JERONIMO DE ALENCAR NOGUEIRA

**Mutação pontual do códon 249 do TP53 no
carcinoma hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Jeronimo de Alencar

Mutação pontual do códon 249 do TP53 no carcinoma hepatocelular /
Jeronimo de Alencar Nogueira. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientadora: Suzane Kioko Ono-Nita.

Descritores: 1.Mutação 2.Genes p53 3.Carcinoma hepatocelular 4.Aflatoxina B1

USP/FM/SBD-357/07

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Evaldo e Ana pelo amor e incentivo.

Ao meu irmão Igor pela amizade ao longo de todos estes anos.

Aos meus avós Gerardo e Eva pelo imensurável carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma participaram não apenas do meu trabalho, mas também da minha vida neste período. A todos aqueles que comemoraram comigo os sucessos e me apoiaram nos inúmeros momentos difíceis que enfrentamos.

À Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita e Dr. Marcelo Eidi Nita pela valiosa orientação, participação e incentivo durante todo o processo de execução do meu trabalho e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, excelente mentor e chefe. Seu comprometimento com o grupo e com a ciência sempre foi motivo de minha mais profunda admiração.

Ao Professor Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves por compartilhar suas inestimáveis idéias e experiência, sem as quais a execução do trabalho seria inviável.

Meus mais profundos agradecimentos aos meus colegas Eliane Pereira do Carmo, Helena Scavone Paschoale, Marcelo Moreira Tavares de Souza, Fernanda Barbosa, pela constante ajuda prestada no desenvolvimento de todos os projetos de pesquisa nos quais eu tomei parte.

Ao Dr. Cristovan Scapulatempo Neto e Dr. Evandro Sobroza Mello, não apenas pelo auxílio na obtenção e seleção dos casos, mas também pela constante participação na pesquisa.

À Profa. Dra. Dulce Guarita e Dra. Denise Cerqueira Paranaguá Vezozzo pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, pela ajuda na aquisição das amostras que compuseram meu trabalho.

À Alves de Queiroz Family Fund for Research e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

LISTA DE ABREVIACÃO	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma hepatocelular	2
1.2	O TP53	5
1.2.1	Mutação do TP53	7
1.3	Aflatoxina	12
1.4	Infecção por VHB	17
1.5	Patologia do CHC	19
1.6	Prognóstico de CHC	20
1.7	Potenciais Impactos do Estudo	21
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Seleção dos pacientes e das amostras a serem estudadas	26
3.2	Corte e dissecação das amostras	28
3.3	Extração de DNA	29
3.4	Análise da presença da mutação	30
3.5	Deteção do DNA do VHB nas amostras	35
3.6	Obtenção de dados clínicos anátomo-patológicos	35
3.7	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Padronização da Extração de DNA	38
4.2	Amplificação por PCR	38
4.3	RFLP	39
4.4	Seqüenciamento	41
4.5	Presença de VHB	42
4.6	Variáveis relacionadas com a presença da mutação 249 ^{ser}	43
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS	57
8	ANEXOS	65

LISTAS

LISTA DE ABREVIÇÃO

μg: Microgramas
μM: Micromolar
A: Adenina
AFB1: Aflatoxina B1
AFM1: Aflatoxina M1
Arg: Arginina
C: Citosina
CDK: Quinase Dependente de Ciclina
CHC: Carcinoma hepatocelular
CICAP: Centro de Imunohistoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica
Cyp450: Citocromo p-450
DAP: Departamento de Anatomia Patológica
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Deoxinucleotídeos
FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G: Guanina
GST: Glutathione S-transferase
HC: Hospital das Clínicas
IARC: International Association for Research of Cancer
IC: Intervalo de confiança
INCA: Instituto Nacional do Câncer
M: Molar
MGB: Minor Groove Binder
mM: Milimolar
ng: Nanogramas
nM: Nanomolar
°C: Graus Celcius
OMS: Organização Mundial de Saúde
OR: Odds ratio
pb: pares de base
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pM: Pico molar
ppb: Partes por bilhão
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
Ser: Serina
SNP: Polimorfismo de um único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphism)
SVO: Sistema de Verificação de Óbito
T: Timina
TAE: Tris Acetato EDTA
TBE: Tris Borato EDTA
VHB: Vírus da Hepatite B
VHC: Vírus da Hepatite C

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Índice de mortalidade por CHC no mundo. Índice relativo a 100.000 indivíduos.....	04
Figura 02: (A) Distribuição dos exons no gene TP53. (B) Distribuição dos domínios da p53, os números entre parênteses representam os aminoácidos correspondentes a cada subunidade.	05
Figura 03: Frequência de mutação do TP53 em tumores de diferentes órgãos.....	08
Figura 04: (A) frequência de Mutações pontuais no TP53 vs Hot-Spot, levando em conta todos os tipos de tumor. (B) frequência de Mutações pontuais no TP53 vs Hot-Spot apenas no CHC.	09
Figura 05: A via metabólica da aflatoxina no organismo.....	15
Figura 06: Microscopia óptica de cortes histológicos de CHC corados com HE, aumento de 400x, representando os diferentes graus do CHC. No sentido horário: grau 1, grau 2, grau 3 e grau 4.....	20
Figura 07: Fluxograma da seleção dos casos.....	27
Figura 08: Esquema demonstrando a restrição do fragmento de PCR referente ao exon 7 do TP53. O fragmento possui 4 sítios de restrição para <i>HaeIII</i> . Amostras com codon 249 normal irão formar 5 fragmentos de 92, 66, 37, 30 e 10pb enquanto amostras mutadas se clivarão em 158, 37, 30 e 10pb.....	32
Figura 09: Corrida em gel de agarose 1,5% TAE de produtos de PCR para o exon 7 do TP53	39
Figura 10: Restrição enzimática dos fragmentos de PCR. O fragmento de 158pb indica a presença de mutação do códon 249.....	40
Figura 11: Seqüenciamento do exon 7 do TP53: Circulado em vermelho está o códon 249, acima está representada uma amostra 249 ^{Ser} , abaixo uma amostra sem mutação neste códon.....	41
Figura 12: Amplificação por PCR em tempo real da diluição seriada do plasmídeo contendo todo o genoma do VHB. A menor concentração detectável neste método foi de 5 cópias por reação, representando a diluição mais a direita.....	42
Figura 13: Amplificação por PCR em tempo real do DNA do VHB por PCR em tempo real, determinando a presença do DNA viral nos hepatócitos.....	43
Figura 15: Comparação entre DNA extraído de parafina (P) e de sangue periférico (SP) armazenado a -20 °C. O marcador de peso molecular e de concentração utilizado foi o Low Mass Ladder (LM)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência da mutação do códon 249 e em outros pontos do TP53 em casos de CHC em áreas com diferentes níveis de exposição a aflatoxina.....	11
Tabela 2: Associação entre AFB1 e 249 ^{Ser} segundo os critérios de Bradford-Hill	12
Tabela 3: Quantidade de Aflatoxina permitida	17
Tabela 4: Análise de Pearson χ^2 correlacionando presença da mutação e grau de diferenciação tumoral: Pearson $\chi^2(3) = 7,6567$, $p = 0,054$	43
Tabela 5: Associação entre tamanho de tumor e presença da mutação	44
Tabela 6: Análise multivariada dos fatores que possuem relação com a presença da mutação 249Ser.	45

Nogueira JA. *Mutação pontual do códon 249 do TP53 no carcinoma hepatocelular* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 72p.

