

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Luísa Silva Pacheco**

**ALTERAÇÕES DO GENE *TP53* NA MUCOSA ESOFÁGICA DE  
PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Lúisa Silva Pacheco**

**ALTERAÇÕES DO GENE *TP53* NA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes**

Santa Maria, RS

2016

**Luísa Silva Pacheco**

**ALTERAÇÕES DO GENE *TP53* NA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 22 de agosto de 2016:**

---

**Marli Matiko Anraku de Campos, Dr.<sup>a</sup>. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**Renato Borges Fagundes, Dr. (UFSM)  
(Co-orientador)**

---

**Sandra Beck, Dr.<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**João Felipe Peres Rezer, Dr. (Unijuí)**

**Santa Maria, RS  
2016**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Delma e Cléo, e ao meu irmão Gabriel, pelo amor, união, exemplo, respeito e pelo constante apoio na busca dos meus objetivos.*

*Dedico também aos amigos de longa data, Matheus, Fillipe, Guilherme, Ivana e Luísa e, ao meu namorado, Günther, que sempre me incentivaram e deram forças para que eu alcançasse meus sonhos com sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado, especialmente:*

*A Deus, por ter me dado inteligência e sabedoria para o enriquecimento e aptidão da real aprendizagem;*

*À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos, por me receber gentilmente e ter me ajudado nesses dois anos de mestrado, agradeço pela confiança depositada desde o início do meu trabalho no Labmyco;*

*Ao meu co-orientador, Dr. Renato Borges Fagundes, por todo o conhecimento transmitido ao longo de minha vida acadêmica. Pela confiança, atenção, disponibilidade e paciência, me guiando e estimulando desde a graduação, assim como pelas correções e sugestões ao longo de todo o trabalho;*

*Aos colegas do Labmyco, que compartilharam seus conhecimentos comigo e as trocas de informações e, especialmente às ICs pelos momentos de descontração e pela ajuda durante as técnicas desenvolvidas;*

*À Tanise Dalmolin, amiga que conheci por meio do mestrado, pelo auxílio direto no desenvolvimento deste trabalho, através de indicações, discussões e revisões;*

*Aos meus pais, Delma e Cléo por serem responsáveis pela minha educação e caráter. A pessoa que sou hoje devo a eles. Agradeço pelo amor incondicional e pelo esforço empreendido em minha educação;*

*Aos professores, funcionários e colegas do PPGCF, por todos os momentos de aprendizagem;*

*À Universidade Federal de Santa Maria, instituição que me acolheu e promoveu meu crescimento profissional nos últimos sete anos;*

*A Capes, pelo apoio e incentivo financeiros proporcionados para a realização desta pesquisa científica;*

*Aos pesquisadores e professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho;*

*A todas as pessoas que estiveram presentes nesta minha jornada e não foram citados nominalmente, um agradecimento especial por acreditarem em mim.*

*Muito obrigada a todos!*

## RESUMO

### ALTERAÇÕES DO GENE *TP53* NA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO

AUTORA: Luísa Silva Pacheco

ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes

O câncer de esôfago é uma neoplasia com alta incidência no RS, acomete homens com maior frequência e é altamente fatal. Dados epidemiológicos indicam que o tabagismo, o consumo regular de álcool e exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. O gene *TP53* é responsável pelo controle do crescimento e divisão celular. As mutações somáticas neste gene são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos. O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência das mutações presentes nos éxons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53* nas biópsias esofágicas de pacientes com carcinoma de células escamosas esofágicas diagnosticados no Hospital Universitário de Santa Maria. Foram extraídos os DNAs de 49 biópsias esofágicas através da técnica de *salting out*. A análise do gene *TP53* foi realizada pela amplificação dos éxons 5, 6, 7, 8 e 9 pela técnica de PCR. Os produtos da PCR foram posteriormente encaminhados para análise de sequenciamento. Quarenta e nove amostras mostraram-se viáveis para amplificação do gene, e destas, nove apresentaram ao menos 1 mutação em um dos 5 éxons. Dentre os 9 casos de mutações, constatou-se que quatro amostras apresentaram mutações no éxon 5 (44,4%), duas amostras no éxon 7 (22,2%) e 3 amostras no éxon 8 (33,3%), sendo que nenhuma apresentou mutações nos éxons 6 e 9. Dezesete mutações somáticas foram observadas nessas amostras, mutações pontuais foram encontradas em 8 amostras, sendo a maioria G:C>A:T. Somente uma amostra apresentou uma mutação do tipo inserção. A prevalência de mutações no gene *TP53* no presente estudo foi de 18,36%. O padrão de mutações encontrado foi heterogêneo, sendo a maioria transverões potencialmente atribuíveis a agentes cancerígenos ambientais.

**Palavras-chave:** Câncer de esôfago. mutação. gene *TP53*.

## ABSTRACT

### CHANGES OF GENE *TP53* IN PATIENTS WITH MUCOSA ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS

AUTHOR: LUÍSA SILVA PACHECO  
ADVISOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS  
CO-ADVISOR: PROF. DR. RENATO BORGES FAGUNDES

Esophageal cancer is a tumor with a higher incidence in males, and it is highly fatal. Epidemiological data points out to consumption of tobacco and alcohol and the exposition to polycyclic aromatic hydrocarbon are the main risk factors for the development of this cancer. The *TP53* gene is responsible for growth control and cell division, and fifty percent of all human tumors presents somatic mutation in this gene. The objective was to verify the prevalence of mutations in the exons 5, 6, 7, 8 and 9 of *TP53* gene in esophageal biopsies of patients with esophageal squamous cell carcinoma diagnosed at Hospital Universitario de Santa Maria. We extracted the DNA from 49 esophageal biopsies through salting out technique. The analysis of *TP53* gene was performed by amplification of the exons 5, 6, 7, 8 e 9 by the PCR technique. Then, the samples were submitted to sequencing analysis. Forty-nine samples proved to be viable for amplification. Nine cases showed at least one mutation in any of the 5 exons. Among these 9 cases, we found 4 (44.4%) mutations in exon 5, 2 (22.2) in exon 7 and 3 (33.3%) in exon 8. We did not find mutations in exons 6 and 9. Overall the samples presented 17 somatic mutations with point mutations in 8 of them, most G:C> A:T. Only one case presented insertion type mutation. The prevalence of mutations in *TP53* gene in the present study was 18.36%. The pattern of mutations found was heterogeneous, and most potentially attributable transversions to environmental carcinogens.

**Keywords:** esophageal cancer. mutation. gene *TP53*.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição em porcentagem das 17 mutações encontradas nos éxons 5, 7 e 8 no gene <i>TP53</i> .....	29
---	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações.....	27
Tabela 2 – Mutações encontradas nas amostras.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDHB1	Enzima Aldeidodesidrogenase
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CEE	Carcinoma Escamoso do Esôfago
CE	Câncer De Esôfago
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa Sobre O Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	quilodaltons
<i>p53</i>	Proteína <i>p53</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RS	Rio Grande do Sul

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A- Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFSM).....	40
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1 O CÂNCER COMO UMA DOENÇA CELULAR.....	15
2.2 O GENE <i>TP53</i> .....	17
2.3 CÂNCER ESOFÁGICO.....	19
2.4 O GENE <i>TP53</i> E O CÂNCER EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO.....	21
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	25
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE MATERIAL A FRESCO PELO MÉTODO <i>SALTING OUT</i> : .....	25
4.3 ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO.....	26
4.4 DETECÇÃO DO GENE <i>TP53</i> .....	26
4.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	28
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>41</b>
Anexo A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFSM).....	41

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago (CE) possui uma distribuição geográfica muito heterogênea, inclusive dentro de um mesmo país. No Brasil, o CE é o sexto mais incidente para ambos os sexos, e as maiores taxas de câncer de esôfago no Brasil ocorrem no Rio Grande do Sul com 18 casos a cada 100mil habitantes/ano para homens e 6 casos a cada 100mil habitantes/ano para mulheres, onde o tipo histológico mais comum é o carcinoma escamoso do esôfago (CEE) (INCA, 2016). Em termos de incidência, essa neoplasia é de três a quatro vezes mais comum entre homens do que entre mulheres. Mundialmente, a epidemiologia do CE pode ser dividida quanto à magnitude das taxas de incidência em regiões de baixa incidência (Noroeste da África), incidência intermediária (Brasil, Argentina, Uruguai, França, Japão, África do Sul e América do Norte) e as de incidência muito elevada (Irã, China e litoral do Mar Cáspio) (RÊGO et al., 2014). O CE manifesta-se em uma fase tardia de sua evolução, com sintomas debilitantes característicos de doença avançada. Por ser um câncer de prognóstico ruim, as taxas de mortalidade aproximam-se das taxas de incidência em razão da alta letalidade dessa neoplasia. No momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes não apresentam condições para terapia curativa ou ressecção radical, sendo a conduta habitual o tratamento paliativo. A sobrevida geral em cinco anos é baixa e varia conforme a classificação do tumor, em torno de 10% em carcinoma epidermóide e pode chegar a 25% no sarcoma sinovial (OLIVEIRA-BORGES et al., 2015). O diagnóstico precoce é de fundamental importância para aumentar a sobrevida de pacientes com CE, porém mesmo alguns casos chamados precoces reconhecidos na endoscopia, frequentemente apresentam invasão linfática e vascular e, por essa razão, não aumentam de forma significativa a sobrevida (DE OLIVEIRA et al., 2015). Os fatores de risco relacionados ao CEE são idade, história familiar e fatores extrínsecos como álcool, fumo, contaminação de produtos alimentícios por micotoxinas fumonisinas e o consumo do chimarrão em elevada temperatura, muito comum no Sul do Brasil, na Argentina e no Uruguai (INCA, 2016). A carcinogênese é definida como um processo de múltiplas alterações genéticas que modificam a homeostasia de uma célula determinando um desenvolvimento celular descontrolado que origina o câncer. O ciclo celular é controlado através de duas vias principais, a *p53* (p14-MDM2-p53-p21) e *pRb* (p16-ciclina-D1-PRB), e perdas de função nessas vias desempenham papel importante no desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos (YAMASHITA et al., 2015). O desenvolvimento de CEE envolve inúmeras alterações genéticas, sendo as alterações mais relatadas no gene *TP53*. O gene *TP53* é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17 e codifica uma

