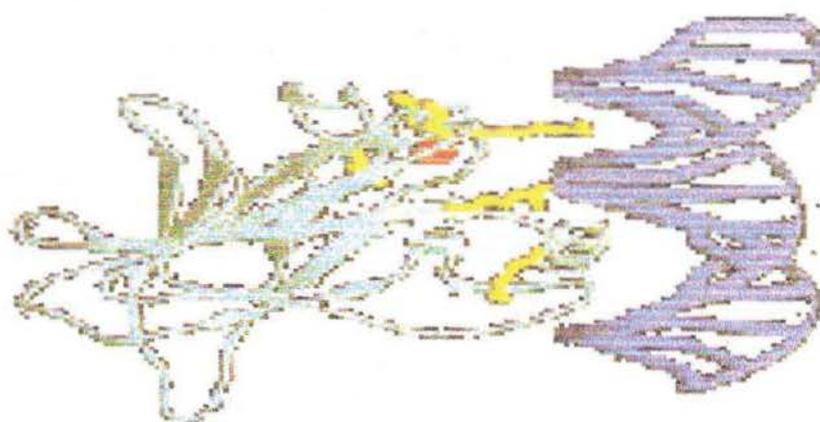


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS
R213R E 13494 g->a
DO GENE P53 EM INDIVÍDUOS COM
ALTERAÇÃO ESOFÁGICA COMPARADOS COM
UM GRUPO CONTROLE**



Patrícia Luciana da Costa Lopez

**Orientação: Prof^o Dr. Roberto Giugliani
Co-Orientação: Prof^a Dra. Sandra Leistner-Segal**

**Trabalho apresentado como Conclusão de Curso para a obtenção
do título de Bacharel na área Molecular, Celular e Funcional do
Curso de Ciências Biológicas**

Porto Alegre, 2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Isabel e Marcelo; à memória de minha querida avó Guanair ; e à toda família Costa que sempre acreditou em mim.

Agradeço a todo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Dr. Roberto Giugliani e em especial a Dra. Sandra Leistner-Segal que me abriram as portas para a realização deste trabalho.

Aos delirantes colegas do Laboratório de Biologia Molecular, principalmente à Luciane, Karina, Bianca e Diogo.

Às minhas amigas Tatiana, Gislene e Cristina que entre tantos outros me estimularam a seguir sempre em busca dos porquês.

SUMÁRIO

Introdução	4
Objetivos	8
Material e Métodos	9
Resultados	14
Discussão	19
Referências bibliográficas	22
Anexo	24

INTRODUÇÃO

A proteína p53 vem sendo estudada há 25 anos e desde então tem se constatado sua importância no reparo a danos no DNA, garantindo a sobrevivência da célula; mais que isso, impedindo que células com danos muito graves continuem se proliferando e gerando malefícios maiores a todo organismo ¹.

Ainda não se sabe ao certo o mecanismo que essa fosfoproteína nuclear de 53kDa utiliza para regular o ciclo celular entre as fases G1 e S, e promover eventos de check points e de indução de apoptose ou morte celular programada. A proteína p53 se liga ao DNA de maneira específica, podendo estar envolvida direta ou indiretamente na regulação da replicação do DNA, ativação de genes e podendo ser ainda um fator de transcrição. Como fator de transcrição, esta proteína (p53) ativa outras rotas que envolvem por exemplo p21, p27, BRCA 1, entre outras proteínas, mostrando que esta é uma das proteínas-chave do ciclo celular ^{2,3}.

O gene TP53 está localizado no cromossomo 17p13, tem em torno de 20kb e é herdado de forma autossômica dominante. Seu papel como Supressor Tumoral vem sendo descrito em mais da metade dos cânceres humanos se encontra uma alteração em p53. Em células normais o gene TP53 é expresso em níveis basais, sendo observado maior expressão em células tumorais. ^{4,5}.

As mutações no gene parecem ocorrer antes da fase de progressão na evolução clonal celular, sendo anterior a neoplasia. A maioria dessas mutações são "missense", ou seja, levam a substituição de um aminoácido por outro, podendo alterar a conformação, especificidade de seqüência de ligação ao DNA e sua função como fator de transcrição ⁶. Na maioria dos casos de mutação recessiva em um indivíduo heterozigoto as células tumorais podem conservar apenas o alelo mutado e perder o alelo selvagem, o que caracteriza perda de heterozigosidade no tumor. Esse evento é bastante comum entre os cânceres humanos como conseqüência da perda de material cromossômico, sendo um indício de progressão tumoral. Dessa forma, o tecido tumoral pode ser comparado com o sangue periférico que irá apresentar ambos alelos (selvagem e alterado), sendo esta mais uma forma de observar alterações na proteína p53 em tecidos alterados ⁷.