Mutação 249^{Ser} no TP53 no Carcinoma Hepatocelular (CHC), frequente em países da África e Ásia, é uma evidência molecular de exposição à aflatoxina. O objetivo deste estudo é analisar a frequência de 249^{Ser} em 74 amostras de CHC no Brasil. A mutação foi analisada por RFLP e sequenciamento. A presença de vírus da hepatite B (VHB) foi analisada por PCR em tempo real. 249^{Ser} foi encontrada em 13/74 (28%) e VHB em 13/74 (16%). A mutação foi encontrada em maior frequência em tumores indiferenciados (OR = 2,415, IC = 1,001 – 5,824). O tamanho médio de tumores com 249^{Ser} foi de 9,4 cm contra 5,5 cm de amostras sem a mutação (p=0,012). Não foi encontrada relação entre VHB e 249^{Ser}. Os resultados indicam que 249^{Ser} é um fator importante na carcinogênese do CHC no Brasil sendo associada à uma forma maior e menos diferenciada de tumor.

Descritores: 1. Mutação; 2. Genes, p53; 3. Carcinoma hepatocelular; 4. Aflatoxina B1.

Nogueira JA. *Mutation of TP53 codon 249 in the hepatocellular carcinoma* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 72p.

TP53 249^{Ser} mutation has been proved a molecular evidence for aflatoxin-related Hepatocellular Carcinoma (HCC) and is frequent in Africa and Asia. The aim of our study was to analyze the frequency of 249^{Ser} mutation in HCC from Brazil. We studied 74 samples of paraffin embedded HCC. 249^{Ser} mutation was analyzed by RFLP and sequencing. Presence of HBV DNA was determined by Real-Time PCR. 249^{Ser} was found in 21/74 (28%) samples while HBV DNA was found in 13/74 (16%). Poorly differentiated HCC was more likely to have 249^{Ser} mutation (OR = 2.415, IC = 1.001 – 5.824). The mean tumor size of 249^{Ser} HCC was 9.4 cm versus 5.5cm on wild type (p=0.012). HBV DNA was not related with 249^{Ser}. Results indicate that 249^{Ser} is an important factor of HCC carcinogenesis in Brazil and is associated with large and poorly differentiated tumors.

Descriptors: 1. Mutation; 2. Genes, p53; 3. Hepatocellular Carcinoma; 4. Aflatoxin B1.

1.1 Carcinoma hepatocelular

O câncer primário de fígado é o quinto tipo mais comum de câncer no mundo e a terceira maior causa de morte por câncer. O Carcinoma Hepato-Celular (CHC) é responsável por aproximadamente 90% dos casos de câncer de fígado [1].

Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), o câncer hepático e das vias biliares ocupa a sétima posição no caso de óbitos por câncer no Brasil; sendo que, dentre estes tipos de tumores, o CHC é responsável por 80% dos casos.

São diversos os fatores capazes de levar ao surgimento de lesões pré-malignas que podem culminar na evolução para um quadro neoplásico. Dentre eles os mais comuns são a infecção pelos vírus da Hepatite B ou C (VHB e VHC) e a ingestão de álcool e micotoxinas como a aflatoxina, presente em alimentos. Tais eventos acarretam na alteração de expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, levando à neoplasia [2].

O maior fator de risco para o desenvolvimento de CHC é a presença de cirrose hepática [3] . No Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, foi observado que 16% dos pacientes cirróticos atendidos vieram a desenvolver o carcinoma (dados não publicados).

É importante salientar que o desenvolvimento do CHC está intimamente vinculado a fatores ambientais e sócio-econômicos [4]. Desta forma, podem-se observar variações não só na incidência, mas também nas diferentes vias

moleculares relacionadas à carcinogênese hepática em diferentes regiões geográficas. Por exemplo: mutações pontuais no gene do p53 são comuns em pacientes acometidos por CHC em regiões da China e da África, porém, em países europeus ou norte-americanos este evento é mais raro [5, 6]. Da mesma forma que em países com alta incidência de VHB e aflatoxina, onde a infecção viral é adquirida em estágios precoces da vida e o CHC é desenvolvido em fígado não cirrótico, é observado com uma maior frequência [3]. Por outro lado, em países desenvolvidos (onde a incidência deste tipo de tumor é menor), o surgimento de CHC está relacionado principalmente ao alcoolismo [7].

Outro fator etiológico do CHC que vem sendo discutido é a infecção viral associada à ingestão de álcool. O álcool pode ter um efeito sinérgico à infecção por VHB e VHC quanto ao risco de desenvolvimento do CHC [8]. Entretanto, um consumo de álcool moderado não foi associado à fibrose hepática em pacientes infectados com VHC [9].

Regiões como o sul da Europa podem ser exemplos da interação entre múltiplos fatores ambientais na carcinogênese hepática. Nestas regiões os dados de pesquisas sugerem um efeito sinérgico entre infecção por VHB, HCV e ingestão de álcool para o surgimento do CHC [10].

Mais de 80% dos casos de CHC ocorrem na região da África Sub-Saariana ou no leste asiático, sendo que apenas a China possui 50% dos casos de CHC do mundo [11, 12]. A distribuição dos casos de CHC no mundo está descrita na figura 01.

Figura 01: Índice de mortalidade por CHC no mundo. Índice relativo a 100.000 indivíduos

Fonte: El-Serag, 2007.

Apesar dos Estados Unidos serem uma região de baixa incidência de CHC, este tipo de tumor é a causa de morte relacionada a câncer que mais cresce. Sua incidência dobrou entre 1985 e 2002. Este aumento está relacionado com novos casos de VHC [11, 13, 14].

Foi demonstrado em estudos recentes que a cafeína possui uma ação hepatoprotetora, podendo inclusive prevenir o surgimento do CHC. Em um estudo caso-controle realizado na Itália e na Grécia, observou-se um efeito benéfico da ingestão de café, diminuindo o risco de CHC [15]. Os mesmos resultados foram observados em uma população japonesa [16, 17].

1.2 O TP53

O TP53, localizado no cromossomo 17p13.1 [18], é um gene supressor de tumor que possui 11 exons e codifica a proteína p53 constituída por 393 aminoácidos. Sua estrutura está representada na Figura 2.

Figura 2: (A) Distribuição dos exons no gene TP53. (B) Distribuição dos domínios da p53, os números entre parênteses representam os aminoácidos correspondentes a cada subunidade.

Fonte: Adaptado do IARC TP53 Database, 2006

A p53 é uma proteína nuclear conhecida como sendo a “guardiã” do genoma. Sua função é impedir a proliferação de células que sofreram alguma alteração em seu material genético. Em condições fisiológicas esta proteína apresenta uma meia vida relativamente curta (aproximadamente 20 minutos).

O principal mecanismo de ação da p53 é como fator de transcrição, que poderá culminar em dois eventos: (1) parada do ciclo celular e eventual reparação do DNA e (2) apoptose.