fosfoproteína nuclear de 53 kDa, chamada proteína *p53*. Esta proteína está envolvida no processo de reparação do DNA, controle do ciclo celular, processo de angiogênese e apoptose (ACHATZ et al., 2008). Mais de 70% das mutações que alteram o domínio de ligação da proteína *p53* são codificadas pelos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*. A maior parte destas alterações são mutações pontuais do tipo ‘*missense*’ e, muitas vezes, a proteína mutante não tem atividade devido ao DNA modificado (ROSSINI et al., 2010). O gene supressor tumoral *TP53* é um fator de transcrição de ligação específico de uma sequência de DNA que age como principal controlador celular de crescimento e divisão. Células normais expressam baixa concentração da proteína nuclear em forma inativa; entretanto, em resposta a uma ampla variedade de estresse celular, tais como danos ao DNA, hipóxia ou depleção de grupos de ribonucleosídeos-trisfosfato, o *TP53* é ativado e expressa sua proteína em alta concentração, determinando a interrupção do ciclo celular para reparo do DNA, ou encaminhar a célula com danos irreparáveis para apoptose. Quando o gene *TP53* apresenta alguma mutação nos éxons 5, 6, 7 ou 8, não ocorre a expressão correta da proteína *p53* e, assim, esse reparo celular não acontece, transcorrendo a proliferação de células com algum erro (MERLO et al., 2014). As mutações no gene *TP53* são consideradas um evento precoce no desenvolvimento do CEE e os diferentes perfis de mutação surgem de acordo com diferentes áreas geográficas, proporcionando sugestões para os mecanismos envolvidos na carcinogênese e mutagênese. As mutações somáticas no gene *TP53* são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, fazendo desse gene o mais comumente alterado nas lesões neoplásicas (ROSSINI et al., 2010). As mutações no gene *TP53* ocorrem em mais de 50 tipos diferentes de tumores, incluindo os de bexiga, cérebro, mama, cérvice, esôfago, laringe, fígado, pele, estômago, cólon, ovário, pâncreas, próstata e tireoide (JORDE et al, 2008).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O CÂNCER COMO UMA DOENÇA CELULAR

O câncer é uma doença molecular e geneticamente organizada em que genes mutantes se comunicam com outros genes mutantes, produzindo diferentes trajetórias de sinalizações que se compõem e se completam. Como resultado dessa anormalidade paradoxalmente organizada, originam-se células com comportamentos biológicos diferentes aos das células normais (TOMASETTI et al., 2015). O câncer pode ser considerado uma doença genética, uma vez que é desencadeado por alterações no DNA da célula. No entanto, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, não é necessariamente uma doença hereditária. Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais. No caso das síndromes hereditárias, as mutações germinativas estão diretamente associadas à predisposição familiar para o desenvolvimento de tumores e, nesses casos específicos, o câncer é uma doença genética e hereditária (GUEMBAROVSK et al., 2009).

De um ponto de vista rudimentar, o câncer pode ser visto como uma doença genética na qual a célula progenitora que gera o tumor, parece ter adquirido um número crítico de mutações nos genes, que irão afetar o crescimento ou a diferenciação celular. Essas mutações podem ocorrer nos oncogenes ou nos genes supressores tumorais até atingirem um limiar após o qual a célula maligna irá proliferar de forma incontrolável. Cada uma dessas mutações é transmitida para a progenia desta célula. A progenia constitui um clone com todos os membros geneticamente similares ou idênticos à célula progenitora (GUEMBAROVSKI, et al., 2009). É possível concluir que determinados tipos de tumores primários e de neoplasias hematológicas possuem padrões biológicos e moleculares semelhantes, mas quando se transformam em células tumorais circulantes causadoras do câncer passam a ser exclusivos de cada pessoa, ou seja, suas células normais são identicamente normais, enquanto que as células cancerosas se tornam diferentes cada uma à sua maneira. Essa é a razão pela qual se justifica o diagnóstico precoce de um tumor em seu estágio inicial que, por terem, em sua maioria, padrões biológicos e moleculares semelhantes, permite condutas terapêuticas mais favoráveis para tratá-lo (HANAHAN et al, 2011).

O câncer é, por definição, uma doença clonal, ou seja, sempre que as células neoplásicas são examinadas geneticamente, elas são originadas de uma única célula. Assim, diferentemente de outras doenças que requerem um grande número de células modificadas, o câncer é resultante da proliferação descontrolada de uma simples linhagem celular que leva à invasão de tecidos vizinhos e disseminação metastática. As células cancerosas só precisam de um pequeno número de características fenotípicas alteradas para evoluir para um tumor. As alterações genéticas iniciais onde começa a proliferação celular aberrante são seguidas do acúmulo de mutações adicionais durante a expansão clonal. Finalmente, um processo de seleção clonal ocorre, no qual subclones com propriedades de crescimento contínuo ou perda de capacidade de sofrer morte celular programada, a chamada apoptose, se tornam as células predominantes na massa tumoral, processo esse chamado de progressão tumoral (GREAVES et al., 2012).

Os tumores evoluem a partir de lesões celulares após a aquisição de uma série de mutações ao longo do tempo. Um pequeno número de mutações em uma célula de câncer já é capaz de conferir uma vantagem de crescimento seletivo, por exemplo em *TP53*, também chamado de mutações de acionamento (STRATTON et al., 2009). A primeira mutação proporciona uma vantagem de crescimento seletivo a uma célula 'normal', permitindo àquela superar as células que a rodeiam. É o que acontece no câncer colorretal, onde essas mutações ocorrem frequentemente no gene *APC*. Um pequeno adenoma que resulta dessa mutação cresce lentamente, enquanto uma segunda ronda de crescimento clonal no gene *KRAS* permite uma expansão no número de células. Esse processo de mutação seguido por expansão clonal contínua, com mutações em genes como *PIK3CA*, *SMAD4*, e *TP53* causa a formação de um tumor maligno, que pode invadir através da membrana basal subjacente os nódulos linfáticos e órgãos distantes como o fígado (VOGELSTEIN et al., 2013).

Diferentemente da taxa de mutações pontuais em tumores, que é muito semelhante à de células normais, a taxa de alterações cromossômicas no câncer é elevada. A maior parte dos tumores sólidos apresentam aneuploidias, bem como deleções, inversões, translocações e outras anomalias genéticas. Quando uma grande parte de um cromossomo é duplicado ou eliminado, é difícil identificar o gene 'alvo' específico, cujo ganho ou perda conferem vantagem no crescimento de uma célula no tumor. Genes 'alvo' são mais facilmente identificados no caso de translocações cromossômicas, deleções e ampliações de genes. As translocações geralmente fundem dois genes para criar um oncogene (tal como o *BCR-ABL* na leucemia mieloide crônica), mas em um pequeno número de casos, pode inativar um gene



supressor tumoral, separando-o de seu promotor. Deleções envolvem muitas vezes apenas um ou alguns genes, e o alvo é sempre um gene supressor tumoral (PELIZZOLA et al., 2011).

## 2.2 O GENE *TP53*

O gene *TP53* está situado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (kDa) de 393 aminoácidos, formando cinco regiões altamente conservadas e quatro domínios funcionais, denominada proteína *p53*. Essa é uma proteína lábil com vida média muito curta, em torno de 6 minutos e, devido a sua rápida degradação, sua detecção é extremamente difícil (WU et al., 2015). Em resposta a um sinal de estresse celular, a proteína *p53* é ativada por alterações químicas de uma cadeia proteica depois de sua tradução, processo chamado de modificações pós-traducionais. Estas modificações mobilizam o gene *TP53*, com isso os níveis intracelulares da proteína *p53* aumentam e o gene é ativado como um fator de transcrição para coordenar programas de respostas específicas ao estresse, levando à interrupção do ciclo celular, a senescência celular ou apoptose. Por ter diferentes entradas que regulam a sua atividade, o gene *TP53* atua como um nó central na rede celular de respostas de estresses oxidativos (HRSTKA et al., 2009).

