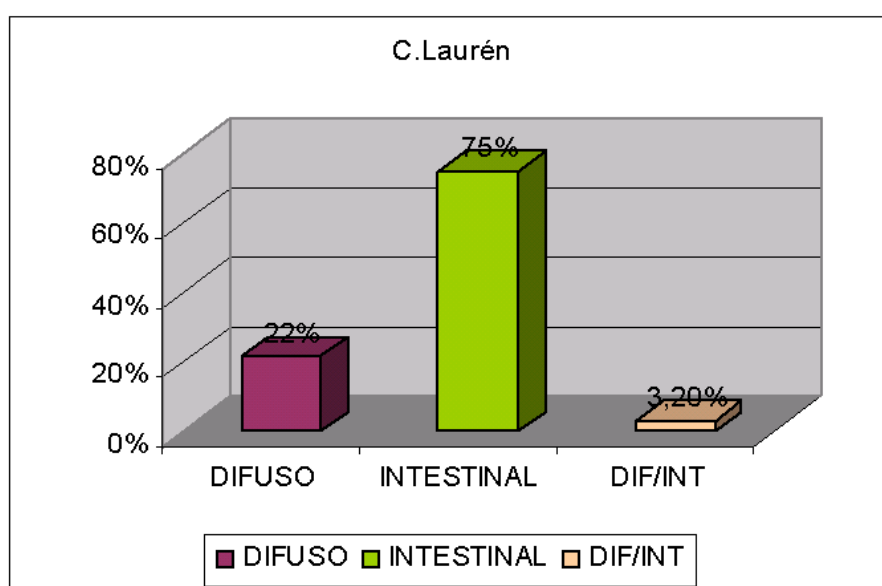


Figura 27. Representação da distribuição das amostras mutadas quanto a classificação de Laurén.

4.10- Classificação de Laurén e cepa patogênica de *H. pylori*.

Das 19 amostras que se apresentaram positivas para *CagA*, 26%(5/19) foram classificadas como tipo difuso, 69% (13/19), tipo intestinal e 5%(1/19) apresentaram-se tanto do tipo difuso quanto intestinal (Figura 28).

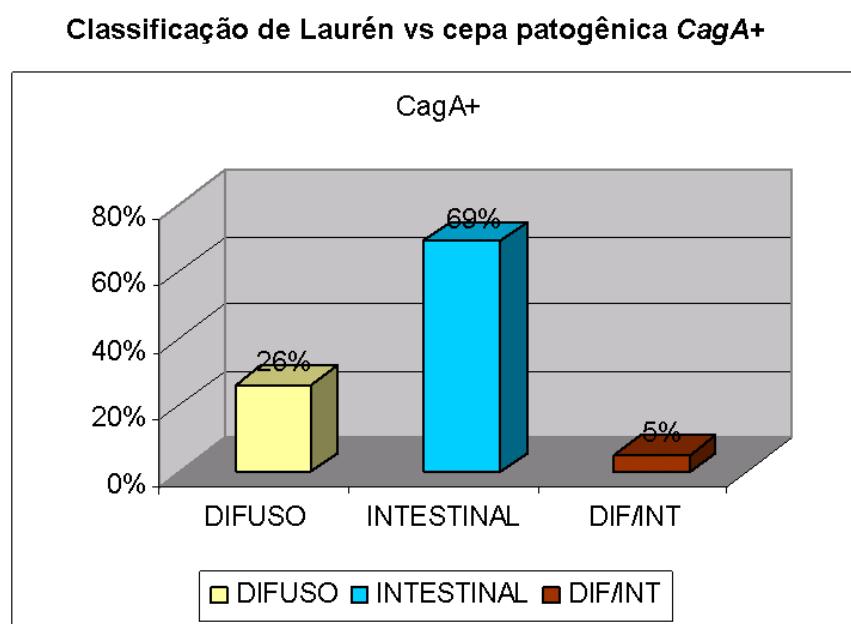


Figura 28. Representação da distribuição das amostras *CagA*+

4.11- Mutação em *p53* e estadiamento do tumor.

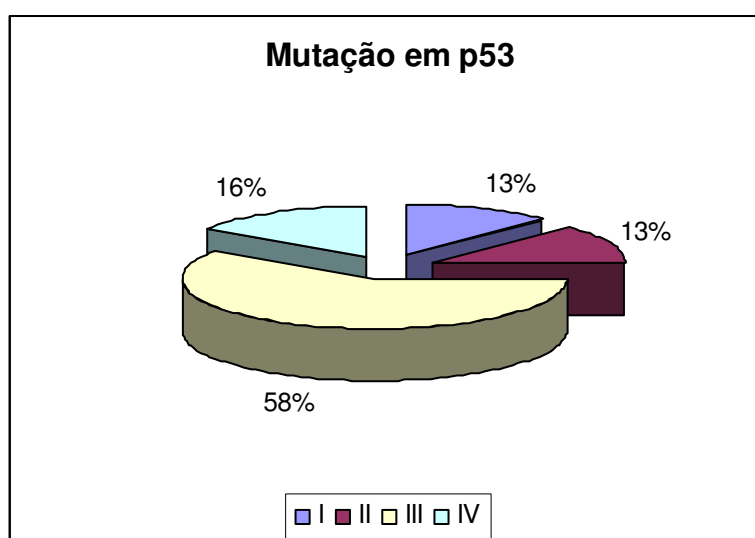
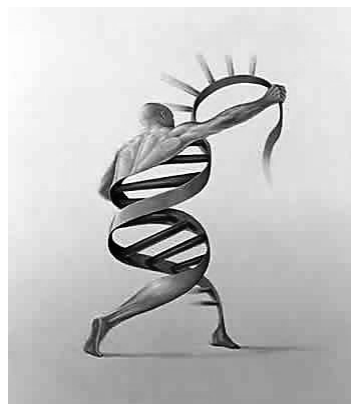


Figura 29. Presença de mutação em *p53* em relação ao estadiamento do tumor.