Além de mutações associadas ao câncer, vários polimorfismos têm sido descritos localizados tanto em regiões codificantes quanto em não-codificantes do gene ⁸. Estudos indicam que alelos polimórficos preferenciais do gene podem estar envolvidos na suscetibilidade e predisposição ao câncer, sendo possível identificá-los pelo uso de enzimas de restrição ^{7,9,10}.

Na progressão maligna do Esôfago de Barrett, são encontradas anormalidades cromossômicas e instabilidade genômica, perdas alélicas do gene TP53 além do aumento da expressão desse gene. Esôfago de Barrett é uma complicação da doença do refluxo gastroesofágico, que sendo também uma desordem pré-maligna, pode levar ao desenvolvimento de adenocarcinoma em 10% dos casos. A alteração histológica observada é a troca do epitélio escamoso estratificado por epitélio colunar especializado,

diagnosticado rotineiramente por endoscopia e biópsia do esôfago ^{11,12,13}. Visto que a maioria dos pacientes com Esôfago de Barrett é assintomática (o número de casos pode ser vinte vezes maior), e que esta é a neoplasia que vem aumentando com maior frequência na população, tem se buscando a identificação de pacientes com Esôfago de Barrett com alto risco de desenvolver adenocarcinoma através do prognóstico molecular usando o gene TP53 como marcador ¹⁴.

O polimorfismo do códon 72, localizado no éxon 4, codifica arginina (CGC) e prolina (CCC) em alelos funcionalmente iguais. Esse polimorfismo é bastante estudado quanto à correlação com desenvolvimento de câncer, sendo encontradas correlações do polimorfismo a câncer de esôfago associado a HPV, câncer de bexiga e câncer cervical ^{10,15}. Em um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, comparou-se pela primeira vez o polimorfismo do códon 72 com amostras de pacientes portadores de Esôfago de Barrett (comunicação pessoal). Não foi encontrada diferença significativa com os controles utilizados neste estudo. No entanto foi detectado entre os pacientes perda de heterozigosidade e instabilidade genômica.

A maioria dos polimorfismos encontrados no gene TP53 humano está localizada em íntrons, fora da região consenso de sítios de splicing. São 19 polimorfismos descritos, sendo que 6 são descritos em éxons e 12 em íntrons. O polimorfismo do códon 213, localizado no éxon 6 ¹⁶ e o polimorfismo 13494g->a no intron 6 ¹⁷, analisados neste trabalho, são pouco encontrados na literatura, sem ainda uma frequência estimada na população brasileira ⁸. O polimorfismo R213R, mantém o aminoácido arginina sendo o códon mais freqüente corresponde a CGA e o polimórfico CGG. O

polimorfismo na região 13494 do intron 6 trás uma adenina no lugar de guanina. Para ambos não foram encontradas quaisquer diferenças fenotípicas.

Segundo dados do IARC (International Agency for Research on Câncer), o tipo de câncer que apresenta com mais freqüência mutações somáticas no gene TP53 é o câncer de esôfago ⁸. Em alguns estudos em câncer de esôfago se encontra maior prevalência de mutações nos éxons 5-8 ¹⁸, e Vos aponta uma freqüência maior de polimorfismos justamente nessa região. Os éxons 5 a 8 codificam o domínio de ligação da proteína p53 com o DNA ¹⁹.

A maioria dos estudos faz uso de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) como método principal de análise dessa região. Esta técnica está sujeita tanto a resultados falso positivos quanto falso negativos, e assim, deve ser considerada uma técnica de triagem e, sempre confirmada por seqüenciamento ou digestão com enzimas de restrição ¹⁸. Dessa forma se faz necessária a padronização de técnicas que facilitem a identificação desses polimorfismos, principalmente nessa região entre os éxons 5 e 8, bem como o estabelecimento das freqüências encontradas em nossa população e em grupos de indivíduos com diferentes tipos de câncer.

OBJETIVOS

- Padronizar a técnica de amplificação dos 4 éxons do domínio central da proteína P53 em um só produto de PCR;
- Padronizar a identificação dos polimorfismos R213R e 13494g→a no éxon 6 e intron 6 respectivamente do gene TP53;
- Estimar a frequência desses polimorfismos numa população controle que representa a população do sul do Brasil;
- Verificar se há associação dos polimorfismos identificados com alterações no tecido esofágico e Esôfago de Barrett;
- Verificar a ocorrência de perda de heterozigosidade nas amostras de tecidos alterados de esôfago quando comparado com tecido normal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras da População

As 100 amostras de DNA utilizadas como controle provém de doadores do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Essas amostras de DNA foram incluídas de forma aleatória e mantidas em freezer a temperatura de -20°C.