Parada do ciclo celular: este evento geralmente ocorre no final da fase G1, mediante transcrição p53-dependente de inibidores de Quinases

Dependentes de Ciclina (CDKs), principalmente a p21. Durante o intervalo onde o ciclo celular estará inibido, dependendo da “gravidade” do dano no DNA, é possível que o material genético seja reparado pela GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*). Caso o reparo seja bem sucedido, a p53 regula negativamente sua própria função. Neste evento, ela ativa a transcrição do gene *mdm2*, cujo produto inibe a ação da p53, permitindo o retorno do ciclo celular, permitindo a passagem da fase G1 para a fase S [19].

Apoptose: Ocorre quando não é possível reparar o dano sofrido pelo DNA, visando que a alteração genética não se propague por outra geração de células. O mecanismo com o qual a p53 induz apoptose é pela a transcrição dos genes *bax* e IGF-BP3. A *bax* funciona como antagonista de proteínas inibidoras da apoptose, como a bcl-2, e age formando um canal na membrana da mitocôndria liberando para o citoplasma o citocromo C, que ativa a via das caspases e culmina com a morte celular. Já o IGF-BP3 liga-se ao receptor do IGF (Insuline like Growth Factor) inibindo a resposta celular ao fator de crescimento, outra ação que é atribuída à p53 é a inibição da angiogênese [19, 20].

Em condições normais, a p53 encontra-se em baixos níveis celulares, pois é rapidamente degradada [21], não interferindo, portanto, na progressão do ciclo celular e na sobrevivência da célula [22, 23]. Entretanto, na presença de situações de estresse celular que levam o dano do DNA, como radiação UV ou X [22], o TP53 é rapidamente induzido e as células normais aumentam sua expressão para que o ciclo celular seja bloqueado até que haja o reparo do

DNA. Por outro lado, células com mutações ou outro tipo de inativação do TP53 não têm o ciclo celular bloqueado e continuam a se dividir [22]. Sua inativação pode decorrer de uma gama de alterações, como deleção cromossômica, mutações tipo *missense*, entre outras, e suas mutações vêm sendo descritas em vários tipos de câncer, como cólon, cérebro, pulmão, fígado, bexiga e estômago [22, 24, 25].

1.2.1 Mutação do TP53

Mutação no gene da p53 é encontrada em mais de 50% dos tumores humanos. Na figura 3, retirada do Banco de Dados de Mutações do TP53 da IARC, pode-se observar que a mutação do TP53 ocorre em 26,2% dos tumores de fígado.

Figura 3: Frequência de mutação do TP53 em tumores de diferentes órgãos.

Fonte: IARC TP53 Mutation Database, Julho de 2004

A distribuição das mutações ao longo dos 11 exons do TP53 não ocorre de maneira randômica, gerando os chamados “*Hot-Spots*” [26]. As figuras 4a e 4b mostram a distribuição das mutações pontuais ao longo do gene em questão.

Figura 4: (A) frequência de Mutações pontuais no TP53 vs Hot-Spot, levando em conta todos os tipos de tumor. (B) frequência de Mutações pontuais no TP53 vs Hot-Spot apenas no CHC.

Fonte: TP53 database em Dezembro 2006

Tanto a frequência quanto o tipo e o local da mutação do TP53 no CHC são extremamente variáveis entre diferentes regiões geográficas. Isso se deve principalmente devido a incidência dos vírus das Hepatites B e C e contaminação alimentar por aflatoxina. Em regiões de alta incidência do CHC, como China e África, podem-se encontrar alterações na p53 entre 42-52% dos

tumores, enquanto em países norte-americanos e europeus esta frequência é de 0 - 20%. O Brasil apresenta uma frequência intermediária de aproximadamente 35% [24].

Em 1991, dois grupos de pesquisa distintos [5, 6] descreveram uma mutação característica do TP53 induzida pela exposição à alimentos contaminados com aflatoxina presentes na dieta em regiões da China e da África. Ela consiste na substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) no códon 249 (AGG) no exon 7 e culmina em uma alteração de uma arginina (Arg) para uma serina (Ser), resultando na forma mutante da p53 e, segundo o IARC, este tipo de mutação é a mais freqüente no CHC.

Jackson e colaboradores [27] observaram a presença desta mutação no soro de 46,7% de pacientes acometidos por CHC na região de Qidong (China). Em um estudo anterior realizado na Gâmbia [28] além de ser encontrada a mutação no soro de 36% dos pacientes com CHC também foi possível detectá-la no soro de 15% dos pacientes cirróticos, e em 6% dos pacientes controles.

Em estudo mais recente [29], não foi encontrada 249^{Ser} no plasma de crianças expostas a AFB1 na região de Kindia na Guiné (região endêmica tanto para VHB e AFB1), mesmo que o aducto de aflatoxina-albumina tenha sido encontrado em 96% das amostras de plasma destas crianças.

A variação geográfica da frequência da 249^{Ser} pode ser melhor visualizada em uma meta-análise realizada por Stern e colaboradores [30], que apresentou uma revisão sistemática sobre a incidência da mutação (tabela 1) bem como sua associação à infecção pelo VHB.

Tabela 1: Frequência da mutação do códon 249 e em outros pontos do TP53 em casos de CHC em áreas com diferentes níveis de exposição a aflatoxina.

Região	Mutação 249^{Ser}	Outras Mutações no TP53
Alta incidência de AFB1		
Guangxi, China	18/50	NA
Moçambique	8/16	11/16
Qidong, China	8/16	8/16
Qidong, China	21/35	NA
Qidong, China	13/25	15/25
Senegal	10/15	NA
Africa do Sul	3/10	5/10
Incidência Intermediária		
Durban, Africa do sul	2/24	NA
Hong Kong, China	2/26	6/26
México	3/16	NA
Shangai, China	10/52	NA
Shangai, China	3/10	5/10
Taiwan	3/15	NA
Baixa Incidência		
Alasca, EUA	0/13	0/13
Europa	0/14	1/14
Europa	1/19	6/19
Alemanha	0/13	2/13
Grã-Bretanha	0/19	2/19
Itália	0/20	6/20
Japão	0/43	7/43
Japão	3/34	10/34
EUA	4/37	NA

NA = não avaliado.

Fonte: Adaptado de Stern et al, 2001

A exposição à Aflatoxina como efeito causal da mutação 249^{Ser} e conseqüentemente o CHC segue os critérios de Bradford-Hill [31], mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Associação entre AFB1 e 249^{Ser} segundo os critérios de Bradford-Hill

<i>Poder da Associação</i>	
<i>Consistência</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Correlação dose-resposta entre a ingestão estimada de AFB1 e a frequência da mutação 249Ser em 3 diferentes etnias em 3 diferentes continentes - 249Ser é encontrada em soro de pacientes expostos a AFB1 e infectados com VHB - 249Ser é encontrada em CHCs de indivíduos expostos à AFB1 e infectados com VHB mas não apenas infectados com VHB
<i>Especificidade</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 249Ser é incomum em outros tipos de tumores - 249Ser detectada em soro é um marcador de risco para CHC
<i>Temporalidade</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Células com 249Ser podem ser observadas em fígado não tumoral em áreas de alta incidência de CHC
<i>Evidências Biológicas</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> - Estudos laboratoriais demonstram o efeito carcinogênico da AFB1 - A forma metabolicamente ativa da AFB1 liga-se a terceira base (G) do codon 249 do TP53 - Exposição in vitro de células hepáticas à AFB1 induzem a 249Ser - HBx aumenta a frequência de 249Ser em células expostas à AFB1 - 249Ser inibe a apoptose e transcrição mediada pela p53, aumentando o crescimento celular

Fonte: Adaptado de Staib et al, 2003

As mutações no códon 249 não são exclusivas do CHC. Hussain e colaboradores observaram que células de pulmão expostas a benzopireno também desenvolvem uma substituição de G por T, porém na segunda base do códon (AGG – ATG) substituindo uma arginina por uma metionina [32].