O gene *TP53* é considerado um gene supressor tumoral, e as mutações levam a uma perda de sua função, o que resulta na incapacidade de efetuar a parada do ciclo celular para reparo do DNA ou disparar o mecanismo de apoptose, ou morte celular programada. O *TP53* íntegro é ativado em resposta a sinais de dano celular e interrompe o ciclo celular na fase G1, impedindo a propagação do erro genético para as células filhas na fase S e encaminha a célula para reparo do DNA ou induz a apoptose. Quando o *TP53* está mutado, as células com DNA danificado escapam tanto do reparo quanto da apoptose, permanecem geneticamente instáveis e acumulam mutações. Os rearranjos cromossômicos adicionais levam a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica (JORDE et al., 2008).

A maioria dos tumores sólidos têm dezenas de translocações, os pontos de interrupção das translocações são muitas vezes nos chamados 'desertos de genes'. Esses locais são desprovidos de genes conhecidos e muitas das translocações e deleções são adjacentes aos locais frágeis que são propensos às rupturas. As células cancerosas podem, talvez, sobreviver a tais quebras cromossômicas mais facilmente do que as células normais porque contêm mutações que incapacitam genes como o *TP53*, que normalmente respondem a danos no

DNA, desencadeando a morte celular. Estudos indicam que existem cerca de 10 vezes menos genes afetados por alterações cromossômicas do que por mutações pontuais (VOGELSTEIN et al., 2013).

Mutações somáticas em *TP53* ocorrem em quase todos os tipos de câncer, com taxas entre 38- 50% em ovário, esôfago, cólon, cabeça e pescoço, laringe e tumores de pulmão. Essas alterações são mais frequentemente encontradas em estágios avançados da doença, como triplo negativo ou HER2 em câncer de mama (OLIVIER et al., 2010). As alterações genéticas no gene *TP53* são as mais frequentemente encontradas nas neoplasias humanas malignas. A ação de carcinógenos pode induzir mutações específicas em *TP53*. A exposição ao benzopireno, por exemplo, é um potente mutagênico e carcinógeno encontrado no fumo do cigarro e produz mutações em três códons específicos de *TP53* em tumores de pulmão (JORDE et al., 2008). As mutações germinativas do *TP53* são responsáveis por um câncer herdado conhecido como síndrome de Li-Fraumeni. Nesta síndrome há uma predisposição hereditária ao câncer. Estudos confirmam que indivíduos afetados por essa síndrome apresentam pais portadores de mutação em *TP53* (ACHATZ et al., 2008).

Em vários tipos de câncer, o gene *TP53* mostra padrões de mutações específicos que refletem exposições a mutagênicos, por exemplo, C:T>T:C e C:C>T:T em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, associados à radiação ultravioleta (UV) exposição radiação p; mutações G>T no câncer de pulmão dos fumantes, associada à exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como benzo[a]pireno (BAP); mutações A>T em carcinomas uroteliais, associados à exposição ao ácido aristolóquico I (AAI) (OLIVIER et al., 2010). Os fatores que mais influenciam as mutações no gene *TP53* são a exposição à luz solar e a presença de transições do conjunto CC para TT na pele, causando melanoma cutâneo; exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos através do consumo do tabaco ou exposição ao carvão, gerando transversões de G para T em câncer do pulmão, com mutações de guaninas localizados nos códons específicos sobre a cadeia não transcrita de DNA e exposição alimentar a aflatoxina B1, originando a presença de G para transversões de T na terceira base do códon 249 (AGG para AGT) no carcinoma hepatocelular relacionado com o HBV (HOLLSTEIN et al., 2013). Em câncer de células escamosas do esôfago, os estudos sobre os padrões de mutação no gene *TP53* demonstraram diferenças significativas entre os tipos de câncer de áreas de baixa e de alta incidência. Em 2001, dois estudos relataram uma descrição de padrões de mutação no gene *TP53* em série retrospectiva de câncer de células escamosas de esôfago de hospitais de referência em Teerã, no Irã, uma área de alto risco para CEE. Comparado a CEE de outros lugares, os tumores de Teerã tinham significativamente

maior taxa de G:C para transições T:A na dinucleotidase *CpG*, um tipo de mutação comumente detectada em cânceres associados com condições inflamatórias (BIRAMIJAMAL et al, 2001; SEPEHR et al, 2001). Em 2011, foram analisados os padrões de mutações do gene *TP53* em tumores a partir de áreas geográficas de alto risco em busca de pistas sobre os processos mutagênicos envolvidos na causa de CEE. O tipo de mutação mais comum foi transições G:C para A:T em posições que não contêm *CpGs*, um tipo de mutação que pode ser induzidas por vários mecanismos e por isso é difícil atribuir a qualquer fator de risco específico. Também foram indicadas linhas de evidência que sugerem um papel importante para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na etiologia do CEE (ABEDI-ARDEKANI et al., 2011).

A análise de mutação no gene *TP53* pode, portanto, trazer diversas informações quanto ao dano genotóxico e à sequência genética dos eventos que levam ao aparecimento de células tumorais, bem como auxiliar no diagnóstico e prognóstico, uma vez que, além da mutação no gene *TP53* ser um evento precoce na transformação celular, certas mutações presentes neste gene parecem conferir uma agressividade maior ao tumor (ARRUDA et al., 2008).

## 2.3 CÂNCER ESOFÁGICO

O câncer de esôfago (CE) é uma das neoplasias mais comuns e mais mortais do mundo, ocupando o sexto lugar em mortalidade mundial entre todos os tipos de câncer (YAO et al., 2014). No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 10.810 casos novos de CE para o ano de 2016, com 7.950 casos do sexo masculino e 2.860 do sexo feminino, e representa, respectivamente, a sexta e a décima terceira posições em incidência (INCA, 2016).

Histologicamente, os cânceres de esôfago podem ser classificados, em carcinoma escamoso (ou epidermóide) e adenocarcinoma. O carcinoma escamoso é derivado do epitélio estratificado não-queratinizado, característico da mucosa normal do esôfago. Trata-se do tipo histológico mais habitual e ocorre mais frequentemente em pacientes do sexo masculino, a partir dos 50 anos e de baixa classe social. Esse tumor acomete principalmente os terços médio e inferior (mais de 80% dos casos) do esôfago. Existe uma correlação entre alcoolismo e tabagismo nos pacientes portadores desta neoplasia. Cabe ressaltar a existência de variantes do carcinoma epidermóide: carcinoma verrucoso, carcinoma epidermóide tipo basilóide e carcinoma (epidermóide) sarcomatóide (QUEIROGA, 2006). O Rio Grande do Sul apresenta as maiores taxas de mortalidade por CE na América do Sul. Estudo publicado por Fagundes e

colaboradores em 2015 demonstrou que em um período de 20 anos, dos 686 casos diagnosticados com CE na região central do Rio Grande do Sul, 640 eram de CEE.

O adenocarcinoma surge na parte distal do esôfago, na presença de refluxo gástrico crônico e metaplasia intestinal do epitélio esofágico (esôfago de Barrett) responsável por 75% de todos os casos de CE, nos países mais desenvolvidos do ocidente, com fatores de risco relacionados a estilo de vida, obesidade, refluxo gastroesofágico e consumo de tabaco (XIMENES NETTO et al., 2011). O número de casos de adenocarcinoma de esôfago aumentou nos últimos 30 anos nos Estados Unidos e em países europeus, devido ao aumento das taxas de doença de refluxo gastroesofágico, já que pessoas que apresentam sintomas dessa doença tem um risco oito vezes maior de desenvolver adenocarcinoma (POHL et al., 2005; BOSETTI et al., 2008). No sul do Brasil há uma alta prevalência de doenças de refluxo gastroesofágico, porém ao contrário do que é esperado, há uma baixa prevalência de esôfago de Barrett (FAGUNDES et al., 2003). O adenocarcinoma desenvolve-se no interior do epitélio colunar displásico principalmente na junção esofagogástrica/cárdia. Mesmo antes da neoplasia se tornar detectável, observam-se aneuploidias e mutações do *TP53* no epitélio displásico (SILVA et al., 2014). As alterações moleculares subjacentes à carcinogênese esofágica mostram que mutações pontuais em *TP53* podem ocorrer em pelo menos 50% dos casos iniciais de carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, bem como na mucosa de esôfago de Barrett. Uma série de genes adicionais foram estudados para mutações em CE, mas a maioria desses estudos de um único gene não identificaram mutações (MEYERSON et al., 2010).

Sabe-se que o tabaco contém mais de 4.000 substâncias cancerígenas, entre elas estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), nitrosaminas, aminas aromáticas, aldeídos, metais e outras substâncias voláteis. Tais substâncias podem causar danos ao material genético e, como consequência, podem contribuir para o processo da carcinogênese. O mecanismo utilizado por esses fatores para desencadear o processo da neoplasia está relacionado com o desequilíbrio do processo de produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de danificar o DNA e comprometer genes importantes, tais como o gene supressor tumoral *TP53*, e a insuficiência de suas funções afeta mecanismos de indução da apoptose e a ativação do sistema de reparação do ciclo celular (PAZ et al., 2014). Embora o etanol não seja um agente cancerígeno direto, um de seus metabólitos, o acetaldeído, pode atuar como um promotor de tumores, já que é uma substância cancerígena reconhecida e as mutações nas enzimas que metabolizam o álcool também têm sido associadas com um risco aumentado de CEE (PENNATHUR et al., 2013). O alcoolismo e o tabagismo atuam de forma

sinérgica, especialmente no CEE, aumentando o risco em 5-10 vezes comparado a não fumantes. O alcoolismo associado ao tabagismo aumenta em 100 vezes o risco do tipo epidermóide, o mesmo não sendo verdade para o adenocarcinoma (XIMENES NETTO et al., 2011).