Amostras de Pacientes com alterações esofágicas / Esôfago de Barrett

Entre os pacientes foram incluídos indivíduos que são portadores de alterações no tecido esofágico diagnosticados através de Endoscopia Digestiva Alta e biópsia. Neste grupo havia 13 pacientes com Esôfago de Barrett, e o restante apresentava alterações como hérnia hiatal e inflamações crônicas discreta e moderada; num total de 45 indivíduos. Estes pacientes realizam os exames de acompanhamento das alterações esofágicas periodicamente, o que tornará possível re-analisar os resultados deste trabalho de acordo com a progressão do quadro clínico.

Os exames foram realizados pelo Gastroenterologista Dr. Fábio Segal, no Hospital Moinhos de Vento. Os pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Informado (Anexo 1).

Extração de DNA

As amostras de pacientes e indivíduos controles tiveram DNA extraído de 10mL de sangue periférico em EDTA através da técnica de precipitação por sais descrito por Miller et al., 1988²⁰.

O DNA extraído das amostras de tecido esofágico dos pacientes também foi realizado através da técnica modificada de Muller et al., 1988²⁰.

PCR Longo dos éxons 5 ao 8:

Neste trabalho foi realizada a Padronização da Técnica de PCR Longo envolvendo os éxons 5 ao 8 do gene TP53. Para isso foram utilizados *primers* 5forward (upstream ao éxon 5) e 8 reverse (downstream ao éxon 8) de acordo com Segal et al., 2004, conforme descrito anteriormente²¹.

O PCR foi realizado com 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen life technologies®); 5µL de tampão da enzima (Tris-HCl 200mM, KCl 500mM); 5 µL de dNTP 0,2 mM (Invitrogen life technologies®); 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1,0 µL de *primers* específicos na concentração de 20 picomóis para um volume final da reação de 50 µL.

Em termociclador utilizou-se o programa com desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à temperatura de 94°C de desnaturação; temperatura de anelamento de 59°C; 72°C de extensão e extensão final de 72°C por 10 minutos.

A amplificação resulta num fragmento de 1619 pb que é visualizado pela eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio.

Digestão

Polimorfismo R213R (Éxon 6):

Para identificação do polimorfismo R213R do éxon 6 foi realizada a digestão do produto de PCR longo com a enzima *Taq I* (New England BioLabs®) que cliva o sítio TCGA, conforme instruções do fabricante. Foram utilizados na digestão 10 µL do produto de PCR num volume final de 30 µL. A reação foi mantida a 65°C em programa de termociclador por 2 horas e 30 minutos. Os sítios de clivagem da enzima *Taq I* no produto de PCR estão representados na Figura 1.

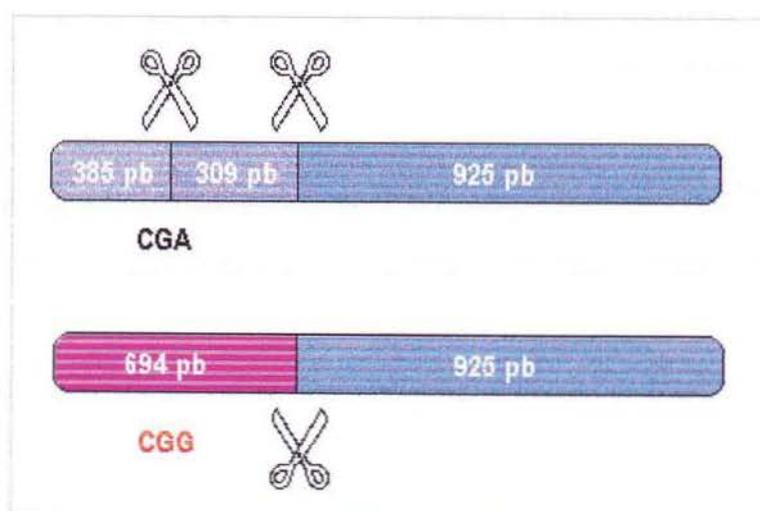


Figura 1: Representação esquemática da digestão do produto de PCR pela enzima *Taq I*.

Polimorfismo 13494 (Intron 6):

A identificação deste polimorfismo foi feita através da digestão do produto de PCR longo pela enzima *Msp I* (NEB®) que cliva sítios C'CGG conforme instrução do fabricante. Foram utilizados 10 µL do produto de PCR e 2U da enzima *Msp I*, em volume final de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C em banho seco.