1.3 Aflatoxina

Aflatoxina é uma micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, endêmico em regiões de clima quente e úmido, geralmente contaminando

cereais e alimentos secos que ficam armazenados por longos períodos. Por possuir um efeito bioacumulativo, é possível encontrá-la em leite e derivados [33].

Existem mais de 16 tipos de aflatoxinas, mas apenas quatro estão relacionadas a riscos de desenvolvimento de câncer em animais e humanos são elas: B1, B2, G1, G2. As aflatoxinas foram caracterizadas e nomeadas de acordo com a cor da fluorescência que emitem quando iluminadas com luz Ultra Violeta (UV). As aflatoxinas B mostram-se com a cor azul (Blue-azul) e as aflatoxinas G mostram-se com a cor verde (Green-verde), diferenciando-se entre si, B1 - B2 e G1 - G2 pela intensidade da fluorescência [34, 35].

A Aflatoxina B1 (AFB1) possui o maior potencial para causar carcinogênese e é a toxina mais produzida pelos fungos [36, 37, 38].

Em outro grupo está a aflatoxina M1 (AFM1) que é um produto do metabolismo da AFB1. Por ser lipossolúvel a AFM1 pode ser excretada no leite de animais que ingeriram AFB1, podendo posteriormente ser ingerida por humanos [35].

Desde sua descoberta, há mais de 30 anos, muitos estudos debateram a relação entre a AFB1 e o CHC. Entretanto estudos anteriores a 1980 não possuíam condições de avaliar a presença do VHB; da mesma forma que estudos anteriores a 1990 não levavam em conta a possibilidade de infecção por VHC. Desta forma, o papel da aflatoxina na carcinogênese hepática permaneceu obscura até o surgimento das técnicas de biologia molecular e de dosagem de aflatoxinas [39].

Para possuir efeito carcinogênico é necessária a conversão da aflatoxina para seu metabólito AFB1-exo-8,9-epóxido. Esta reação também é catalisada pelas enzimas do complexo do Citocromo p450, em especial as isoformas CYP3A4 e CYP1A2 [40]. O epóxido em questão possui a capacidade de ligar-se covalentemente com o DNA formando os chamados aductos.

A palavra “aducto” se origina da junção das palavras “adição” e “produto” e se refere a uma entidade química que se forma da união de moléculas mediante à ligações covalentes. Esta ligação é de natureza reversível, portanto os elementos podem eventualmente retornarem a suas formas originais [41].

O principal aducto é resultante da interação do metabólito da AFB1 com guaninas, culminando na formação do complexo AFB1-N7-Gua [36]. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que a AFB1 é capaz de interagir com 20% das bases entre os exons 5 – 8 do gene da p53, 85% das quais eram Guaninas [42]. Outro grupo relatou a formação de aductos de DNA em outros códons dos exons 7 e 8 deste mesmo gene [43].

Estudos indicam que um fator de risco para formação de aductos é a ineficiência da eliminação dos metabólitos secundários da aflatoxina (em especial o AFB1-exo-8,9-epóxido), realizada por enzimas de fase 2 da biotransformação de xenobióticos (isoformas da família da Glutathione S-transferase), como descrito na figura 5 [44].

Figura 5: A via metabólica da aflatoxina no organismo

Fonte: Adaptada de Tieremasa et al, 2001

Exposição à AFB1 pode alterar a expressão de alguns genes, incluindo algumas enzimas do CYP450 que estão correlacionadas com a ativação da GST. As variações genéticas populacionais relacionadas às atividades destas enzimas podem explicar as diferenças observadas quanto à ação da toxina.

Já existem medicamentos classificados como quimio-preventivos. O Oltipraz é um membro destas substâncias cuja ação é ativar as enzimas da fase 2 da biotransformação e conseqüentemente acelerar o processo de eliminação do AFB1-exo-8,9-epóxido diminuindo o tempo de permanência do epóxido no organismo e assim o risco de formação de adutos [45].

É importante salientar que existem eventos que podem potencializar o efeito carcinogênico da AFB1. Além da infecção por VHB (que será discutido em seguida) foi descrito que a presença de nematóide *Schistosoma* pode ter um efeito sinérgico no surgimento da mutação 249^{Ser} [46].

A Organização Mundial de Saúde recomenda o controle sistemático dos níveis de aflatoxina nos alimentos, principalmente em países nas áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis à proliferação do *Aspergillus flavus*.

Desde 1976 no Brasil, a quantidade máxima permitida de Aflatoxina (AFB1 + AFG1) é de 30 ppb ($\mu\text{g/kg}$) de acordo com a Resolução - CNNPA nº 34, de 1976. Entretanto, em 15 de outubro de 2002, a Resolução RDC nº 274 “considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional, com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados a limites máximos de aflatoxinas em alimentos” [47], determinou os seguintes limites máximos de aflatoxina:

Tabela 3: Quantidade de Aflatoxina permitida

ALIMENTO	AFLATOXINA	LIMITE
Leite fluído ou leite em pó	M1	0,5 $\mu\text{g/L}$ 5,0 $\mu\text{g/kg}$
Milho em grão ou farinha	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 $\mu\text{g/kg}$
Amendoim ou derivados	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 $\mu\text{g/kg}$

Fonte: ANVISA

Entre o período de fevereiro de 2005 a julho de 2006 a ANVISA interditou 20 marcas de amendoins e derivados por apresentarem níveis de aflatoxina acima do permitido [48].

Em um estudo realizado por Sabino e colaboradores [49] em amostras de amendoim no estado de São Paulo, foi encontrado aflatoxina em 45,3% das amostras; além disso, 27% das amostras possuíam níveis de aflatoxina acima do permitido. A concentração máxima de aflatoxina encontrada em doces de amendoim foi de 536 ppb, ou seja, 17,8 vezes mais do que o permitido. A União Européia exige normas bem mais rígidas quanto a presença de aflatoxina B1 em alimentos, permitindo apenas 0,1ppb em alimentos derivados de cereais, possuindo normas específicas para alimentos destinados às crianças (Regulation (EC) 683/2004).

1.4 Infecção por VHB

O processo carcinogênico relacionado à infecção por VHB está intimamente ligado à expressão da proteína HBx. Esta oncoproteína demonstrou induzir câncer no fígado de ratos transgênicos [50] e é expressa em mais da metade dos CHCs causados por VHB [51].