Em 2011, Abedi-Ardekani e colaboradores analisaram na província de Golestan, localizada no nordeste do Irã, região de alto risco para carcinoma de células escamosas de esôfago, os padrões de mutações no gene *TP53* em tumores de esôfago. O padrão de mutação heterogêneo encontrado é altamente sugestivo da influência dos agentes cancerígenos ambientais, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presente nas bebidas consumidas em altas temperaturas, além disso, a composição do chá também pode influenciar a mutagênese. No ocidente, mais de 90% dos casos estão associados ao consumo de tabaco e álcool. Estudo realizado por Rossini e colaboradores em 2010, no sudeste do Brasil, com 110 biópsias CEE relacionou o perfil de mutações encontrados em *TP53* com o acetaldeído. Em contraste, em áreas de alto risco como em Linxian na China e o nordeste do Irã, poucos casos são associados ao tabaco e ao álcool, sendo os principais fatores de risco, a ingestão reduzida de frutas e vegetais, deficiências de selênio, zinco e vitamina E, elevada exposição aos HAP e higiene oral pobre. No Rio Grande do Sul, onde mais de 80% dos casos são do tipo histológico de células escamosas, a população está exposta a altos níveis de HAP, provenientes da fumaça produzida pelo tabaco, pelo preparo do churrasco, e do consumo de chimarrão. Este último, provavelmente está associado à ingestão de carcinógenos (HAP) presentes na erva mate, adicionados durante o seu processamento, e à lesão térmica da mucosa esofágica causada pelas altas temperaturas em que o chimarrão é consumido (FAGUNDES et al., 2006; KAMANGAR et al., 2008). Além disso, o consumo de álcool no sul do Brasil é maior do que em outras áreas de alto risco para câncer de células escamosas de esôfago no mundo. Entre outras condições associadas ou predisponentes estão: neoplasias de cabeça e pescoço, doença celíaca, Síndrome de Plummer-Vinson, tilose, acalasia e estenose cáustica do esôfago (XIMENES NETTO et al., 2011).

## **2.4 O GENE *TP53* E O CÂNCER EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

A carcinogênese esofágica está intimamente relacionada ao desequilíbrio da apoptose celular, inativação de genes supressores tumorais, ativação dos oncogenes e alterações do reparo do DNA. Sob condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre a proliferação celular e o processo de apoptose. Portanto, a desregulação da apoptose pode induzir a várias

doenças, incluindo tumores malignos (WEI et al., 2015). Os produtos dos genes mutantes são oncoproteínas, identificadas através da imunohistoquímica, que auxiliam no prognóstico e tratamento do câncer. Neste sentido, a associação do prognóstico do câncer de esôfago com alguns marcadores imunohistoquímicos, tais como as proteínas *p53*, *p16* e a *Cox2* têm sido relatada, uma vez que as proteínas *p16* e *p53* são inibidoras do complexo CDK4/6 e ciclina D1, levando à parada do ciclo celular em G1 (FELIN et al., 2014). Genes supressores tumorais compreendem um conjunto de genes que inibem a formação de tumores através da sua participação na transdução relacionadas com ciclo celular, processo de apoptose, regulação e diferenciação celular, sintetizando proteínas que modulam negativamente a transformação neoplásica, como exemplo podemos citar o gene *TP53* (SERRANO et al., 2014).

As mutações no gene *TP53* são uma das mais comuns em cânceres humanos, incluindo no carcinoma esofágico. Essas mutações podem levar a um aumento na expressão da proteína *p53* sintetizada por esse gene. Essa proteína se acumula no núcleo celular e pode ser detectada por imunohistoquímica (WANG et al., 2011). É constatado que a superexpressão da proteína *p53* está associada com estágios avançados de câncer. Estudos de coorte publicados em 2014 por Yao e colaboradores, sugerem que a superexpressão da proteína *p53* em pacientes com CEE está associada a estágios avançados dessa neoplasia. Este estudo também sugere que a proteína *p53* tem um papel importante no desenvolvimento e na invasão de tumores, incluindo os de CEE. Mutações no gene *TP53* parecem ocorrer em estágios precoces da carcinogênese esofágica e a prevalência dessas alterações aparecem em até 89% nas áreas de alto risco (ABEDI-ARDEKANI et al., 2011). Os primeiros relatos de mutações no gene *TP53* em câncer de esôfago identificaram mutações nos éxons 5, 6, 7, 8 e 9 e sugeriam que as mutações nestas posições eram eventos genéticos comuns na patogênese deste tipo de neoplasia e todas as mutações *missense* detectadas ocorriam nos mesmos códons ou em códons adjacentes relatados para os cânceres de outras localizações, como cérebro, mama, pulmão e cólon (KUWANO et al., 2005). As mutações que ocorrem no códons 157, 158, 245, 248, 273 são experimentalmente demonstradas como formação de DNA adulterado por metabólitos, ou seja, são sítios comuns de se encontrar mutações quando o paciente está exposto a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAINAUT et al., 2001).

As lesões pré-invasivas do carcinoma epidermóide são bem definidas morfológicamente e proporcionam um modelo para o processo multi sequencial da carcinogênese esofágica, sugerindo que as alterações no gene *TP53* e sua proteína frequentemente ocorrem em lesões pré-invasivas do esôfago (WHIBLEY et al., 2009). Para

definir se a mutação de *TP53* era um evento precoce ou tardio na carcinogênese esofágica, biópsias de epitélio esofágico de indivíduos assintomáticos, vivendo em área de alta incidência para carcinoma epidermóide do esôfago (condado de Huixian, província de Hennan, China) foram analisadas com relação às mutações e expressão imunohistoquímica de *p53* e comparadas com espécimes de esôfago ressecados por carcinoma epidermóide. Os resultados sugeriram que a acumulação da proteína *p53* e as mutações no gene podiam ocorrer como um evento precoce na carcinogênese esofágica, havendo também a sugestão de que a acumulação da proteína se correlacionava com as mutações no gene e que a mesma poderia ser um marcador para a identificação de indivíduos sob alto risco para o carcinoma do esôfago (WANG et al., 1996). Estudo conduzido, em nosso meio, sugere que a detecção da proteína *p53* na mucosa esofágica de pacientes alcoolistas e tabagistas, pode contribuir para identificação de indivíduos com risco mais acentuado dentro dos grupos tradicionalmente considerados grupos de risco para câncer esofágico. Nessa população de alto risco (alcoolistas/tabagistas) foi encontrada prevalência de 17% de expressão da proteína *p53* que ocorreu de forma crescente desde o epitélio escamoso normal, até displasia de baixo e alto grau e câncer (FAGUNDES et al., 2001).

A grande maioria dos estudos são enfáticos em sugerir que a mutação de *TP53* é um evento precoce no processo da transformação maligna no epitélio esofágico. Estas alterações podem proporcionar um marcador para identificação precoce de grupos de risco e mesmo servir como um marcador prognóstico do curso clínico das lesões em estágio mais avançados (ARRUDA et al., 2008; HOLLSTEIN et al., 2013; NIK-ZAINAL et al., 2015).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a prevalência das mutações presentes nos éxons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53* nas biópsias esofágicas de pacientes com carcinoma de células escamosas esofágicas diagnosticados no Hospital Universitário de Santa Maria.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1 Identificar a frequência de mutações no gene *TP53* em biópsias esofágicas;

3.2.2 Identificar o tipo e a localização das mutações nos éxons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

O estudo realizado foi do tipo transversal descritivo, onde foram incluídas 49 biópsias esofágicas provenientes de pacientes adultos com diagnóstico de carcinoma de células escamosas esofágicas. Pacientes que não tiveram confirmação histológica de CEE foram excluídos do estudo. Todos estes pacientes eram tabagistas há mais de 10 anos, com consumo médio de mais de 10 cigarros/dia. Todos consumiam álcool em bases regulares por mais de 10 anos, com consumo superior a 40g de etanol por dia.

A prevalência de mutação do gene *TP53* em CEE apresenta índices diferentes em razão da localização geográfica. A amostra foi calculada maximizando a variância (assumindo proporção de 0,5 que maximiza a amostra), com um intervalo de confiança de 95% e um erro máximo de 15%, obtendo-se um número de 49 pacientes.

As biópsias dos tumores foram realizadas no Hospital Universitário de Santa Maria e armazenadas em freezer -80°C para conservação do material biológico em microtubos, sendo, posteriormente encaminhados ao Laboratório de Micobacteriologia do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram realizados os ensaios de análise do gene *TP53*.