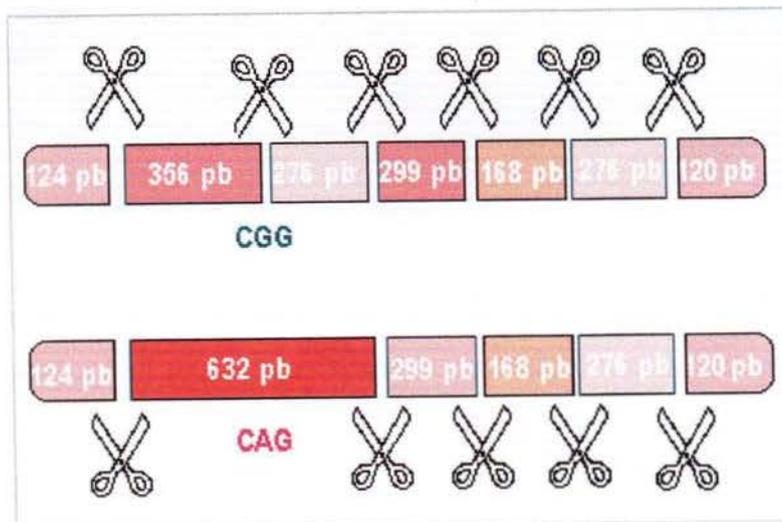


Figura 2: Esquematização da digestão do produto de PCR pela enzima *Msp I*.

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

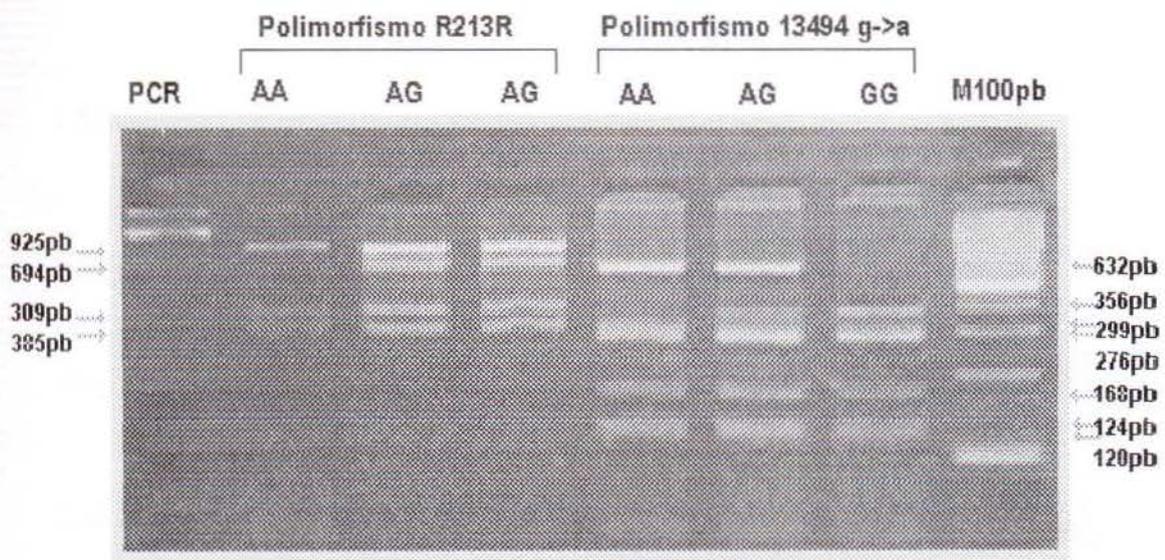


Figura 3: Foto de gel de agarose na concentração 3%. O primeiro poço contém o PCR não digerido de ~1,6kb, seguido de 3 digestões com *Taq* I, 3 digestões com *Msp* I e marcador de peso molecular de 100pb.

RESULTADOS

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR LONGO

A metodologia apresentada se mostrou adequada na amplificação de um segmento relativamente longo que envolveu 4 éxons importantes na função da proteína p53.

IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO R213R (EXON 6)

Entre as amostras controles se observou uma predominância do alelo A, não sendo encontrado homozigose do alelo polimórfico (G). Este foi apenas encontrado em heterozigose em um indivíduo, conforme Tabela 1.