Apesar de ainda não existir uma correlação bem estabelecida, vários autores tentaram associar a presença da infecção por VHB com alterações da função do p53. Hosono e colaboradores em 1993 não acharam associação entre estes dois eventos [52]. Mais recentemente constatou-se que a transfecção de VHB altera a expressão do p53 em cultura de células [53]. Estudos em pacientes expostos à aflatoxina e infectados com VHB sugerem uma interação toxina-vírus, onde o VHB estaria relacionado com a seletividade à mutação no códon 249 [54].

Foi observado que a HBx tem capacidade de inibir a reparação de nucleotídeos durante a replicação celular, quer seja por ligação à proteínas ligadas à reparação, quer seja pelo dano ao DNA causada pela própria proteína. Isso possibilita que os aductos persistam preferencialmente em pacientes expostos, além da toxina, ao VHB. Além disso, infecção por VHB pode alterar a regulação dos genes do complexo CYP e GST, dificultando a detoxificação da AFB1.

Em um estudo utilizando soro de pacientes de Gâmbia, Kirk e colaboradores [55] detectaram 249^{Ser} em 3,5% dos pacientes controles, 15,3% dos cirróticos e 39,8% dos pacientes com CHC. Os dados sugeriram que a infecção por VHB teria um efeito multiplicativo na incidência da mutação.

1.5 Patologia do CHC

O CHC é um dos tumores morfológicamente mais heterogêneos, mas geralmente pode-se identificar uma arquitetura formada por trabéculas delimitadas por espaços semelhantes a sinusóides hepáticos. A maioria dos casos de CHC tem padrão trabecular, podendo ser facilmente diagnosticada como uma proliferação neoplásica por formarem trabéculas largas compostas por hepatócitos atípicos.

A graduação histológica proposta por Edmondson & Steiner, em 1954, ainda é a mais usada (Figura 6). Nela o CHC é dividido em:

- Grau 1: Tumores bem diferenciados com trabeculação delicada
- Grau 2: Estrutura trabecular básica mantida, com aparecimento de estruturas acinares ou granulares e eventualmente áreas papilares. Os núcleos apresentam um grau maior de atipia quando comparados ao grau 1
- Grau 3: Aumento da atipia nuclear, com presença de múltiplos nucléolos, áreas com perda do arranjo trabecular e presença de células gigantes.
- Grau 4: Padrão sólido ou medular de crescimento, as células não são coesas, mostrando formas bizarras e a situação mais freqüente é que haja dificuldade em firmar a linhagem hepatocelular da neoplasia.

Figura 6: Microscopia óptica de cortes histológicos de CHC corados com HE, aumento de 400x, representando os diferentes graus do CHC. No sentido horário: grau 1, grau 2, grau 3 e grau 4

1.6 Prognóstico de CHC

O prognóstico do paciente com CHC depende das seguintes variáveis:

1. Estadio do tumor
2. Grau de disfunção hepática no momento do diagnóstico
3. Níveis de Alfa-1-fetoproteína

A classificação mais simples que permite estratificar os pacientes em relação à probabilidade de sobrevida é a proposta por Okuda e colaboradores

levando em conta o tamanho do tumor, presença de ascite, concentração plasmática de bilirrubina e de albumina.

- Estadio 1
 - Tumor menor que 50% do volume hepático
 - Ausência de ascite
 - Bilirrubina total $\leq 3\text{mg/dl}$
 - Albumina $\geq 3\text{mg/ml}$
- Estadio 2
 - Ausência de uma ou duas características do estadio 1
- Estadio 3
 - Ausência de três ou quatro das características do estadio 1 [56].

1.7 Potenciais Impactos do Estudo

Conforme foi descrito anteriormente, a carcinogênese do CHC possui diversas vias que podem ser variáveis de acordo com seu fator causal. A aflatoxina mostrou-se como o principal fator causal do CHC em países africanos e algumas regiões asiáticas, porém esta substância teve papel irrelevante em países europeus e nos EUA [30]. Em países latino-Americanos existem poucos trabalhos avaliando a frequência da mutação do códon 249 do TP53 no CHC. O único estudo deste tipo realizado foi no México [57] demonstrando que 44% das amostras de CHC apresentavam a mutação. Esta frequência é mais próxima da encontrada em países africanos do que nos EUA.

Apesar de no Brasil existirem estudos demonstrando a presença de AFB1 acima dos limites aceitáveis [58], nunca houve um estudo em que se avaliou o quanto esta exposição pode estar relacionada à carcinogênese hepática.

Além disso, o conhecimento das alterações genéticas relacionadas ao surgimento do CHC poderá eventualmente ser usado no diagnóstico da doença. Vários trabalhos descrevem a presença da mutação em pacientes acometidos pelo CHC [59], inclusive alguns estudos citam a presença da mutação em pacientes cirróticos e/ou portadores de VHB [55]; sendo inclusive discutido o uso da análise desta mutação como uma ferramenta diagnóstica para o CHC [60].

O objetivo deste estudo é analisar a frequência da mutação no códon 249 do gene do p53 em amostras de CHC de pacientes no Brasil, bem como correlacionar esse evento com a presença do DNA do VHB nos hepatócitos e dados anátomo-patológicos.

3.1 Seleção dos pacientes e das amostras a serem estudadas

Pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular confirmada com laudo anátomo-patológico e disponibilizadas nos arquivos do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HC FMUSP. Ainda, os casos foram identificados através do banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e no Centro de Imunohistoquímica, Citologia e Anatomia Patológica (CICAP) do Hospital Alemão Oswaldo Cruz. A seleção de pacientes foi limitada entre os anos de 1998 - 2005 no sentido de utilizar peças com menos de 10 anos de preservação em parafina e que tenham sido submetidos a processos de formalização mais adequados para uso em biologia molecular. A constatação da presença do CHC que contavam nos laudos das amostras foi feita por diagnóstico anatomo-patológicos.

Foram solicitados laudos de pacientes submetidos a transplante ou ressecção hepática devido a CHC no Departamento de Anatomia Patológica (DAP) e no Centro de Imunohistoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica (CICAP) do Hospital Alemão Oswaldo Cruz. Foram obtidos 208 laudos no DAP e 141 no CICAP. A figura 7 descreve o processo de seleção de casos analisados neste estudo.

Figura 7: Fluxograma da seleção dos casos.

Casos: Conforme mostra a figura 7, foram identificados 208+141 casos com diagnóstico de CHC. Destes foram utilizados 80 peças parafinadas de CHC, 51 delas do departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e 29 amostras do Centro de Imunohistoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica (CICAP) do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Controles: Como grupo controle utilizou-se amostras de fígado que representem uma população não acometida por hepatopatias. Para tanto, foram obtidas peças de fígado não tumoral obtidos no SVO (Serviço de Verificação de Óbito). Essas amostras foram analisadas por patologistas e elas não

apresentavam nenhum tipo de hepatopatia. Os indivíduos deste grupo faleceram por razões outras que não complicações hepáticas.