### 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE MATERIAL A FRESCO PELO MÉTODO *SALTING OUT*:

A extração do DNA foi realizada através do método *salting out* com cloreto de sódio (NaCl) saturado. Aos tubos contendo a biópsia de carcinoma de esôfago foram adicionados 500µL de TES (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 20µL de proteinase K (10mg/mL), sendo incubados por 3h a 42°C. Após a incubação, ao volume de aproximadamente 550µL foram adicionados 20µL de NaCl saturado (6M), com agitação manual com vigor. Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação o etanol absoluto foi descartado e os tubos permaneceram abertos por 5 min para evaporação do etanol residual e depois foi adicionado 1mL de etanol 70%. O DNA foi eluído em 20µL de TE 10:0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM). Após a utilização de volumes progressivos de 20 a 60µl, o volume de

20 $\mu$ L foi escolhido por ser adequado para obtenção da concentração de DNA em torno de 50ng/ $\mu$ L (ABRÃO et al., 2005).

### 4.3 ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO

Para análise da qualidade da amostra de DNA foram avaliadas a sua quantidade, pureza e integridade. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 260nm. A absorbância igual a 1 representa 50 $\mu$ g/mL de DNA, sendo a concentração mínima esperada de 50 ng/ $\mu$ L. A pureza do DNA foi verificada a partir de uma relação de densidades ópticas, 260nm/280nm, onde o comprimento de onda de 280nm detecta preferencialmente proteínas. Quando essa relação for igual ou maior que 1,7, o material é considerado puro, sendo o ideal esperado uma razão de 1,8 a 2,0. A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo.

Através de espectrofotometria foram obtidos valores entre 1,7 $\mu$ g/mL até 1,888 $\mu$ g/mL para as 49 amostras. A razão da leitura de DNA/ proteína em espectrofotômetro das 49 amostras estava maior que 1,7 $\mu$ g/mL, demonstrando assim que as 49 amostras estavam ideais para a amplificação por PCR.

Quando realizada a eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do DNA, 49 amostras mostraram-se viáveis. As amostras deveriam apresentar uma arraste de DNA bem definido para demonstrar a integridade do DNA extraído.

### 4.4 DETECÇÃO DO GENE *TP53*

A detecção do gene *TP53* foi realizada através da técnica de PCR. Foram utilizadas diferentes ciclagens para as reações dos diferentes éxons do gene *TP53*. Para os éxons 5 e 6 a etapa de desnaturação inicial com 5min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 60s e 72°C por 60s, e posteriormente 72°C por 5min. Para o éxon 7 a etapa inicial foi de 95°C por 5min, seguido de 35 ciclos com 95°C por 30s, 58°C por 60s e 72°C por 60s e, posteriormente, 72°C por 5min. Para os éxons 8 e 9 desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30s, 50°C por 60s e 72°C por 60s, posteriormente 72°C por 5min.

Os *primers* utilizados, bem como o tamanho do produto das reações encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações

IARC code	Primer (5'>3')	Direção	Região amplificada	Tamanho do produto
p-312	TTCAACTCTGTCTCCTTCCT	Forward	Éxon 5	248 pb
p-217	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	Reverse		
p-239	GCCTCTGATTCCCTCACTGAT	Forward	Éxon 6	181 pb
p-240	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	Reverse		
p-333	CTTGCCACAGGTCTCCCAA	Forward	Éxon 7	237 pb
p-313	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	Reverse		
p-316	TTCCTTACTGCCTCTTGCTT	Forward	Éxon 8	231 pb
p-319	AGGCATAACTGCACCCTTGG	Reverse		
p-314	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	Forward	Éxon 9	445 pb
P-315	AGTGTTAGACTGGAACTTT	Reverse		

Após a PCR, a verificação da amplificação do gene *TP53* foi realizada em eletroforese com gel de agarose 2%. Para assegurar a reprodutibilidade dos dados, a PCR foi realizada pelo menos duas vezes.

#### 4.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A análise de mutações do gene *TP53* nos éxons 5 ao 9 foi realizada por sequenciamento direto de produtos de PCR englobando as sequências inteiras de codificações e a emenda de cruzamentos. O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, utilizando o sequenciador automático ABI 3130xl da Applied Biosystems. Após realização da PCR, os produtos da reação foram purificados com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega. Para cada éxon, três nanogramas de produto da PCR foi purificado, que foi mensurado através de Picodrop modelo picopeto1, foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do primer e 3,8 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) com um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cycler com uma etapa de

desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min.

Após a marcação, as amostras foram novamente purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500\_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC3500SR\_Seq\_FASTA.saz. Para os padrões de mutação referência foi utilizada a base de dados IARC TP53.

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Os dados categóricos foram descritos através de frequência absoluta e porcentagem. Como se trata de um estudo descritivo não se planejou fazer análise inferencial e o processamento e análise de dados foi executada com auxílio do pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 13.0.

## 5. RESULTADOS

Cada uma das 49 amostras foi submetida a 10 ampliações por PCR, para cada um dos cinco éxons pesquisados, sendo que cada éxon possuía primer *forward* e *reverse*. Nove amostras foram positivas para mutação no gene TP53. Quatro amostras foram positivas para alteração no éxon 5 (44,4%), duas amostras foram positivas para alterações no éxon 7 (22,2%) e três amostras foram positivas para alterações no éxon 8 (33,3%), sendo que nenhuma amostra foi positiva para alterações nos éxons 6 e 9. As amostras que se mostraram positivas para as alterações foram posteriormente encaminhadas para sequenciamento genético.

A análise de sequenciamento genético permitiu a identificação de duas amostras com mutação única, seis amostras com mutações duplas e uma amostra com mutação tripla, com um total de 17 mutações identificadas. Nenhum códon individual continha mais de 4 mutações. O gráfico 1 apresenta a distribuição dos tipos das 17 mutações encontradas nos éxons 5, 7 e 8. Apenas 2 das mutações ocorreram em códons do tipo "*hotspot*" de TP53 (códon 175, 245, 273 e 282, que são locais conhecidos onde ocorrem 20% das mutações em TP53 em todos os tipos de câncer). Mutações pontuais foram encontradas em oito pacientes e um paciente apresentou uma mutação do tipo inserção. As frequências das transversões de A:T para C:G ocorreram em 3 amostras, de A:T para T:A em 2 amostras, de G:C para C:G em 1 amostra e de G:C para T:A em 3 amostras. Transições de A:T para G:C ocorreram em 2 amostras, de G:C para A:T em CpG em 4 amostras e de G:C para A:T em uma amostra, a tabela 2 apresenta as mutações encontradas nas amostras.

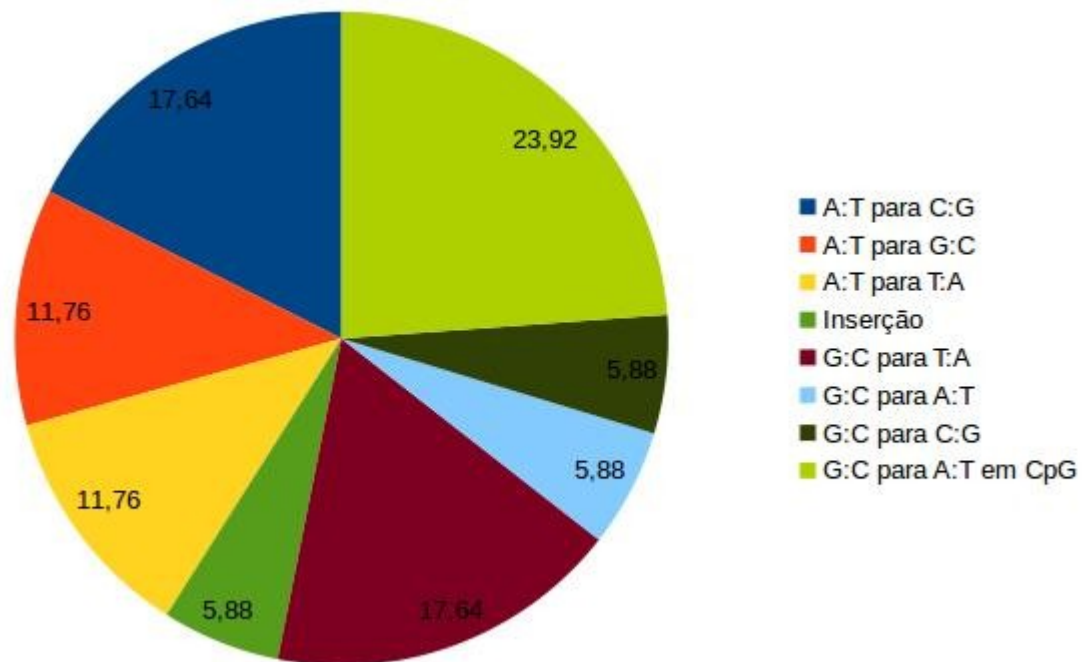


Gráfico 1: Distribuição em porcentagem das 17 mutações encontradas nos éxons 5, 7 e 8 no gene *TP53*. As mutações foram agrupadas em categorias definidas no banco de dados de mutações IARC TP53 (<http://www-p53.iarc.fr>). As mutações do tipo transversão são A:T para C:G, A:T para T:A, G:C para C:G e G:C para T:A. Mutações do tipo transição são A:T para G:C, G:C para A:T em CpG, e G:C para C:G.