Discussão



5- Discussão

No presente estudo, 55 casos de pacientes com câncer gástrico fizeram parte dessa pesquisa. Foi realizada análise de mutação em *p53* por sequenciamento automático e associamos esses dados à bactéria *Helicobacter pylori*. O material foi coletado por meio de biópsia. Tal abordagem foi oportuna, porque permitiu detectar mutações no gene *p53* por sequenciamento automático e a presença de DNA do *H. pylori* por PCR e estimar a possível relação de cepas patogênicas dessa bactéria com parâmetros clinicopatológicos do câncer gástrico. O sequenciamento automático, apesar do custo, apresenta maior sensibilidade quando comparado a outros métodos de detecção de mutação gênica como: o SSCP (*Strand Conformational Polimorphism*), a imunohistoquímica (IHQ), a imunocitoquímica (ICQ) e *Western blot* (KLUMB *et al*, 2002).

Aproximadamente 73% dos homens apresentavam tumor do tipo intestinal, estes tinham idade média de 57,4 anos, concordando com os dados levantados por César e colaboradores em 2002 (figura 15). Este fato pode estar associado a fatores ambientais como: dieta pobre em antioxidantes, consumo elevado de sal e ingestão de álcool, segundo citado por ROCCO & NARDONE (2007). Nas mulheres o número de casos do tipo intestinal foi relevante em relação à do tipo difuso, porém a amostragem é muito pequena, 16 casos apenas. Quando comparado o tipo difuso, os dados dessa pesquisa discordam com os dados de Abib e colaboradores em seu estudo realizado no Rio de Janeiro. Em 1997, fizeram um levantamento de dados onde demonstraram que a maioria dos casos tipo difuso apresentavam a média de idade baixa. Isto pode ser explicado pelo número amostral insuficiente -16 amostras- comparado com o número amostral da pesquisa de Abib contendo 1087 indivíduos. (ABIB *et al*, 1997)

Em relação à localização do tumor, a maioria esteve presente no antro gástrico, e 1 no corpo gástrico, porém 18 casos não haviam sido especificados pelo profissional. Se compararmos a infecção de *H. pylori* com a localização este estudo concorda em 62% mesmo sem os dados considerados perdidos. Esta bactéria habita predominantemente a mucosa do estômago nas porções antrais e de corpo gástrico e pode estar relacionada ao câncer gástrico.(ITO *et al*, 2006).

A infecção por *H. pylori/CagA+* está mais associada ao câncer gástrico e a úlcera péptica quando comparado a *H. Pylori/CagA-* (BLASER *et al*, 1995;

PARSONNET *et al*, 1997). A infecção de *CagA* poder estar associada ao desenvolvimento da gastrite atrófica, acreditando-se que esta possa ser um fator de risco para o câncer gástrico do tipo intestinal. Blaser *et al* reportou uma associação com o tipo intestinal, mas Deguchi *et al* reportou que anticorpos *CagA* estão presentes com maior frequência nos cânceres do tipo difuso e no Japão *CagA+* também está associada ao câncer tipo difuso (DEGUCHI *et al*, 2001). Em nosso estudo, *CagA +* apresentou-se com maior frequência nos cânceres gástrico do tipo intestinal, porém este dado não é significativo estatisticamente pois o número amostral do tipo difuso é muito inferior (figura 28). Apesar da casuística pequena, esses resultados estão de acordo com os relatados pelos estudos de Queiroz, que também não observaram correlação do genótipo da bactéria com atributos demográficos e com parâmetros histopatológicos do câncer gástrico (QUEIROZ *et al*, 1998).

A PCR positiva para *CagA* é um marcador de cepas virulentas de *H. pylori*, porém a infecção na tumorigênese ainda é um mecanismo desconhecido. Em nosso estudo, 59% de mutação em *p53* foram encontradas em câncer gástrico *H. pylori/CagA+* (figura 26). Alguns estudos sugerem que a infecção por *H. pylori* não está associada à mutação de *p53* (HONGYO *et al*, 1995; SOLCIA *et al*, 1996; PALLI *et al*, 1997 e BLOK *et al*, 1999). No entanto, os grupos de pesquisadores de Blok, Palli e Hongyo detectaram a infecção por *H. pylori* apenas por exame histológico, mostrando uma frequência de infecção em pacientes com câncer gástrico menor que aquelas reportadas por outros tipos de detecção como a PCR, por exemplo. Em nosso estudo quando relacionado mutação em *p53* e infecção por *H. pylori* não obtivemos significância estatística.

SOLCIA *et al* e HONGYO *et al* encontraram mutações em *p53* por meio de sequenciamento de DNA. Eles encontraram que mutações mais frequentes foram encontradas no exon 5, concordando com a nossa pesquisa na qual 40% das amostras estão mutadas neste exon (figura 18).