Com o objetivo de manter a confidencialidade das amostras e para facilitar o manuseio das mesmas e dos dados, todos os casos foram codificados. Para os casos a codificação foi feita com a sigla HCC seguido pelo número da amostra. O número de cada amostra seguiu em ordem crescente, de acordo com o seu número do laudo anátomo-patológico. Desta forma a casuística deste estudo foi codificada como HCC001 a HCC080. Os controles foram codificados da mesma forma, utilizando a sigla SVO, seguido pelo número da amostras. Os controles compreenderam as amostras SVO1 – SVO17.

As lâminas HE referentes às amostras foram revistas por um patologista participante do projeto a fim de confirmar o diagnóstico que constava no laudo. Neste momento, o patologista também delimitou na lâmina de HE a região representada pelas células tumorais para posterior dissecação desta área.

3.2 Corte e dissecação das amostras

As amostras emblocadas obtidas no DAP - HCFMUSP foram cortadas em fragmentos de 10 µm por um técnico especializado no uso do micrótomo. Nesta etapa foi utilizando micrótomo e navalhas próprias (Leica, Alemanha) estéreis. Cada navalha foi utilizada apenas para uma amostra, evitando assim contaminação. Os cortes das amostras foram estendidos em lâminas foscas de

vidro para microscópio. O patologista então posicionou as lâminas onde os cortes estavam estendidos ao lado da lâmina HE referente a amostra, cuja a área referente ao tumor já estava delimitada. As amostras foram então macrodissecadas, utilizando bisturis estéreis a fim de reduzir a área com parênquima peri-tumoral, obtendo assim, uma maior porcentagem de material tumoral por amostra.

O material resultante desta macrodissecção foi armazenado em tubos de 1,5 ml (Ependorff®) e mantidos ao abrigo da luz e calor até o momento da extração de DNA.

3.3 Extração de DNA

As amostras foram desparafinadas mediante ao uso de xilol e etanol. O DNA foi extraído pelo Qiagen Tissue Mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) – método baseado na fixação do DNA em coluna de sílica - e posteriormente eluído em um volume de 150µl de tampão de eluição (constituído de Tris-EDTA). A integridade e a quantidade de DNA por amostra foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento do PCR.

3.4 Análise da presença da mutação

PCR: A região onde se encontra o codon 249 foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mediante a utilização de primers específicos.

- Primer Senso: 5'- CTT GCC AC GGT CTC CCC AA – 3'
- Primer Anti-senso: 5' – AG GGT CAG CGG CAA GCA GA – 3'

A sequência completa do TP53 encontra-se no GeneBank (National Center of Biothecnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob o código AY838896. O exon 7 compreende o fragmento entre os nucleotídeos de número 15290 – 15399 desta sequência. Os primers escolhidos delimitam a região referente aos nucleotídeos numero 15231 – 15468, resultando em um fragmento de 237pb que possui em sua sequência todo o exon 7.

Utilizou-se para cada reação 2U de Platinum TaqPolimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), *primers* senso e anti-senso numa concentração final de 0,1µM, dNTP a 100µM, MgCl₂ a 1,5mM, tampão 1x e água MilliQ autoclavada para completar o volume para 50µl. A quantidade de DNA extraído utilizado na reação foi de 5µl (média de 100ng).

Para a ciclagem foi utilizado o Termociclador Mastercycler (Eppendorff), com os seguintes padrões de ciclagem:

95°C – 5' (Hot-start da enzima)

95°C – 30"
60°C – 45"
72°C – 45" } 35x

72°C – 10'

Restrição enzimática: Os produtos de amplificação foram analisados por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilizando enzima *Hae III* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A reação de restrição foi realizada segundo as especificações do fabricante. Esta enzima reconhece a região GGCC, desta forma quando houver mutação (isto é: uma substituição AGG – AGT) a enzima não irá reconhecer o sítio de restrição e o fragmento não será clivado. O método de análise da mutação 249^{Ser} em CHC por RFLP foi descrito inicialmente por Aguilar *et al*, 1993.

O fragmento resultante da PCR possui 235pb e nele estão contidos 4 sítios de restrição da enzima *HaeIII*. A reação de restrição está esquematizada na figura 8.

Figura 8: Esquema demonstrando a restrição do fragmento de PCR referente ao exon 7 do TP53. O fragmento possui 4 sítios de restrição para *Hae*III. Amostras com codon 249 normal irão formar 5 fragmentos de 92, 66, 37, 30 e 10pb enquanto amostras mutadas se clivarão em 158, 37, 30 e 10pb.

Para a reação de restrição partiu-se de 100 ng de produto de amplificação utilizando 1U de enzima (um excesso de 10 vezes) junto com o tampão recomendado pelo fabricante. A reação era então encubada a 37 °C por um período entre 3 – 6 horas.

Ao término do período de encubação foi adicionado corante contendo azul de bromofenol (que inibe a atividade da enzima de restrição) na proporção de 1:10 em volume. Após esta adição o produto final foi armazenado a -20 °C ou aplicado em gel de agarose imediatamente.

Os produtos foram aplicados em gel de Agarose 1000 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) 3% em TBE (Tris-Borato-EDTA) e submetidos a uma tensão elétrica de 75 volts. Ao término da corrida o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo e visualizado contra uma fonte de luz ultravioleta.

Os produtos gerados na reação de PCR possuem 4 sítios da enzima *Hae III*, desta forma, uma amostra que não apresenta mutação será clivada em 5 fragmentos: 92 pb, 66 pb, 37 pb, 30 pb e 10 pb. A mutação em questão ocorre no sítio que delimita o fragmento de 92 pb e 66 pb; assim sendo um indivíduo que apresenta a mutação possuirá um fragmento de 158 pb.

Sequenciamento: Para a reação de seqüenciamento partiu-se de aproximadamente 40ng de produto de PCR, primer numa concentração final de 0,32 μ M, 4 μ l de BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, EUA), tampão 1 x e água MilliQ para completar o volume para 20 μ l.

As condições de ciclagem para a reação de seqüenciamento são:

1. 95°C – 2'	
2. 96°C – 10"	} 35x
R=1,0°C/s	
3. 50°C – 10"	
4. 60°C – 2'	
Hold 10°C	

Após precipitação por Isopropanol, a reação de seqüenciamento foi ressuspensa em 3 µl de tampão contendo formamida. As reações foram aplicadas em gel de poliacrilamida no seqüenciador automático ABI Prism 377 (AppliedBiosystems, Foster City, EUA). No aparelho as amostras foram submetidas a uma tensão elétrica e migraram por eletroforese para o pólo positivo onde uma fonte laser fez a leitura dos nucleotídeos. Os dados gerados foram convertidos em cromatogramas e armazenados no computador acoplado ao seqüenciador (Macintosh®). As seqüências obtidas foram transferidas para um computador PC e analisadas utilizando o programa *freeware* Chromas® (Copyright © 2003-2007 Technelysium Pty Ltd).

3.5 Detecção do DNA do VHB nas amostras

O mesmo DNA extraído dos fragmentos dos blocos de parafina foi submetido a um ensaio de PCR em Tempo Real a fim de avaliar qualitativamente a presença de DNA do VHB nos hepatócitos.

Para este ensaio utilizou-se primers e sondas da região da proteína S do vírus; estes oligonucleotídeos são específicos para os genótipos A, B, C, D, E, F (primers e sondas ainda não publicados).