Tabela 2 – Mutações encontradas nas amostras.

	Transversão	Transição	Inserção	Éxon
Amostra 1	A:C G:T	G:A em CpG	-	5
Amostra 2	A:T	-	-	5
Amostra 3	A:C	G:A em CpG	-	5
Amostra 4	G:C	G:A em CpG	-	5
Amostra 5	G:T	G:A em CpG	-	7
Amostra 6	A:C	A:G	-	7
Amostra 7	A:T	G:A	-	8
Amostra 8	G:T	A:G	-	8
Amostra 9	-	-	15 Nucleotídeos	8

## 6. DISCUSSÃO

O gene *TP53* é o gene supressor tumoral que mais frequentemente apresenta alterações genéticas em CEE. Estudos envolvendo sequenciamento genético em CEE demonstraram, em média, 83 mutações por tumor e cerca de 92% das mutações eram em *TP53* (AGRAWAL et al., 2012). Alterações em *TP53* foram identificadas nos primeiros eventos da carcinogênese esofágica e tem sido associadas com a progressão da doença e mau prognóstico (EGASHIRA et al., 2011). O CE apresenta prevalência de até 89% de mutações no gene *TP53* em regiões com alto risco para a doença, variando entre 42-70% em países como a China e sendo em torno de 34-38% no sul do Brasil (ABEDI-ARDEKANI et al., 2011; ROSSINI et al., 2009; PUTZ et al., 2002). No presente estudo observou-se uma prevalência de 18,36% de mutações no gene *TP53*, sendo menor em relação a outros trabalhos referentes a esse assunto, especialmente se comparada com os trabalhos brasileiros. Uma possível explicação para esta diferença pode ser decorrente do fato de nossa amostra ser muito menor do que dos estudos citados. No entanto os números obtidos estão de acordo com estudo realizado em nossa região que acessou as alterações do gene *TP53* através de imunohistoquímica, em pacientes alcoolistas e tabagistas onde a prevalência da expressão da proteína *p53* foi de 17% (FAGUNDES et al., 2001).

Em 2009, Rossini e colaboradores analisaram o perfil de mutação de 110 pacientes com CEE da região sudeste do Brasil, através das técnicas de PCR e sequenciamento dos éxons 5 ao 8 do gene *TP53*, relacionando as mutações com o consumo de álcool e tabaco. A prevalência de mutações foi de 34,5%, não ocorrendo associação entre a prevalência de mutação *TP53* e o consumo de cigarros, embora outros estudos revelaram que CEE em fumantes apresentou uma maior prevalência de mutações do que os não-fumantes, e que esta frequência foi diretamente associado com o número de cigarros consumidos (HAINAUT et al., 2001).

Em 2002, Putz e colaboradores analisaram 135 pacientes com CEE que viviam na região sul do Brasil, considerada de alto risco para CEE. Eles avaliaram a influência do estilo de vida (consumo de álcool, tabagismo e o consumo de chimarrão em altas temperaturas) e as mutações encontradas. Foi utilizada a avaliação imunohistoquímica e o sequenciamento do gene *TP53* para os éxons 5 ao 9. A prevalência do estudo foi de 34,8% e os autores concluíram que a exposição ao álcool e ao tabaco, acrescida do consumo de chimarrão podem ser responsáveis pelo padrão de mutação encontrada nessa população.

Em 2011 foi relatada a mais alta taxa de mutações no gene *TP53* em pacientes com CEE na província de Golestan, nordeste do Irã, local onde ocorrem as maiores incidência de CEE do mundo, com taxas superiores a 50 a cada 100 mil habitantes. As biópsias de 119 pacientes foram analisadas por sequenciamento direto, dos éxons 2 ao 11. O padrão de mutações heterogêneas encontradas foi altamente sugestivo da exposição a agentes cancerígenos ambientais, incluindo HAPs e o consumo de bebidas em altas temperaturas (ABEDI-ARDEKANI et al., 2011). Dois estudos anteriores ao caso de Golestan foram publicados em 2001, também na região do Irã, onde foram avaliados 74 pacientes com CCEE através de PCR e sequenciamento do gene *TP53* e os resultados indicam uma prevalência de 65%. Porém, a prevalência elevada não estava ligada diretamente ao consumo de álcool e tabaco, sendo que, mediadores da resposta inflamatória na mucosa do esôfago, provavelmente em conjunto com as práticas dietéticas ou culturais específicas no Irã (consumo de bebidas quentes), possam contribuir para o alto número de mutações do gene *TP53* em pacientes iranianos (BIRAMIJAIL et al., 2001).

Quanto aos tipos de mutações, as transições de G:C para A:T no dinucleotídeo CpG no gene *TP53* foram encontradas em 23,52% das amostras, podendo ser justificadas pelos processos inflamatórios aos quais a região do esôfago é acometida. Taxas mais elevadas dessa transição foram observadas em amostras de tumor esofágico a partir de áreas em que o consumo de bebidas quentes é considerado um importante fator de risco para câncer de esôfago (PUTZ et al., 2002). Putz e colaboradores publicaram um estudo, em 2002, com 135 pacientes com CEE, provenientes do Rio Grande do Sul onde se conclui que a formação de radicais livres durante o processo inflamatório pode ser responsáveis pelas transições de G:C>A:T encontradas no sul do Brasil.

Processos inflamatórios associados com irritação crônica da mucosa esofágica por hipertermia local podem estimular endogenamente a formação de espécies reativas de nitrogênio, tais como óxido nítrico e compostos N-nitrosos, induzindo a formação tumoral por meio da sua transformação em nitrito, que pode acarretar danos ao material genético, causando assim, uma lesão celular. O nitrito, que pode ser formado endogenamente, também provém das carnes curadas (conservadas com nitrito de sódio), embutidos e alguns vegetais (espinafre, batata, beterraba, alface, tomate, cenoura, nabo, couve-flor, repolho, rabanete, etc.) que contêm nitrato, o qual é transformado em nitrito pela ação da saliva (DE OLIVEIRA et al., 2015). Contudo, o sul do Brasil não é reconhecido por ser uma área onde as nitrosaminas representam um papel significativo na alimentação, sabendo-se que o CEE do sul do Brasil está relacionado ao consumo de chimarrão em altas temperaturas, onde a hipertermia pode



funcionar como fator endógeno do câncer de esôfago. A lesão térmica também pode prejudicar a função de barreira do epitélio esofágico, o que pode aumentar o risco de danos causados por exposição à carcinógenos, tais como HAP (ISLAMI et al., 2009). As temperaturas elevadas também poderiam acelerar a reação metabólica, incluindo aqueles com substâncias cancerígenas do tabaco e do álcool (LORIA et al., 2009).

As deficiências dietéticas podem enfraquecer o tecido esofágico devido à irritação constante, podendo atuar como um fator de predisposição para CE. Também tem sido documentado que o contato de líquido quente e alimentos com a mucosa esofágica podem aumentar refluxo gástrico, causando mais danos a partir de ácido gástrico (CHEN et al., 2015).

A transição G:C para A:T que ocorreu em um amostra na posição que não contém o dinucleotídeo CpG pode ser provocada por múltiplos mecanismos, sendo assim, é difícil ser atribuída a qualquer fator de risco ao qual o paciente foi exposto. Essa mutação está presente em pulmão de fumantes e pode formar benzopireno-7,8-diol e benzopireno-9,10-diol, que são metabólitos sintetizados pelo citocromo p450. No Brasil, segundo a base de dados IARC, 97,4% dos pacientes com CEE são fumantes. Na província de Golestan, no Irã, estudo demonstrou que 25,7% (16 pacientes com CEE) apresentaram transições G:C>A:T, sendo que a maior parte deles era fumante (ABEDI-ARDEKANI et al., 2011).

Em nosso estudo foram encontradas transversões G>T (G:C>T:A) em 3 amostras, sendo esse tipo de alteração genética conhecida como a 'assinatura molecular' de agentes mutagênicos do fumo de tabaco. Os HAPs presentes no cigarro podem produzir predominantemente esse tipo de mutação. Também já foi evidenciado um aumento na frequência da transversões de G>T em pacientes com câncer de pulmão que, eram fumantes, maior do que em pacientes não fumantes, sendo que essas transversões apareceram em diferentes tecidos nesses pacientes. A transversão G>T é bastante frequente em pacientes com câncer de pulmão, sendo também observada em áreas geográficas onde produtos alimentares estão contaminados com aflatoxinas (HAINAUT et al., 2001).