WU *et al* reportou que o câncer do tipo intestinal tem uma maior razão de super expressão em *p53* do que no tipo difuso tanto no estadio inicial do câncer quanto nos estadios avançados. Já o tipo difuso a super expressão do *p53* é mais significativa no início da doença, lembrando que a super expressão da *p53* ocorre quando o DNA recebe injúria. A mutação no gene *p53* pode fazer com que a proteína não se expresse levando ao câncer. Em nosso estudo tendeu a ser maior no tipo

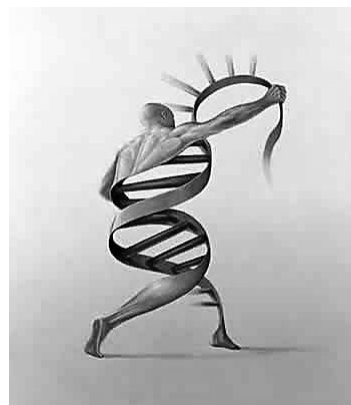
intestinal (figura 27). *CagA*+/*H. pylori* inibe a progressão do ciclo celular na fase G1-S (WU *et al*, 1997). Porém, mais estudos são necessários para clarificar esse mecanismo da infecção da bactéria na tumorigênese gástrica.

Mais de um evento mutante foi observado em uma mesma amostra (em dois exons diferentes), o que é um evento raro. 100% desses pacientes apresentaram mutações em dois dos cinco exons estudados (tabela 2) e estes eram do sexo masculino e encontravam-se em estadios avançados, sendo que 4 em estadio III e 2 em estadio IV. Além disso, todos eram do tipo intestinal. O fato de estarem em estadios avançados reforça a sugestão de que as alterações no gene *p53* são decisivas para o avanço da tumorigenese e pior prognóstico para o paciente.

A distribuição das mutações como sendo mutação de ponto, deleção ou inserção está descrita na tabela 3. A maior parte das mutações encontradas foram mutações de ponto, onde a troca de um único aminoácido acarreta na tradução de uma proteína defeituosa podendo apresentar perda da função e conseqüentemente, início do câncer. Outras mutações encontradas foram inserções, em 3 casos e um caso de deleção. As mutações do tipo inserção foram encontradas em pacientes de ambos os sexos, com estadiamento III e do tipo intestinal. Já a deleção foi detectada em um homem com estadiamento do tumor IV e tipo intestinal. Inserções e deleções na *p53* foram descritas em outro tipo de câncer. Angelopoulou e colaboradores, em 1998, descreveram sete casos de deleção nos exons 5 e 7 e um caso de inserção no exon 5 em câncer de mama dos 56 casos estudados (ANGELOPOULOU *et al*, 1998). Em câncer colorretal há relatos de 7 mutações o tipo *frameshift*, sendo 3 inserções nos exons 4, 7 e 9 e deleções presentes nos códons 1,2,4,7 e 8 num total de 56 amostras. Além destas mutações foram encontradas mais 31 mutações de ponto (LIU & BODMER, 2006).

Se comparado o estadiamento do tumor à mutação não houve diferença estatisticamente significativa apesar da tendência no estadio III ser maior em relação aos outros estadios do tumor (figura 29). Foi encontrada diferença quanto à distribuição dos genótipos *CagA* do *H. pylori* em relação ao sexo (figura 24). Pode-se destacar a alta prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes com câncer gástrico atendidos na região de Botucatu e Jaú, no estado de São Paulo, e confirmam a relevância do genótipo *cagA* na patogênese do câncer gástrico.

Conclusões

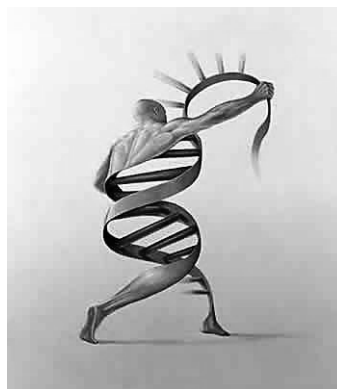


6- Conclusões

Da análise dos dados dos 55 pacientes estudados podemos concluir que:

- 58% dos pacientes com câncer gástrico apresentaram mutação no gene *p53*;
- 53% dos pacientes com câncer gástrico apresentaram cepas patogênicas *cagA+*;
- a maior parte dos casos eram homens com adenocarcinoma tipo intestinal;
- a maior parte dos tumores tem localização antral;
- 87% dos casos estavam em estadios avançados do tumor;
- todos os casos que apresentaram mais de uma mutação, encontravam-se classificados em estadios avançados;
- o tipo de mutação *frameshift* foi encontrado somente no exon 6 da *p53*;
- a maior parte das mutações foi encontrada no exon 5 da *p53*;
- o sequenciamento automático é um método sensível para detectar mutações em *p53*;
- *CagA+/ H. pylori* pode ter importância no desenvolvimento do câncer gástrico nos pacientes que apresentaram mutação em *p53*;
- em pacientes com estadios avançados há chances de *p53* apresentar-se mutada em mais de um exon.