Para a reação, foi utilizado 5 µl de DNA, primers senso e anti-senso a 0,1 µM, sonda MGB (Minor Groove Binder) 5'FAM a 50 µM, 1x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), água MilliQ para um volume final de 25µl.

A reação foi feita no termociclador em tempo real SDS 7300 (AppliedBiosystems, Foster City, EUA), com os seguintes parâmetros de ciclagem:

50°C – 2'	
95 °C – 10'	
95 °C – 15"	} 40x
60 °C – 1'	

3.6 Obtenção de dados clínicos anátomo-patológicos

O sexo, idade, etiologia, estadiamento do tumor e presença ou ausência de cirrose foram extraídos dos laudos anatomo-patológico obtidos no DAP e

dos prontuários dos pacientes, obtidos no SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico). Também foi utilizado o sistema informatizado do HC para obtenção de dados de sorologia.

3.7 Análise estatística

Foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou Fisher para comparar proporções. Para as variáveis contínuas (como idade e tamanho de tumor) foi utilizado o teste *t*-student. *Odds ratios* e intervalos de 95% de confiança foram calculados para estimar o risco de fatores como VHB e cirrose hepática estarem relacionados ao surgimento da mutação 249^{Ser}. Foi empregada a regressão logística multivariada para controlar potenciais fatores de confusão e avaliar possíveis interações. Previamente a esta foi empregado o método univariado com o nível de significância estatística considerada de valor de igual ou menor a 0,2, visando uma maior flexibilidade na identificação de fatores potencialmente associados com a variável desfecho. A estratégia no método multivariado foi a *Stepwise*, adotando-se tanto a *forward* ou *backward selection* para identificar o melhor modelo. A significância estatística será avaliada pelo teste de razão da verossimilhança. foi considerado estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$.

O programa STATA (Stata Corp, USA) será utilizado para realização dos testes estatísticos. Para testes Chi-quadrado, Fisher e *t*-student será utilizado o programa Vassar Stats (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da Extração de DNA

Inicialmente optou-se pela realização de um método “*in-house*” de extração de DNA utilizando xilol e etanol para remoção da parafina, tratamento com proteinase K para digestão e lise do tecido e Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico para a extração de DNA. Entretanto, uma vez que o método possui uma alta porcentagem de perda e material, o resultado obtido não foi satisfatório.

Desta forma optou-se por utilizar um método comercial de extração baseado em coluna de sílica gel. O kit escolhido foi o Qiagen Tissue mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemanha), próprio para extração de DNA de amostras de tecido.

A concentração média de DNA obtido por este método foi de 40 ng/μl, quantificado por espectrofotometria ou utilizando um padrão de massa (Low Mass Ladder – Invitrogen, Carlsbad, USA).

4.2 Amplificação por PCR

Padronização da Reação de PCR: Para testar a qualidade dos primers, as condições de ciclagem e as concentrações dos reagentes, realizou-se um experimento piloto usando como molde DNA extraído de sangue periférico. Cinco microlitros do produto de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% em TAE. O marcador utilizado foi o Low Mass Ladder (Invitrogene, Carlsbad, EUA) numa quantidade de 4 μl. A concentração do produto formado na reação de PCR foi calculada comparando sua intensidade com a intensidade do

marcador Low Mass, estimando-se uma concentração de 40 ng/ μ l, conforme mostrado na figura 9.

Apesar de possuírem DNA extraído, 6 das 80 amostras não apresentaram amplificação na reação de PCR, desta forma as mesmas foram excluídas do trabalho.

Figura 9: Corrida em gel de agarose 1,5% TAE de produtos de PCR para o exon 7 do TP53

A eficiência da amplificação em alguns casos foi bastante variável. A concentração dos amplicons variou entre 40 - 10ng/ μ l (Figura 10).

4.3 RFLP

A reação de RFLP foi padronizada utilizando produtos de PCR de DNA extraído de sangue periférico e de fragmentos de parafina de fígado saudável. Desta forma não seriam observadas nestas amostras o fragmento de 158pb e a atividade da enzima pode ser testada.

Uma vez padronizada a reação os produtos de PCR das amostras foram submetidos a esta técnica (Figura 10).

Figura10: Restrição enzimática dos fragmentos de PCR. O fragmento de 158pb indica a presença de mutação do códon 249.

A presença de fragmentos de 92pb e 66pb no produto de restrição enzimática indica que havia formas selvagens de p53 junto com a forma mutante. Este fato pode ser causado pela presença de células não tumorais que não foram completamente eliminadas durante a macrodissecção. Outra explicação poderia ser a ocorrência da mutação em heterozigose. A presença destas células, no entanto, não comprometem a detecção da mutação.

A recomendação do fabricante quanto ao uso da enzima para uma digestão completa é a utilização de 1 U de *HaeIII* para cada 1 µg de DNA e encubar a 37 °C por 1 hora. Neste estudo foi utilizado 1 U de enzima para cada 100ng de DNA e a incubação compreendeu um período de 3 – 6 horas. Este procedimento visava evitar a ocorrência de digestão incompleta.

Alem disso, o fragmento obtido pela PCR possui 4 sítios de restrição para a enzima *Hae III*. Desta forma a presença do fragmento de 158 pb só seria devida

à digestão incompleta caso ele estivesse acompanhado de fragmentos de: 235 pb, 205 pb, 198 pb, 195 pb, 168 pb, 103 pb, 102 pb e 40 pb.

4.4 Seqüenciamento

Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados em duplicata. A presença de um pico referente a timina na terceira posição do códon 249 acusava a presença da mutação em questão (Figura 11)

Figura 11: Seqüenciamento do exon 7 do TP53: Circulado em vermelho está o códon 249, acima está representada uma amostra 249^{Ser}, abaixo uma amostra sem mutação neste códon.

Mutação do códon 249 do TP53: A mutação foi encontrada em 21/74 (28%) dos pacientes.

Não foi observada a presença da mutação em nenhuma dos 17 blocos de fígado não neoplásico.

4.5 Presença de VHB

Para estabelecer o limite de detecção do ensaio utilizando PCR em tempo real foi realizada uma diluição seriada de uma solução de pSM2 (um plasmídeo que contem todo o genoma do VHB). Esta solução foi diluída seriadamente em razão 10 para observar qual seria a quantidade mínima detectável pelo ensaio. Foi possível observar amplificação de amostras contendo até 5 cópias por reação (Figura 12).

Figura 12: Amplificação por PCR em tempo real da diluição seriada do plasmídeo contendo todo o genoma do VHB. A menor concentração detectável neste método foi de 5 cópias por reação, representando a diluição mais a direita.

O ensaio de PCR em tempo real detectou qualitativamente a presença do DNA do VHB em 12/74 (16,2%) das amostras (Figura 13).

Figura 13: Amplificação por PCR em tempo real do DNA do VHB por PCR em tempo real, determinando a presença do DNA viral nos hepatócitos.

4.6 Variáveis relacionadas com a presença da mutação 249^{Ser}

A frequência da mutação de acordo com cada grau de diferenciação tumoral foi: 0/1 (0%) em G1, 7/30 (23,3%) em G2, 8/24 (23,5%) em G3 e 6/9 (66,7%) em G4, os dados estão expostos na tabela 3. A maior frequência da mutação em tumores classificados como menos diferenciados (G4) foi estatisticamente significante maior, aplicando o teste de Pearson ($p = 0,054$) (Tabela 4).