Segundo o banco de dados IARC, mutações do tipo A:T>T:A representam cerca de 5% das mutações do gene *TP53* em todos os tipos de câncer. Esse tipo de mutação é comum em CEE no sudeste do Brasil, onde o fator etiológico associado com CEE é predominantemente o consumo de álcool e tabaco. As mutações em A:T>T:A podem ser associadas com o acetaldeído, que é um composto orgânico encontrado em frutas maduras, pão, café, queijo e bebidas alcoólicas. O consumo frequente de bebidas alcoólicas está associado com um risco aumentado para CEE. O acetaldeído é conhecido como uma substância genotóxica e é

derivado da própria bebida, já que o álcool ingerido é absorvido a partir do trato gastrointestinal superior e transportado para o fígado, onde é metabolizado a acetaldeído, pela álcool desidrogenase 1B (ADH1B) (ROSSINI et al., 2010; OHASHI et al., 2015). Indivíduos que fazem uso excessivo de álcool e/ou cigarro podem apresentar deficiências nutricionais importantes, como por exemplo, o baixo consumo de frutas e verduras que são ricas em micronutrientes e protegem contra os processos carcinogênicos (WÜNSCH FILHO, 2013). Apesar desses dois fatores influenciarem a alta incidência de CEE no sul do Brasil, o consumo de chimarrão age como um fator de risco adicional que também exerce uma influência nas altas taxas de risco para CEE na região sul do Brasil, devido a lesão térmica causada pelo consumo em altas temperaturas dessa bebida e ao alto teor de carcinógenos (HAP) presentes (CHEN et al., 2015; LUBIN et al., 2014; FAGUNDES et al., 2006).

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

A prevalência de mutações no gene *TP53* em biópsias esofágicas em pacientes com CEE nos éxons 5 a 9 no presente estudo foi de 18,36%. Das nove amostras que apresentaram mutações, quatro amostras apresentaram mutação no éxon 5, duas amostras apresentaram mutação no éxon 7 e três amostras apresentaram mutação no éxon 8, sendo que nenhuma amostra apresentou mutação nos éxons 6 e 9.

O padrão de mutações encontrado foi heterogêneo, sendo a maioria transversões potencialmente atribuíveis a agentes cancerígenos ambientais e a maior parte em bases conhecidas como local de mutagênese por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Este é o primeiro estudo em nossa região que aborda as mutações em *TP53* em CEE avançado, quando as possibilidades terapêuticas são muito restritas. Como alterações em *TP53* são um evento precoce na carcinogênese esofágica, se abre a perspectiva de identificar estas mutações em indivíduos sob risco para CEE. Faz-se necessário obter um mapeamento amplo e conjunto destas alterações moleculares para predizer de forma adequada o papel das mesmas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABEDI-ARDEKANI, B. et al. **Extremely high Tp53 mutation load in esophageal squamous cell carcinoma in Golestan Province, Iran.** PLoS One, v. 6, n. 12, p. e29488, 2011.
- ABRÃO, M. G. et al. **Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1.** Arquivos Brasileiros de *Endocrinologia & Metabologia*. v. 49, n. 6, p.978-982, 2005.
- ACHATZ, M. I. A. D. S. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumenilike: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes.** Tese (Doutorado em Oncologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.
- AGRAWAL, N. et al. **Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.** Cancer discovery, v. 2, n. 10, p. 899-905, 2012.
- ARRUDA, J. T. et al. **Proteína p53 e o câncer: Controvérsias e esperanças.** Estudos, v. 35, n. 1, p. 123-141, 2008.
- BIRAMIJAMAL, F. et al. **Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran.** Cancer Research. v. 61, n. 7, p. 3119-3123, 2001.
- BOSETTI, C. et al. **Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe.** International journal of cancer, v. 122, n. 5, p. 1118-1129, 2008.
- CHEN, Y. et al. **Consumption of hot beverages and foods and the risk of esophageal cancer: a meta-analysis of observational studies.** BMC Cancer, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.
- DE OLIVEIRA, V. A. et al. **Relação entre consumo alimentar da população nordestina e o alto índice de câncer gástrico nesta região.** Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, 2015.
- DE OLIVEIRA-BORGES, E. C. et al. **O CÂNCER DE ESÔFAGO: uma revisão DOI: [http://dx. doi. org/10.5892/ruvrd. v13i1. 2471](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v13i1.2471).** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 13, n. 1, p. 773-790, 2015.
- EGASHIRA, A. et al. **Loss of p53 in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with survival: analyses of gene mutations, protein expression, and loss of heterozygosity in Japanese patients.** Journal of surgical oncology, v. 104, n. 2, p. 169-175, 2011.

FAGUNDES, R. B. et al. **p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk**

**of squamous cell carcinoma of the esophagus.** Diseases of the Esophagus. v. 14, n. 3-4,

p. 185-190, 2001.

FAGUNDES, R. B. et al. **Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil.** BMC Cancer. v. 6, n. 1, p. 139, 2006.

FAGUNDES, R. B. et al. **Prevalência do esôfago de Barrett na unidade de endoscopia digestiva de hospital de referência para a região central do Rio Grande do Sul.** GED gastroenterol. endosc. dig, v. 22, n. 6, p. 213-218, 2003.

FAGUNDES, R. B. et al. **Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil.** Diseases of the Esophagus, 2015.

FELIN, F. D. et al. **O cancer de esôfago sob o enfoque da biologia molecular.** Blucher Medical Proceedings. v. 1, n. 5, p. 36-36, 2014.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. **Câncer: uma doença genética.** Genética Escola, v. 3, n. 1, p. 4-7, 2009.

GREAVES, M.; CARLO C. **Clonal evolution in cancer.** Nature, v. 481, n. 7381, p. 306-313, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG R. A. **Hall marks of cancer: the next generation.** Cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAINAUT, P.; PFEIFER, G. P. **Patterns of p53 G→ T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke.** Carcinogenesis, v. 22, n. 3, p. 367-374, 2001.

HRSTKA, R.; COATES, P.; VOJTESEK, B. **Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment.** Journal of cellular and molecular medicine, v. 13, n. 3, p. 440-453, 2009

HOLLSTEIN, M. et al. **Analysis of TP53 mutation spectra reveals the fingerprint of the potent environmental carcinogen, aristolochic acid.** Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 753, n. 1, p. 41-49, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. In:INSTITUTO Nacional de câncer. Brasil: 2016. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> . Acessado em 2 de abril de 2016.

ISLAMI, F. et al. **Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study.** 2009.

JORDE, L. B. *Genética Médica*. 3ª ed:Ed. Guanabara; Rio de Janeiro. 2008.

KAMANGAR, F. et al. **High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks**. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 17, n. 5, p. 1262-1268, 2008.

KUWANO, H. et al. **Genetic Alterations in Esophageal Cancer**. *Surgery today*. v. 35, n. 1, p. 7-18, 2005.

LORIA, D. ; BARRIOS, E. ; ZANETTI, R. **Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations**. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 25, n. 6, p. 530-539, 2009.

LUBIN, Jay H. et al. **Mate drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies**. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 23, n. 1, p. 107-116, 2014.

MERLO, P. et al. **p53 prevents neurodegeneration by regulating synaptic genes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 50, p. 18055-18060, 2014.

MEYERSON, M. ; STACEY, G.; GETZ, G. **Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing**. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 10, p. 685-696, 2010.

NIK-ZAINAL, S. et al. **The genome as a record of environmental exposure**. *Mutagenesis*, p. gev073, 2015.

OHASHI, Shinya et al. **Recent advances from basic and clinical studies of esophageal squamous cell carcinoma**. *Gastroenterology*, v. 149, n. 7, p. 1700-1715, 2015.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. **TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use**. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 1, p. a001008, 2010.

Paz, M. F. C. J. et al. **Correlations between risk factors for prostate cancer: an epidemiological analysis**. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online*, v. 5, n. 6, p. 187-199, 2014.

PELIZZOLA, M. ; ECKER, J. R. **The DNA methylome**. *FEBS letters*, v. 585, n. 13, p. 1994-2000, 2011.

PENNATHUR, A., et al. **Oesophageal carcinoma**. *The Lancet*, v. 381, n. 9864, p. 400-412, 2013.

POHL, H.; WELCH, H. G. **The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence**. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 97, n. 2, p. 142-146, 2005.

PÜTZ, A. et al. **TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors.** International journal of cancer, v. 98, n. 1, p. 99-105, 2002.

QUEIROGA, R.C.; Pernambuco. A.P. **Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 52, n. 2, p. 173-178, 2006

RÊGO, M. A. V.; FONSECA, A. A. **Tendência da Mortalidade por Câncer de Esôfago na Cidade de Salvador e no Estado da Bahia, Brasil, 1980 a 2012.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 60, n. 1, p. 25-33, 2014.

ROSSINI, A. et al. **TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 696, n. 1, p. 10-15, 2010.

SEPEHR, A. et al. **Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran.** Oncogene, v. 20, n. 50, p. 7368-7374, 2001.

SERRANO, R. et al. **Oncogenes, tumor supressos genes, microRNA and tumor development.** Especial oncologia. v.71. n. esp. A2. P.4-10. 2014.

SILVA, T. G. **Crítérios morfológicos no esôfago de barrett,** Revista de Patologia do Tocantins. v. 1, n. 01, p. 02-13, 2014.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. **The cancer genome.** Nature, v. 458, n. 7239, p. 719-724, 2009.

TOMASETTI, C.; VOLGESTEIN, B. **Variation in cancer risk among tissues can be explained by number of stem cell divisions.** Science, v. 347, n. 6217, p. 78-81, 2015.

VOGELSTEIN, B. et al. **Cancer genome landscapes.** Science, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.

WANG, L. D. et al. **p53 protein accumulation and gene mutation in multifocal esophageal precancerous lesions from symptom free subjects in a high incidence area for esophageal carcinoma in Hennan., China.** Cancer, v. 77, n. 7, p. 1244-1249, 1996.