Considerações finais

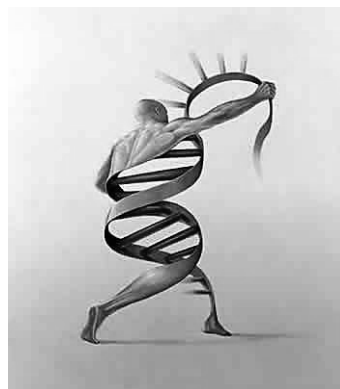


7- Considerações Finais

Em teoria, o progresso da genética molecular dos tumores deve abrir novas possibilidades em ambos os domínios, já que permitirá: 1) Uma classificação mais precisa dos tumores, com as conseqüentes vantagens ao nível do prognóstico e da escolha das abordagens terapêuticas; 2) A identificação de alvos terapêuticos, contribuindo assim para o desenvolvimento e aplicação de novos fármacos mais específicos e eficazes; 3) A identificação de grupos de indivíduos com risco acrescido de desenvolvimento da doença; 4) A detecção precoce – potencialmente por métodos não invasivos – dos tumores; 5) O estabelecimento de métodos mais sensíveis de acompanhamento de doentes para avaliação da evolução da doença, incluindo detecção “precoce” de recidivas; 6) Melhorar a sensibilidade na avaliação de amostras clínicas, como margens cirúrgicas ou biópsias por meio de endoscopia digestiva alta, com as conseqüentes melhorias no estadiamento e tratamento da doença.

A *p53* mutada pode ser usada em diagnóstico indicando, assim um melhor tratamento, desde que há casos em que sua alteração impõe resistência a certos tipos de tratamento. Desta forma poder-se-ia pensar em esquemas de tratamentos individualizados e menos agressivos para cada indivíduo. Bem como a prevenção por meio de aconselhamento genético.

Referências bibliográficas



8- Referências bibliográficas

ABIB, A. R.; OLIVEIRA, I. M. & KOIFMAN, S., Histopatologia do câncer de estômago (classificação de Lauren) em amostra de pacientes hospitalares no Rio de Janeiro, 1980-1995 *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 13(Supl. 1):99-104, 1997.

AGOSTINHO JÚNIOR, Soroprevalência e fatores de risco para infecção pelo *Helicobacter pylori* *Jornal de pediatria* Vol 79 n. 1, 2003.

AICR - American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: *Banta Book Group*, 1997.

AICR - American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: *Banta Book Group*, 1994.

AJCC Cancer Staging Manual, *Springer-Verlag* Sixth Edition New York, 2002.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J D, *Biologia Molecular da Célula* 3a ed. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1997, 1292p.

AMBION figura 14-3-3δ sinalizando a p53 www.ambion.com, 2006. Acesso em 12/11/07.

AMOROSI, A.; BIANCHI, S.; BUIATTI, E.; CIPRIANI, F.; PALLI, D. & ZAMPI, G., Gastric cancer in a high-risk area in Italy. *Cancer*, 62:2.191-2.196, 1988.

ANSCHAU F, SCHMITT VM, GONÇALVES MAG, GARICOCHEA B Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais *Rev Bras Ginecol Obstet.*; 27(10): 607-12, 2005.

ANGELOPOULOU K, LEVESQUE MA, KATSAROS D, SHIPMAN R,. DIAMANDIS EP Exon 5 of the p53 gene is a target for deletions in ovarian câncer *Clinical Chemistry* 44:1 72–77, 1998.

ANTONIOLI, D. A., Precursors of gastric carcinoma: a critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. *Human Pathology*, 25:994-1.005, 1994.

BECKER KF, ATKINSON MJ, REICH U et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*;54:3845-3852, 1994.

BEGNAMI MDFS, CAMPOS AHJFM, SILVA E, MONTAGNINI A Imunohistochemical expression of c-erb-B2 and p53 in gastric câncer *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol.41 no.4 Rio de Janeiro, 2005.

BLASER MJ, PEREZ-PEREZ GI, KLEANTHOUS H, COVER TL, PEEK RM, CHYOU PH, *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*; 55:2111–15, 1995.

BLASER, M.J. & BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest.*, 107(7): 767-73, 2001.

BLOK P, CRAANEN ME, OFFERHAUS GJ, DEKKER W, KUIPERS EJ, MEUWISSEN SG, et al. Molecular alterations in early gastric carcinomas. *Amer J clin Pathol* 111:241– 47, 1999.

BONNEY GE, ELSTON RC, CORREA P et al. Genetic etiology of gastric carcinoma. I. Chronic atrophic gastritis. *Genet Epidemiol*;3:213-224, 1986.

BRASILEIRO-FILHO G, GUIMARÃES RC, BOGLIOLO L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro-Filho G, editor. *Patologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.148-92.

BUIATTI E, PALLI D, DECARLI A, AMADORI D, AVELLINI C, BIANCHI S, BONAGURI C, CIPRIANI F, COCCO P, GIACOSA A. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. *Int J Cancer*, ; 45: 896-901, 1990.

CAD. SAÚDE PÚBLICA, Rio de Janeiro, 22(8):1611-1618 Sobrevida em pacientes com câncer gástrico em Campinas, São Paulo, Brasil Survival in gastric cancer patients in Campinas, São Paulo, Brazil. , 2006.

CALLE EE, RODRIGUEZ C, WALKER-THURMOND K, THUN MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* ; 348: 1625-1638, 2003.

CÉSAR ACG, SILVA AE, TAJARA EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica, *Arq Gastroenterol* V. 39 No.4 out./dez. 2002.

CHAN AO, LAM SK, CHU KM, LAM CM, KWOK E, LEUNG SY, YUEN ST, LAW SY, HUI WM, LAI KC, WONG CY, HU HC, LAI CL, WONG J. Soluble E-cadherine is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* ;48:808-11, 2001.

CHAO A, THUN MJ, HENLEY SJ, JACOBS EJ, MCCULLOUGH ML, CALLE EE. Cigarette smoking, use of other tobacco products and stomach cancer mortality in US adults: The Cancer Prevention Study II. *Int J Cancer*, 101: 380-389, 2002.