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

Grupo	Genótipo			Alelo	
	AA	AG	GG	A	G
Controles (n=100)	96 (0,960)	4 (0,040)	0 (0,00)	196 (0,980)	4 (0,02)
Pacientes (n=36)	35 (0,972)	1 (0,028)	0 (0,00)	71 (0,986)	1 (0,014)

Esses resultados foram comparados com dados na literatura de uma população de origem turca²², e não se observou diferença significativa entre as freqüências do alelo polimórfico (Teste X^2 de Heterogeneidade, $X^2_{cal}=0,23 < X^2_{0,05;1}=3,84$). Comparando com uma população americana também não foi encontrada diferença significativa, nem mesmo quando comparadas

Esses resultados foram comparados com dados na literatura de uma população de origem turca ²²(Nejat, 1996), e não se observou diferença significativa entre as freqüências do alelo polimórfico (Teste χ^2 de Heterogeneidade, $\chi^2_{\text{cal}}=0,23 < \chi^2_{0,05;1}=3,84$). Comparando com uma população americana também não foi encontrada diferença significativa, nem mesmo quando comparadas com as subpopulações de Afro-americanos, Caucasianos, Hispânicos e da Costa do Pacífico dentro desse mesmo estudo ($p < 0,05$) ²³.

Entre os pacientes as freqüências encontradas para os dois polimorfismos foram bastante semelhantes ao encontrado na população controle, sem diferença significativa (Teste χ^2 de Heterogeneidade, $\chi^2_{\text{cal}}=0,11 < \chi^2_{0,05;1}=3,84$). O alelo polimórfico R213R também ocorreu apenas uma vez em heterozigose, conforme Tabela 1.

IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO 13494 G→A (INTRON 6)

A distribuição do alelo polimórfico (A) foi maior entre os indivíduos controles da amostra se comparado com o polimorfismo R213R. O genótipo predominante foi do alelo selvagem, 70%, enquanto 25% dos indivíduos eram heterozigotos (Tabela 2).

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

Grupo	Genótipo			Alelo	
	AA	AG	GG	A	G
Controles (n=100)	4 (0,040)	25 (0,250)	71 (0,710)	33 (0,165)	167 (0,835)
Pacientes (n=45)	00 (0,000)	12 (0,267)	33 (0,733)	12 (0,133)	78 (0,867)

Sobrepondo as frequências encontradas em nossa população com os dados da população de origem turca houve diferença significativa (Teste χ^2 de Heterogeneidade, $\chi^2_{\text{cal}}=7,72 > \chi^2_{0,05;1}=3,84$). A população de origem turca analisada no estudo de Nejat obteve frequência 0,3 de alelos polimórficos, diferindo dos achados deste trabalho que encontrou 0,165.

Da mesma forma o polimorfismo do intron 6 não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo de pacientes (Teste χ^2 de Heterogeneidade, $\chi^2_{\text{cal}}=0,28 < \chi^2_{0,05;1}=3,84$). Entre os pacientes não se encontrou nenhum genótipo homocigoto para o polimorfismo, apenas um heterocigoto. No Gráfico 1 está representado todo o comparativo entre o grupo controle e o grupo de pacientes com alterações esofágicas.