Wang X. **P53 regulation: Teamwork between ring domains of mdm2 and mdmx.** Cell Cycle, v. 10, n. 24, p. 4225-4229, 2011

WEI, W. et al. **Expression of TP53, BCL-2, and VEGFA Genes in Esophagus Carcinoma and its Biological Significance.** Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, v. 21, p. 3016, 2015.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. **p53 polymorphisms: cancer implications.** Nature Reviews Cancer, v. 9, n. 2, p. 95-107, 2009.

WÜNSCH FILHO, V. **Consumo de bebidas alcoólicas e risco de câncer.** Revista USP, n. 96, p. 37-46, 2013.

WU, V. C. et al. **Association Between Smoking and p53 Mutation in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: A Meta-analysis.** *Clinical Oncology*, v. 27, n. 6, p. 337-344, 2015.

XIMENES NETTO, M; FERNANDES FILHO, R; BRITO, F. Câncer de Esôfago. In: SBCT. (Org.). In: *Tópicos de Atualização em Cirurgia Torácica*. 1ed.: FMO, 2011, v. 1, p. 474-487. Disponível em: <[http://www.sbct.org.br/pdf/livro\\_virtual/cancer\\_de\\_esofago.pdf](http://www.sbct.org.br/pdf/livro_virtual/cancer_de_esofago.pdf)>. Acesso em: 02 jun., 2015

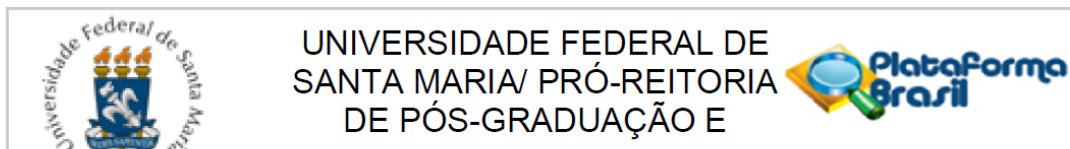
YAMASHITA, Y. et al. **Human papillomavirus infection and immunohistochemical expression of cell cycle proteins pRb, p53, and p16INK4a in sinonasal diseases.** *Infectious agents and cancer*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2015.

YAO, W. et al. **Association of p53 expression with prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* v. 7, n. 10, p. 7158-7163, 2014.



## **9. ANEXOS**

**Anexo A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFSM).**



Continuação do Parecer: 1.499.578

de células escamosas é o mais frequente. O tabagismo e o consumo de álcool são os principais fatores de risco para o CCEE.

Pesquisas mostram que o ciclo celular é controlado através de duas vias principais, a p53 (p14- MDM2-p53-p21) e pRb (p16-ciclina-D1-PRB), e que perdas de função nestas vias desempenham papel importante no desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos.

As mutações somáticas no gene Tp53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, fazendo deste gene o mais comumente alterado nas lesões neoplásicas. As mutações no gene Tp53 ocorrem em mais de 50 tipos diferentes de tumores, incluindo os de bexiga, cérebro, mama, cerviça, esôfago, laringe, fígado, pele, estômago, cólon, ovário, pâncreas, próstata e tireoide.

O gene supressor tumoral Tp53 é um fator de transcrição de ligação específico de uma sequência de DNA que age como principal controlador celular de crescimento e divisão. Células normais expressam baixa concentração dessa proteína nuclear em forma inativa; entretanto, em resposta a uma ampla variedade de estresse celular, tais como danos ao DNA, hipóxia ou depleção de grupos de ribonucleosídeos-trisfosfato o Tp53 é ativado e expressa sua proteína determinando a interrupção do ciclo celular para reparo do DNA, ou encaminhar a célula com danos irreparáveis para apoptose.

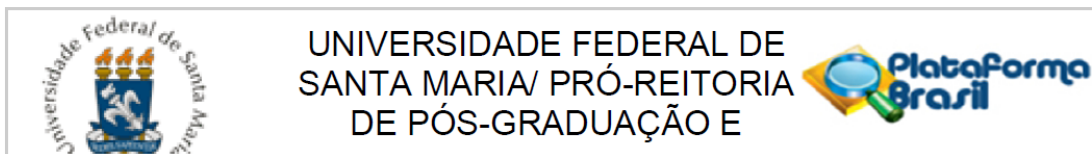
A hipótese do trabalho é portanto, que o gene Tp53 está alterado na mucosa esofágica dos pacientes com CCEE e não apresenta alterações nos indivíduos sem a doença.

#### Metodologia

Para este estudo será utilizado delineamento transversal onde o fator em estudo é a mucosa esofágica de pacientes com e sem Carcinoma Epidermóide Esofágico e o desfecho considerado serão as mutações do gene TP53.

As amostras de pacientes não identificados com câncer esofágico são de propriedade do Prof. Dr. Renato Borges Fagundes, que foram coletadas ao longo de 10 anos e armazenadas em blocos de parafina. Serão estudadas 100 biópsias esofágicas (50 com CEE e 50 de mucosas normais em pacientes sem fator de risco para CEE).

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.499.578

Esse material é descrito como excedente dos procedimentos e foi armazenado em parafina por ser de fácil transporte e armazenamento.

Será realizada a extração do DNA e os fragmentos de DNA serão analisados por mutações no gene TP53.

Critério de inclusão: serão incluídos no estudo amostras de pacientes não identificados que apresentam carcinoma epidermóide de esôfago e também amostras de pacientes não identificados que não apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago.

Não estão descritos os critérios de exclusão.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo: investigar a frequência de alterações no gene Tp53 na mucosa esofágica de pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago.

Objetivo secundário da pesquisa:

- 1- Selecionar pacientes diagnosticados com CEE;
- 2 - Detectar a alteração do gene p53;
- 3 - Confirmar, através de sequenciamento genético a mutação do gene p53.

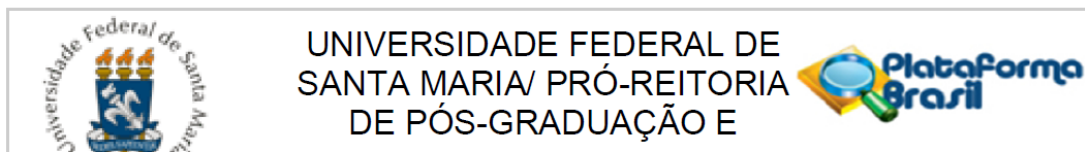
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Tendo-se em vista a quase ausência de risco à que os pacientes serão submetidos dado não haver abordagem direta dos pesquisadores aos participantes da pesquisa que serão incluídos no estudo, os pesquisadores propõem a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Apresentam um Termo de Confidencialidade que garante o anonimato dos participantes no manejo dos dados.

Os riscos são descritos como mínimos e os benefícios são informados.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.499.578

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto apresentado está adequadamente redigido. A declaração sobre divulgação dos resultados, a garantia da confidencialidade e o destino dos dados e a não identificação dos sujeitos de pesquisa foram apresentados.

A forma de obtenção dos dados e seleção da amostra estão descritas no projeto, bem como todos os procedimentos que serão realizados durante a pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos foram apresentados e adequadamente redigidos.

Foram apresentados os seguintes documentos: projeto, registro na UFSM, autorização institucional, folha de rosto/Conep, registro na Conep, solicitação de dispensa de TCLE e termo de confidencialidade.

**Recomendações:**

Recomenda-se que o documento de solicitação de Dispensa de TCLE seja assinado pela pesquisadora principal que coordena o estudo, e não apenas pelo pesquisador que doou o material biológico para avaliação.

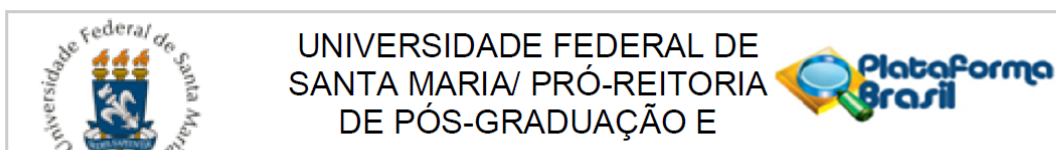
Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto apresentado está adequado. Este comitê autoriza, nos termos da resolução 441/2011, art. 15, do Conselho Nacional de Saúde, a partir da apresentação pelo pesquisador da justificativa, a dispensa da apresentação de TCLE e considera que preenche todos os requisitos de apresentação obrigatória exigidos pela resolução 466/2012.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

<b>Endereço:</b> Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar	
<b>Bairro:</b> Camobi	<b>CEP:</b> 97.105-970
<b>UF:</b> RS	<b>Município:</b> SANTA MARIA
<b>Telefone:</b> (55)3220-9362	<b>E-mail:</b> cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.499.578

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_492607.pdf	31/03/2016 10:18:27		Aceito
Outros	confidencialidade.pdf	31/03/2016 10:18:00	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_TCLE.pdf	31/03/2016 10:17:25	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	01/03/2016 21:14:12	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito
Outros	Autorizacao.jpg	01/03/2016 21:12:21	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	11/11/2015 11:42:42	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito
Outros	Comprovante_GAP.jpeg	05/11/2015 10:12:21	MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 14 de Abril de 2016

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