CHO KR, VOGELSTEIN B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* , 70:1727-31,1992.

CHO Y, GORINA S, JEFFREY,PD 7 PAVLETICH NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355, 1994.

CORREA, P., 1988. A human model of gastric carcinogenesis. *Perspectives in Cancer Research*, 48: 3.554-3.558.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Pathologic basis of disease 6 ed. *Philadelphia: W.B. Saunders*; 1999.

COUTTS AMANDA S., LA THANGUE NICHOLAS B. The p53 response: Emerging levels of co-factor complex *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 778–785, 2005.

COVACCI, A. *et al.* *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284: 1328-33, 1999.

CUTAIT R, GARICOCHEA. B, COTTI, G C C Diagnosis and management of familial gastric cancer *Rev. Col. Bras. Cir.* Vol. 28, No 3, 2001.

CURRENT EUROPEAN concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter Pylori* Study Group. *Gut*; 41: 8-134, 1997.

DE VITA VT JR, HELLMAN S, ROSENBERG SA. Cancer – Principles and practice of oncology. 5. ed. Philadelphia: *Lippincott-Raven*; v1, 1997.

DEBELLIS, L. *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin *vacA* increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 281(6): G1440-8, 2001.

DEGUCHI, A. TAKAGI, H. KAWATA, H. INOKO and T. MIWA Association between CagA1 *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-B-RII gene mutations in gastric cancer patients *Int. J. Cancer*. 91, 481–485, 2001.

ENDO H, SAKATA K, TAMURA G, OHMURA K, AJIOKA Y, WATANABE H, MOTOYAMA T. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol*;191:257-63, 2000.

ESLICK, G. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oralanal intercourse. *Int. J. Std. Aids*, 13 (1): 7-11, 2001.

FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*;57:1083-93, 1989.

GENESETBANK, 2000, figura ATM/ATR, acesso em 16/07/2007.

GOH, HS, YAO, J & SMITH, DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 55:5217-5221, 1995.

GOODMAN KJ, COCKBURN M. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology* 2001; 12: 266-271.

GOTO T, HARUMA K, KITADAI Y, ITO M, YOSHIHARA M, SUMII K, GUILFORD P, HOPKINS J, HARRAWAY J *et al*. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*;392:402-405, 1998.

GUILFORD PJ, HOPKINS JB, GRADY WM *et al*. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 14:249-255, 1999.

HARRIS SL AND LEVINE AJ, The p53 pathway: positive and negative feedback loops *Oncogene* 24, 2899–2908, 2005.

HARTWELL LH, WEINERT TA, Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634, 1989.

HIBI K, NAKAYAMA H, YAMAZAKI T, TAKASE T, Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients - *International Journal of Cancer*, 2001.

HOLBURT, E. & FREEDMAN, S.I.,. Gastric carcinoma in patients younger than age 36 years. *Cancer*, 60:1.395-1.399, 1987.

HONGYO T, BUZARD GS, PALLI D, WEGHORST CM, AMOROSI A, GALLI M, et al. Mutations of K-ras and *p53* genes in gastric adenocarcinomas from a high incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* ;55:2665–72, 1995.

HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, AND HARRIS CC *p53* mutations in human cancers *Science*, Vol 253, Issue 5015, 49-53, 1991.

HOWSON, C. P.; HIYAMA, T. & WYNDER, E. L., The decline of gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiologic Reviews*, 8:1- 27, 1986.

HSING AW, HANSSON LE, MCLAUGHLIN JK, NYREN O, BLOT WJ, EKBOM A, FRAUMENI JF JR. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer*, 71: 745-750, 1993.

HUANG C, TAKI T, ADACHI M, KONISHI T, HIGASHIYAMA M, MIYAKE M Mutations in exon 7 and 8 of *p53* as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 14;16(19):2469-77, 1998.

HWANG, H.; DWYER, J. & RUSSELL, R. M., Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk: are there new roles for preventative factors? *Nutrition Reviews*, 52:75-83, 1994

ILVER, D. *et al.*, *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279: 373-9, 1998.

INCA.www.inca.gov.br acesso: dez/2006.

INIESTA P, VEGA FJ, CALDES T, MASSA M, DE JUAN C, CERDAN FJ, SANCHEZ A, LOPEZ JA, TORRES AJ, BALIBREA JL, BENITO M. *p53* exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett*. 14;130(1-2):153-60,1998.

ITO *et al*, A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy—the impact of antimicrobial resistance on eradication rates *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* Volume 13 Issue 8 Page 1047-1055, 2006.

JEFFREY PD, GORINA S, PAVLETICH NP Crystal structure of the tetramerization domain of p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, 267, 1498-1502, 1995.

JENKS, P.J. & KUSTERS, J.G. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 16(suppl. 1): S11-8, 2000.

JI BT, CHOW WH, YANG G, MCLAUGHLIN JK, GAO RN, ZHENG W, SHU XO, JIN F, FRAUMENI JF JR, GAO YT. The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in Shanghai, China. *Cancer*, 77: 2449-2457, 1996.

KELLER G, VOGELSANG H, BECKER I *et al*. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol*;155:337-342, 1999.

KLUMB C.E. *et al* Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides *Rev.bras.hematol.hemoter*, , 24(2): 111-125, 2002.