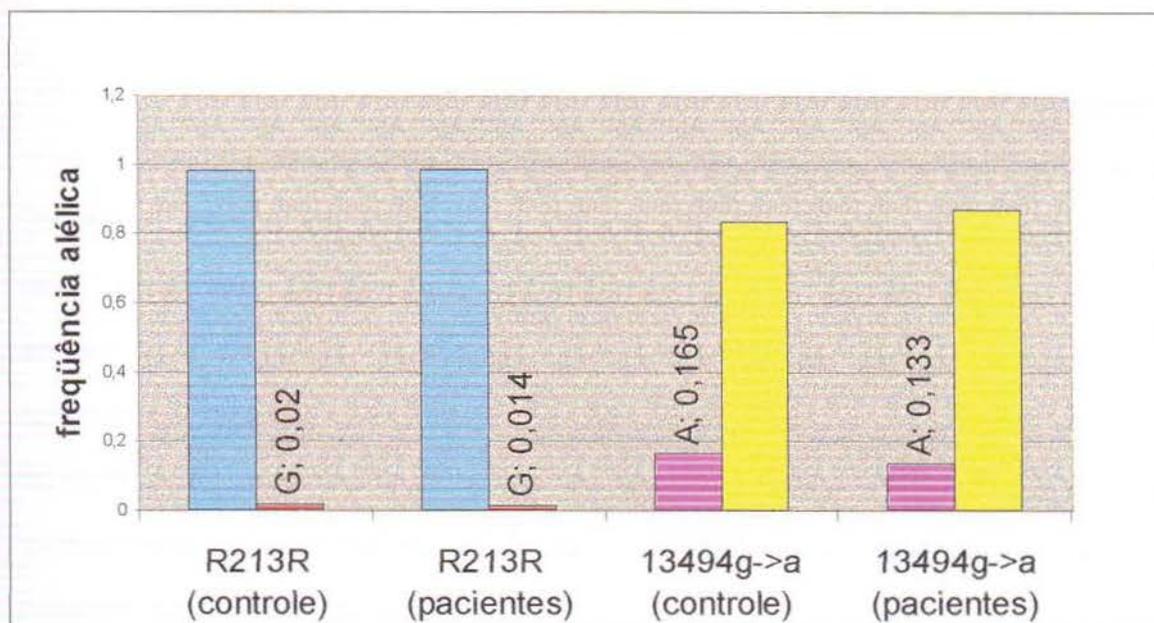


Gráfico 1: Frequência dos polimorfismos em controles e pacientes

As frequências encontradas entre os pacientes quando comparadas com os indivíduos controles não apresentaram diferença significativa (Teste χ^2 de Heterogeneidade, $\chi^2_{cal}=0,11 < \chi^2_{0,05;1}=3,84$ para o polimorfismo R213R; e $\chi^2_{cal}=0,28 < \chi^2_{0,05;1}=3,84$). Isso nos indica que possivelmente não exista correlação entre os polimorfismos identificados e alterações esofágicas, ou não foi significativo para essa amostra.

PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (LOH)

Foram analisados 20 pares de amostras sangue e tecido dos pacientes para o polimorfismo 13494g->a, e 19 para o polimorfismo R213R. Dentro dessa análise, são avaliados somente os indivíduos heterozigotos, que no grupo de pacientes representou uma frequência de 0,45 do polimorfismo do intron 6, e somente um indivíduo heterozigoto (5,3%) para o polimorfismo do éxon 6.

Em dois pacientes se encontrou perda de heteroziguidade do polimorfismo do intron 6, mas nenhum para o polimorfismo do éxon 6. O alelo polimórfico presente na amostra de sangue periférico não foi mantido no tecido desses dois pacientes, confirmando o estresse desse tecido, mesmo com a preservação do alelo selvagem. Interessantemente, um desses pacientes apresentou displasia no seu tecido esofágico, sendo um portador de Esôfago de Barrett. O outro paciente em que se encontrou perda de heteroziguidade não apresentava no momento da coleta de tecido alterações que caracterizasse a condição de Esôfago de Barrett.

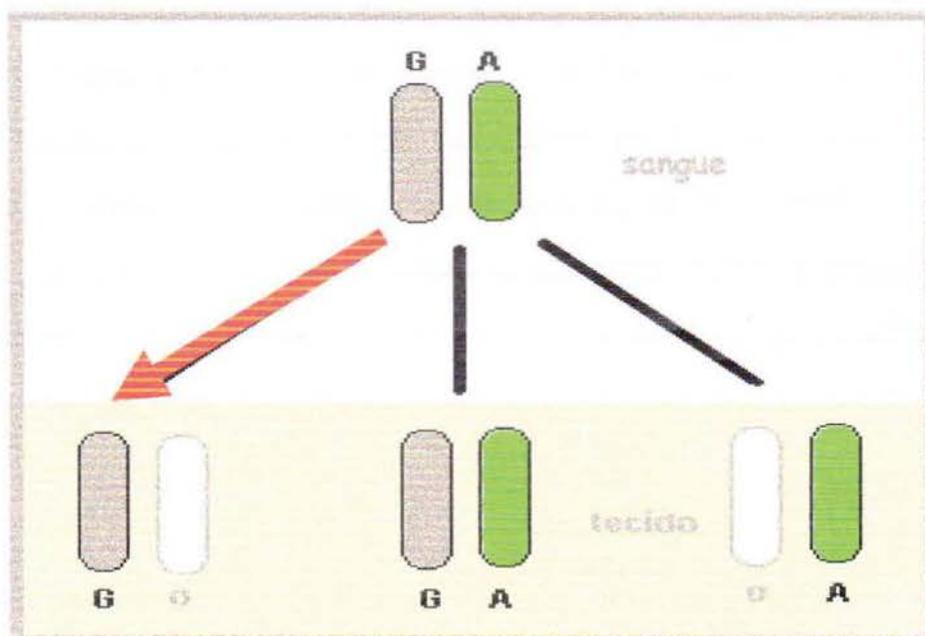


Figura 4: Representação de perda de heteroziguidade. Os bastões cinza representam o alelo selvagem(G) para o polimorfismo 13494g->a, e os verdes os alelos polimórficos (A). Nos dois casos encontrados neste estudo é possível que tenha ocorrido à perda do alelo polimórfico, se tornando G0, conforme destacado na seta.

DISCUSSÃO

A padronização da técnica de PCR Longo foi importante desde o início do trabalho principalmente na redução de custos, visto que utilizando apenas um produto de PCR tornou possível identificar polimorfismos que estão contidos nessa região amplificada (entre os éxons 5 e 8).