KO LJ & PRIVES C. P53: puzzle and paradigm, *Genes & Development* 10: 1054-1072, 1996.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ , BIELANSKI W , KANIA A, ŻUCHOWICZ M, HARTWICH A, REHFELD J AND HAHN E Influence of COX-2 Inhibition by Rofecoxib on Serum and Tumor Progastrin and Gastrin Levels and Expression of PPAR γ and Apoptosis-Related Proteins in Gastric Cancer Patients *Digestive Diseases and Sciences* Volume 48, Number 10 / October, 2003.

LAURÉN, P "The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification" *APMIS* 64: 31-49, 1965.

LEE S, ELENBAAS, B LEVINE, AJ & GRIFFITH J. p53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81, 1013-1020, 1995.

LEVINE AJ, p53, the cellular gatekeeper for growth and division., *Cell*. 7;88(3):323-31, 1997.

LI FP, FRAUMENI JF, MULVIHILL JJ, et al. A câncer family syndrome in 24 kindreds. *Cancer Res*, 48: 5358-5362 , 1988.

LIN J, WU X, CHEN J, CHAN A & LEVINE AJ Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor supressoion. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LIX, 215-223, 1995.

LIU Y & BODMER WF, Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cance rcell lines *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103 no. 4 977, 2006.

LU H e LEVINE AJ,. Human TAF-31 is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5154-5158, 1995.

MAETA M, SAITO H, OKA S, TSUJITANI S, IKEGUCHI N, KAIBARA N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*;19:489-95, 2000.

MALCOLM G SMITH, GEORGINA L HOLD, EIICHI TAHARA, EMAD M EL-OMAR ,Cellular and molecular aspects of gastric cancer, *R World J Gastroenterol* May 21;12(19):2979-2990, 2006.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori in the year 2000. Helicobacter pylori* Foundation, p. 1-9, 2000. Disponível em <http://www.helicobacter.com/hpy2k/frMain.htm>. Acesso em 8/8/2001

MARSHALL & WARREN, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. Jun 16;1(8390):1311-51, 1984.

MIRVISH SS. Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidines: possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J Natl Cancer Inst*; 46: 1183-1193, 1971.

MUÑOZ, N.; CORREA, P.; CUELLO, C. & DUQUE, E., Histologic types of gastric carcinoma in high and low risk areas. *International Journal of Cancer*, 3:809 818, 1968.

NAKATA, B., HIRAKAWA-YS CHUNG¹, OGAWA M, OGAWA Y, p53 Protein Overexpression as a Predictor of the Response to Chemotherapy in Gastric Câncer *Cancer* Volume 28, Number 6 / May, 1998.

NIH CONSENSUS CONFERENCE. *Helicobacter pylori* in peptic ulcerdisease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacterpylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA* 1994; **272**: 65-693, 1994.

NURSE P, A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100: 71-78, 2000.

OCHIAI A, YAMAUCHI Y, HIROHASHI S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer*; 69: 28-33, 1996.

PALLI D, CAPORASO NE, SHIAO YH, SAIEVA C, AMOROSI A, MASALA G, et al. Diet *Helicobacter pylori*, and p53 mutations in gastric cancer: a molecular epidemiology study in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;6:1065 – 69, 1997.

PARK WS, OH RR, PARK JY, SHIN MS, LEE HK, LEE SH, YOO NJ, LEE JY. Absence of mutations in the kinase domain of the Met gene and frequent expression of Met and HGF/SF protein in primary gastric carcinomas. *APMIS*;108:195-200, 2000.

PARKIN DM, PISANI P, FERLAY J. Estimates of the world-wide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*; 80:827-41, 1999.

PARSONNET J, FRIEDMAN GD, ORENTREICH N, VOGELMAN H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*;40:297-301, 1997..

PEEK, R.M. *et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.*, 59: 6124-31, 1999.

PEREZ-PEREZ GI, BOSQUES-PADILLA FJ, CROSATTI ML, TIJERINA-MENCHACA R, GARZA-GONZALEZ E. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scand Gastroenterol*; 40: 56-60, 2005.

PICKART CM, Mechanisms underlying Ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-534, 2001.

PISANI P, PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*; 83:870-3, 1999.

POLLARD T, EARNSHAW W C, *Biologia Celular* 1a. ed. *Editora Elsevier*, Rio de Janeiro, 2006, 799p.

PRIVES C, Signaling to p53: Breaking the MDM2-P53 circuit. *Cell* 95: 5-8, 1998.

QUEIROZ, D.M.M. *et al.* CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer*, v. 78, p.135-39, 1998.

REED PI, SMITH PL, HAINES K, HOUSE FR, WALTERS CL. Gastric juice N nitrosamines in health and gastroduodenal disease. *Lancet*; 2: 550-552 23, 1981

ROCCO A, NARDONE G Diet, H pylori infection and gastric cancer: Evidence and controversies *World J Gastroenterol* June 7, 2007 Volume 13 Number 21, 2007.

ROUKOS D. H. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer treat*; 26: 243-55,2000.

SANO T, TSUJINO T, YOSHIDA K, NAKAYAMA H, HARUMA K, ITO H, NAKAMURA Y, KAJIYAMA G, TAHARA E. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res*; 51: 2926-2931, 1991.

SARNOW P, HO YS, WILLIAMS JM, et al. *Adenovirus El B-58KD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 KD cellular protein in transformed cells. Cell*,. 28: 387-394, 1982.

SERVOMAA k, KIURU A, KOSMA VM, HIRVIKOSKI P, RYTOMAA T. p53 and K-ras gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. *J Clin Pathol: Mol Pathol*; 53:24-30, 2000.

SETIAWAN VW, ZHANG ZF, YU GP, LU QY, LI YL, LU ML, WANG MR, GUO CH, YU SZ, KURTZ RC, HSIEH CC. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int J Cancer*,92: 600-604; 2001.

SHERR C J Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.

SHIAO YH, RUGGE M, CORREA P, LEHMANN HP, SCHEER WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol*;144:511-7, 1994.

SHINMURA K, KOHNO T, TAKAHASHI M et al. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and E cadherin mutations. *Carcinogenesis* ;20:1127-1131, 1999..

SILVA, L D, SANTOS, A, BOCEWICZ, A C, QUEIROZ, RM, BETHONY J, GAZZINELLI A, *et al.*, Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil, *Tropical Medicine & International Health* Volume 8 Issue 11 Page 987-991, 1999.

SMITS VA & VEDEMA RH, Checkpoints out the G2/M transition. *Biochem Biophys Acta* 1519 1-12, 2001.

SOLCIA E, FIOCCA R, LUINETTI O, VILLANI L, PADOVAN L, CALISTRI D, *et al.* Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *Amer J surg Pathol*;20:S8 22, 1996.

STRACHAN T, READ AP. *Genética Molecular Humana*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002, 576p.

TARGA AC, AE SILVA AE Apoptose: implicações na carcinogênese gástrica e sua associação com *Helicobacter pylori* *Arq Ciênc Saúde* ;12(1):37-41, 2005.

TEH, M. & LEE, Y., Intestinal and diffuse carcinoma of the stomach among the ethnic and dialect groups in Singapore. *Cancer*, 60:921-925, 1987.

UEMURA N AND OKAMOTO S , Effect of Eradication on Subsequent Development of Cancer after Endoscopic Resection of Early Gastric Cancer in Japan. *Gastroenterology Clinics of North America*, Volume 29, Issue 4, Pages 819-827

VEGA FJ, INIESTA P, CALDES T, SANCHEZ A, LOPEZ JA, DE JUAN C, DIAZ-RUBIO E, TORRES A, BALIBREA JL, BENITO M p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 76(1):44-51, 1997.

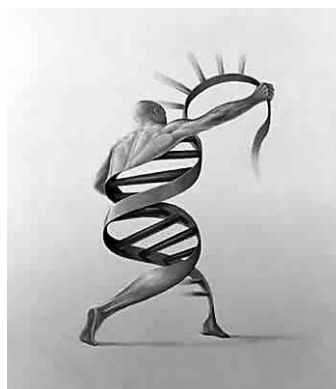
WEEKS, D.L. *et al.* H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287: 482-5, 2000.

WEINERT T. *DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. Cell*, 94: 555- 558, 1998.

WU MS, SHUN CT, WANG HP, SHEU JC, LEE WJ, WANG TH, et al. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 112:1457– 65, 1997.

YAN-QUIROZ, DIAZ-PLASCENCIA E BURJOSCHAVEZ Cuadro Clínico
Patológico y Sobrevida en Cancer Gástrico Operable- Rev Gastroent Perú, 22: pp 19-
27, 2002.

Anexos



Anexo I. **Método de purificação de produto de pCR “*in house*”**

Ao produto da PCR foi adicionado etanol 95% gelado a 4°C na proporção de 20/80, a seguir as amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -20 °C por 2 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Por conseguinte, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e adicionado 250 ul de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, e o “*pellet*” seco por 2 minutos em Termo Bloco a 90°C, destampado; o DNA foi então ressuspendido em 10 ul de água Mili Q autoclavada e armazenado a -20 °C.

A PCR purificada foi quantificada utilizando eletroforese em gel de agarose 2%, e comparada com ladder de 100 pb, para então, serem submetidos as reações de seqüenciamento.

Paciente	Idade	Sexo	Tipo histológico			C. Lauren	Sítio	Estadiamento	CagA
			T	N	M				
JO1	46	M	T4	N1	MX	DIFUSO	ANTRO	IV	negativo
JO2	63	M	T3	N1	M1	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO3	70	F	T3	N3	M1	INTESTINAL	MISTO	III	negativo
JO4	43	F	T3	N2	M1	DIFUSO	ANTRO	III	negativo
JO5	72	M	T3	N2	M1	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO6	44	M	T3	N2	M0	DIFUSO	CORPO	III	positivo
JO7	60	F	T4	N1	M0	INTESTINAL	ANTRO	IV	positivo
JO8	41	M	TY	NY	MY	INTESTINAL	n/c	Y	negativo
JO9	64	F	T4	N2	M1	INTESTINAL	n/c	IV	negativo
JO10	78	M	T3	N2	M1	DIFUSO	n/c	IV	negativo
JO11	75	M	T3	N1	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO12	64	M	T2	N1	M0	DIFUSO	ANTRO	II	negativo
JO13	66	M	T4	N3	M0	INTESTINAL	CORPO	IV	negativo
JO14	38	M	Tis	N0	M0	INTESTINAL	n/c	0	negativo
JO15	82	M	T1	N0	M0	INTESTINAL	CORPO	I	positivo
JO16	54	M	T4	N2	M0	INTESTINAL	n/c	IV	negativo
JO17	64	M	T4	N1	M1	DIFUSO	n/c	IV	negativo
JO18	79	M	T1	N0	M0	INTESTINAL	n/c	I	positivo
JO19	63	F	T3	N1	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO20	51	F	T3	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO21	66	F	T3	N3	M1	INTESTINAL	ANTRO	IV	negativo
JO22	51	M	T3	N2	M0	DIFUSO	n/c	III	positivo
JO23	59	M	T3	N1	M0	DIFUSO	n/c	III	positivo
JO24	45	M	T3	N1	M0	DIFUSO	ANTRO	III	positivo
JO25	57	M	T1	N0	M0	INTESTINAL	n/c	I	positivo
JO26	55	F	T3	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO27	37	F	T2	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO28	57	M	T2	N0	M0	DIFUSO	n/c	I	positivo
JO29	46	M	T3	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO30	37	M	T3	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO31	76	M	T3	N2	M0	INTESTINAL	n/c	III	positivo
JO32	48	M	T3	N1	M1	INTESTINAL	ANTRO	IV	positivo
JO33	58	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO34	53	F	T3	N0	Mx	INTESTINAL	ANTRO	II	positivo
JO35	65	M	T3	Nx	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO36	68	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO37	68	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO38	66	M	T1	N1	Mx	DIFUSO	ANTRO	I	negativo
JO39	74	F	T1	N0	Mx	DIF/INTEST	ANTRO	I	positivo
JO40	45	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO41	56	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO42	54	F	T3	N0	Mx	INTESTINAL	ANTRO	II	negativo