Em um estudo de uma população de origem turca se verificou a presença do alelo polimórfico do intron 6 em 30% da amostra de indivíduos saudáveis²². Isso pode indicar uma característica da população turca, sendo interessantes aguardarmos novos estudos que informem as frequências de câncer nessa população. Em outros estudos viu-se ainda que há uma pronunciada variação étnica em populações de origem chinesa e africana, sendo a primeira com menor frequência do alelo polimórfico^{6,22,24}. Em nossos estudos, não tivemos a intenção de estratificar os grupos amostrais em etnias, visto que o nosso objetivo foi o de buscar alguma associação dos polimorfismos com situação de uma enfermidade com potencial de levar ao câncer.

Os polimorfismos do intron e éxon 6 não apresentaram frequências significativamente diferente das amostras controle, o que nos leva a inferir que não há correlação entre esses polimorfismos e alterações esofágicas e Esôfago de Barrett. Sendo esse o primeiro estudo que correlaciona os dois polimorfismos do éxon 6 e intron 6 com as enfermidades esofágicas se faz necessário outros estudos comparando com outros cânceres. Além disso, com o acompanhamento dos pacientes da amostra controle será possível no futuro re-analisarmos este mesmo trabalho de acordo com a evolução ou não do Esôfago de Barrett e adenocarcinoma entre esses indivíduos.

As perdas de heterozigidade legitimam a instabilidade genômica em um câncer, além de ser um estímulo para o entendimento dos processos de reparo do DNA nos eventos de replicação e recombinação, por exemplo ²⁵(Thiagaligam, 2002). A perda alélica associada a carcinogênese de esôfago foi constatada por Kawaguchi em 2000 para o polimorfismo do códon 72, um importante *hotspot* do gene TP53. Em outro estudo de perda de heterozigidade no cromossomo 17 o gene TP53 se mostrou ser importante na evolução clonal de adenocarcinoma de Esôfago de Barrett ^{15,26}. Dessa forma, a perda alélica sendo um importante indício de progressão tumoral pode ser adotado como um marcador do prognóstico para doenças como o Esôfago de Barrett. E poderá também interferir na escolha do melhor tratamento dos pacientes e de terapias adjuvantes.

Os dois casos encontrados de perda de heterozigidade localizados no intron 6 reforçam os dados da literatura desses eventos estarem presentes em tecidos alterados, e também realça a presença desses eventos dentro da região não codificadora em que cada vez menos os pesquisadores se arriscam a chamar de "DNA lixo". Ao contrário, alterações nessa região "lixo" podem alterar o fenótipo da proteína a ser codificada e tem grande utilidade na compreensão da expressão gênica ²⁷.

Ainda não foram realizados os seqüenciamentos dos casos de perda de heterozigidade para afirmarmos a razão para a enzima *Msp I* não ter reconhecido o sítio CCGG. É provável que tenha ocorrido mutação no tecido, sendo uma transição a->g num raro pareamento AC, seguido de um erro do sistema de reparo que teria possibilitado um novo pareamento GC.

Já era esperado que houvesse menor proporção do polimorfismo no éxon 6, visto que a seqüência codificadora é mais conservada que a região intrônica. Principalmente porque a região em que esse polimorfismo se encontra representa uma região de grande importância para a atividade da proteína p53. A presença maior do polimorfismo encontrada no intron 6, e a presença de perda de heterozigosidade, não representa menor importância da região não codificadora.

Kawaguchi encontrou correlação entre o polimorfismo do códon 72 e pacientes com câncer de esôfago associado a HPV ¹⁵. (kawaguchi, 2000). Embora este estudo não tenha encontrado diferença entre controles e pacientes, não consta na literatura a averiguação dos polimorfismos R213R e 13494 g->a em pacientes com alterações esofágicas e Esôfago de Barrett.

No caso da proteína p53 a detecção de polimorfismos se torna bastante interessante se considerarmos que a esta proteína é atribuída funções de grande importância ao ciclo de vida da célula regulando e sendo regulada por várias proteínas de forma ainda pouco compreendida. O estudo de polimorfismos dentro do gene TP53 só tem a elucidar parte do comportamento da proteína bem como a propensão ao desenvolvimento a determinados tipos de câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hofseth, L.J., Hussain, S.P., Harris, C.C. p53: 25 years after its discovery. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2004; 25(4): 177-181.
2. Mukhopadhyay, T. Detection of Mutations in Tumor Suppressor Genes. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1995; 8:170-181.
3. Lewin B., *Genes VII*, 862 p., Oxford University Press, 2000.
4. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. The p53 suppressor gene. *Nature* 1991 351: 453-456.
5. Soussi, T. The p53 tumor suppressor: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Molecular Medicine Today* 1996: January:32-37.
6. Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, A., Holmberg, P.A., Kivela, A., Beckman, L. Is Polymorphism Maintained by Natural Selection? *Hum Hered* 1994; 44:266-270.
7. Baccouche, S., Malbrouk, I., Said, S., Mosbah, A., Jlidi, R., Gargouri, A. A more accurate detection of codon 72 polymorphism and LOH of the TP53 gene. *Cancer Letters* 2003: 189:91-96.
8. IARC Homepage - International Agency for Research on Cancer - p53 polymorphisms - www.iarc.fr/P53/index.html (23/05/2004)
9. Olschwang, S., Laurent-Puig, P., Vassal, A., Salmon, R, Thomas, G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet* 1991; 86: 369-370.
10. Soulitzis, N., Sourvinos, G., Dokianakis, D.N., Spandios, D.A. p53 codon 72 polymorphism and association with bladder cancer. *Cancer Letters* 2002; 179: 175-183.
11. Shaheen, N., Ransohoff, D. Gastroesophageal Reflux, Barrett Esophagus, and Esophageal Cancer. *JAMA* 2002 April; 287(15):1972-1981.
12. Haggitt, R.C., Reid, B.J., Rabinovitch, P.S., Rubin, C.E. Barrett's esophagus: Correlation between mucin histochemistry, flow and histologic diagnosis for predicting increased cancer risk. *Am J Pathol* 1988; 131(1):53-61.
13. Thompson, J.J., Zinsser, K.R., Enterline, H.T. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983; 14: 42-61.
14. Cameron, A.J., Zinsmeister, A.R., Ballard, D.J., Carney, J.A. Prevalence of columnar-lined (Barrett) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol* 1990; 99:918-22.
15. Kawaguchi, H., Ohno, S., Araki, K., Miyzaki, M., Saeki, H., Watanabe, M., Tanaka, S., Sugimachi, K. p53 Polymorphism in Human Papillomavirus-associated Esophageal Cancer. *Cancer Research* 2000; 60:2753-2755.

16. Carboni, D., Chiba, I., Mitsudoni, T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Onogene* 1991: 6(9):1691-2.
17. Chumakov, P.M, Jenkis, J.R. BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nucleic Acids Res.* 1991 19(24):6969.
18. Hernandez-Boussard, T., Montesano, R., Hainaut, P. Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1999: 14: 229-233.
19. Vos, M., Adams, C.H., Victor, T.C., van Helden, P.D. Polymorphism and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in population at high risk for esophageal cancer in South Africa. *Cancer Genetics* 2003: 140: 23-30.
20. Miller S.A., Dikes D.D., Polensky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclei Acids Res* 1988: 16(7):1215.
21. Segal F., Kaspary A.P.B., Prolla J.C., Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Letters* 2004: 210(2):213-218.
22. Akar, N., Akar E., Cyn, P. p53 genes Ppolymorphisms in the Turkish Population. *Turk L Haematol* 1999: 16(4):187-189.
23. NCI Homepage - National Cancer Institute - <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm> (15/06/2004)
24. Sjalander, A., Birgander, R., Saha, N., Beckman, L., Beckman, G. p53 and Polymorphism and Haplotypes Show Distinct Differences between Major Ethnic Groups. *Hum Hered.* 1996: 46:41-8.
25. Thiagaligam, S., Foy, R.L., Cheng, K., Lee, H.J., Thiagaligam, A., Ponte, J.F. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Current opinion in Oncology* 2002: 14:65-72.
26. Dunn, J.R., Garde, J., Dolan, K., Gosney, J.R, Oates, B.C., Watson, A.J.M., Fielding, P., Field, J.K. The Evolution of Loss of Heterozygosity on Chromosome 17 during the Progression to Barrett's Adenocarcinoma Involves a Unique Combination of Target Sites in Individual Specimens. *Clinical Cancer Research* 2000: 6:4033-4042.
27. Krehling, J., Graveley, B.R. The origins and implications of Alternative splicing. *TRENDS in Genetics* 2004: 20(1):1-4.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número: _____

Prezado Paciente:

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal levantar dados mais precisos sobre mutações presentes no gene p53 que encontra-se alterado em pacientes que sofrem de Esôfago de Barrett. Com as informações obtidas, poderemos planejar programas que oferecem uma melhor qualidade de atendimento, diagnóstico e orientação aos pacientes, principalmente sobre a possibilidade de tratamento preditivo.

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

No momento da coleta, os pacientes foram informados dos objetivos, riscos e benefícios para o paciente e sua família.

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

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

Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico de uma doença genética e oferecer alternativas de tratamento e de aconselhamento familiar com finalidade de reprodução.

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

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

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

Paciente

Pesquisador

Data: _____

Pesquisador Responsável: Dra. Sandra Leistner Segal
Telefone: 33168011