JO43	47	M	T3	N2	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO44	51	M	T3	N2	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO45	70	M	T2	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	II	negativo
JO46	67	F	T3	N2	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO47	71	M	T4	N2	Mx	INTESTINAL	ANTRO	IV	positivo
JO48	71	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO49	70	F	T3	N2	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO50	73	F	T3	N0	Mx	INTESTINAL	ANTRO	II	negativo
JO51	72	F	T2	N0	Mx	INTESTINAL	ANTRO	I	negativo
JO52	73	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	positivo
JO53	76	M	T3	Nx	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo
JO54	44	F	T2	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	II	negativo
JO55	63	M	T3	N1	Mx	INTESTINAL	ANTRO	III	negativo

Anexo IV. Tabela contendo dados clínicos referentes aos participantes da pesquisa., onde **n/c** (dado não coletado) **y** = classificação após tratamento inicial multimodal (INCA).

Anexo 5. Tratamento estatístico

1) presença da mutação x Classificação de Lauren

Quiquadrado de Associação

Graus de liberdade = 1

Quiquadrado = 2.3845

Probabilidade = 0.12254283

Quiq.cor(Yates) = 1.48019550

Probabilidade = 0.22374395

Fisher

Monocaudal = 0.11091261

Bicaudal = 0.19128443

Coef. Yule = 0.50000000

	DIFUSO	INTESTIN	Total

MUTANTE	9	22	31
NÃO MUT	3	22	25
Total	12	44	56

Porcentagens sobre o total da linha

	DIFUSO	INTESTIN	Total

MUTANTE	29.03	70.97	100.00
NÃO MUT	12.00	88.00	100.00
Total	21.43	78.57	100.00

Porcentagens sobre o total da coluna

	DIFUSO	INTESTIN	Total

MUTANTE	75.00	50.00	55.36
NÃO MUT	25.00	50.00	44.64
Total	100.00	100.00	100.00

Porcentagens sobre o total da tabela

	DIFUSO	INTESTIN	Total
MUTANTE	16.07	39.29	55.36
NÃO MUT	5.36	39.29	44.64
Total	21.43	78.57	100.00

2) Presença de mutação x presença de *CagA*

Quiquadrado de Associação

Graus de liberdade = 1

Quiquadrado = 0.1271

Probabilidade = 0.72149555

Quiq.cor(Yates) = 0.00708364

Probabilidade = 0.93292576

Fisher

Monocaudal = 0.46626842

Bicaudal = 0.78930737

Coef. Yule = 0.09677419

	CagA+	CagA-	Total
Mutante	17	14	31
Não Mut	12	12	24
Total	29	26	55

Porcentagens sobre o total da linha

	CagA+	CagA-	Total
Mutante	54.84	45.16	100.00
Não Mut	50.00	50.00	100.00

Total	52.73	47.27	100.00
-------	-------	-------	--------

Porcentagens sobre o total da coluna

	CagA+	CagA-	Total
Mutante	58.62	53.85	56.36
Não Mut	41.38	46.15	43.64
Total	100.00	100.00	100.00

Porcentagens sobre o total da tabela

	CagA+	CagA-	Total
Mutante	30.91	25.45	56.36
Não Mut	21.82	21.82	43.64
Total	52.73	47.27	100.00

3) Presença de *CagA* x Estadiamento do Tumor

Quiquadrado de contingência

Graus de liberdade = 3

Quiquadrado = 8.4896
 Probabilidade = 0.03690650

Atenção! Existe valor esperado < 5!

	CagA+	CagA-	Total
I	5	2	7
II	1	5	6
III	20	10	30
IV	3	7	10

Total	29	24	53
-------	----	----	----

Porcentagens sobre o total da linha

	CagA+	CagA-	Total
I	71.43	28.57	100.00
II	16.67	83.33	100.00
III	66.67	33.33	100.00
IV	30.00	70.00	100.00
Total	54.72	45.28	100.00

Porcentagens sobre o total da coluna

	CagA+	CagA-	Total
I	17.24	8.33	13.21
II	3.45	20.83	11.32
III	68.97	41.67	56.60
IV	10.34	29.17	18.87
Total	100.00	100.00	100.00

Porcentagens sobre o total da tabela

	CagA+	CagA-	Total
I	9.43	3.77	13.21
II	1.89	9.43	11.32
III	37.74	18.87	56.60
IV	5.66	13.21	18.87
Total	54.72	45.28	100.00