Tabela 4: Análise de Pearson chi2 correlacionando presença da mutação e grau de diferenciação tumoral: Pearson chi2(3) = 7,6567, $p = 0,054$.

	Grau Histológico				Total
	1	2	3	4	
Sem Mutação	1	23	26	3	53
Com Mutação	0	7	8	6	21
Total	1	30	3	9	74

Ao comparar a frequência da mutação em tumores menos diferenciados (G4 = 66,7%) com as demais formas (G1 – G3 = 23%) a significância estatística fica ainda mais evidente de acordo com o teste Fisher ($p = 0,01$).

VHB DNA foi detectado em 2/11 (18%) e 11/65 (17%) dos tumores com grau G4 e em grau G1 - G3 respectivamente.

Dados sobre o tamanho do tumor estavam disponíveis para 68 amostras. O tamanho médio dos tumores que apresentavam a mutação foi de 9,39 cm enquanto os tumores que apresentavam o códon 249 em sua forma normal tiveram uma média de tamanho de 5,5 cm ($p=0,015$), conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5: Associação entre tamanho de tumor e presença da mutação

Mutação	Nº de Amostras	Tamanho médio (cm)
Ausente	49*	5,5
Presente	19*	9,39

* Apenas 68 laudos possuíam informação sobre o tamanho do tumor ($p=0,015$)

Na análise multivariada (descrita na tabela 6) foi constatado que o grau mais indiferenciado de CHC representa um OR = 2,415 (IC = 1,0001 – 5,8249; $p = 0,050$); o sexo masculino representou um OR = 4,917 (IC = 0,9540 – 25,3453; $p = 0,057$) e o tamanho tumoral OR = 1,102 (IC = 1,0011 – 1,2145; $p = 0,047$).

Tabela 6: Análise multivariada dos fatores que possuem relação com a presença da mutação 249Ser.

	Odds Ratio	95% Conf. Interval	P
Grau Tumoral	2,415	1,001338 – 5,82469	0,050
Sexo	4,917	0,9540522 – 25,3453	0,057
Tamanho do Tumor	1,102	1,00114 – 1,21455	0,047

Pacientes com tumores menos diferenciados possuem uma média de idade de 43 ± 21 anos enquanto pacientes com CHC de graus G1 – G3 possuem 55 ± 17 anos ($p > 0,05$).

A idade media de pacientes com 249^{Ser} foi de $53,05 \pm 12,35$ anos contra $54,41 \pm 18,98$ anos em pacientes com a forma não mutada do códon 249, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,3825$).

A freqüência da mutação foi de 3/21 (14,28%) em mulheres e 18/53 (33,9%) em homens ($p = 0,076$).

A freqüência de 249^{Ser} em CHC provenientes de fígado cirrótico foi de 34,7% e 16% em tumores de fígado não cirrótico ($p=0,0760$).

A presença do DNA do VHB não esteve relacionada com a presença ou ausência de cirrose ($p = 0,2886$).

Nem a mutação 249^{Ser} nem a presença do DNA do VHB tiveram relação com a invasão vascular OR = 0,84 (IC = 0,3033 – 2,3266; $p=0.470$) e OR = 1.0102 (IC = 0.3039 – 3.3577; $p=0.611$) respectivamente.

Foi também observada a presença da mutação 249^{Ser} em um paciente acometido por Esquistossomose hepática.

A presença de mutação no codon 249 do TP53 foi encontrada em 28% dos casos de CHC estudados. Em um estudo anterior, Alves e colaboradores [24] constataram uma hiperexpressão da p53 em 35% dos casos de CHC em pacientes brasileiros. Entretanto a metodologia utilizada para a pesquisa foi a de imunohistoquímica, permitindo apenas averiguar a existência de mutação, e não o “hot-spot” preciso. Uma vez que no CHC o principal “hot-spot” do TP53 é o códon 249 pode-se afirmar que este resultado era esperado. É importante salientar que apesar do codon 249 ser responsável por 33% das mutações do TP53 no CHC ele não é o único hot-spot do TP53 neste tipo de tumor. Segundo o TP53 database [61] este gene possui 143 hot-spots além do codon 249 descritos no CHC. O segundo hot-spot mais freqüente no CHC é o codon 273 contribuindo com 4,14% das mutações do TP53. Este codon é seguido pelos 251 (2,14%) e 248 (2%). Os outros codons contribuem individualmente com menos de 2% das mutações, entretanto, ao todo suas contribuições somadas chegam a 60% das mutações do TP53.

Os resultados obtidos neste estudo e no de Alves e colaboradores [24] contrastam com dados publicados por estudos em países europeus, onde a mutações do TP53 no CHC é um evento extremamente raro. No estudo realizado por Kubicka na Alemanha [62] nenhuma das 20 amostras de CHC apresentou mutação do códon 249 do TP53, e entre elas apenas uma demonstrou possuir uma hiperexpressão de p53, avaliada por imunohistoquímica. Seqüenciado esta amostra, foi demonstrado que esta hiperexpressão era causada por uma mutação no códon 248. Da mesma forma,

um estudo realizado nos EUA [63] demonstrou que apesar de ser observado alterações imunohistoquímicas de p53 em 5/23 (21,74%) pacientes com CHC, todos os 5 casos eram selvagens para o códon 249. Esta mutação, entretanto já foi descrita em estudos nos EUA, mesmo em baixa frequência: Goldblum demonstrou em 1993 que 11% de suas amostras possuíam mutação do códon 249 [64].

Não existem muitos estudos sobre a frequência da mutação 249^{Ser} em países latino-americanos. No México foi descrita uma frequência desta mutação de 44% [57]. Esta alta frequência de 249^{Ser} pode estar relacionada com o fato de o México ser um dos maiores consumidores de milho do mundo (120 Kg per capita ao ano). Isso associado a um mau armazenamento e manipulação do milho e seus derivados resultam em uma grande ingestão de aflatoxina por parte da população. Além disso, existem ainda pontos falhos quanto às normas que regulam os níveis de AFB1 neste país. Por exemplo, até 2005 não existiam regras quanto à presença de aflatoxina no leite e seus derivados [65].

Por outro lado, em países com alta incidência de CHC a mutação do códon 249 desempenha um papel importante. Em Senegal este tipo de mutação chega a ser detectado em 67% dos pacientes [66]. Em regiões como Gâmbia (África) e Qidong (China) os índices deste tipo de mutação podem chegar a 50%. A frequência encontrada para essa mutação específica no presente estudo foi de 28%, muito superior a países europeus, porém abaixo de países onde a exposição à aflatoxina é endêmica.

Apesar da contaminação por aflatoxina no Brasil ser combatida pela ANVISA, entre o período de fevereiro de 2005 a julho de 2006, esta interditou 20 marcas de amendoins e derivados por apresentarem níveis de aflatoxina acima do permitido [48] - ainda são publicados estudos que constataam presença da AFB1 acima dos limites tolerados. Outro ponto que precisa ser salientado é que até 2002 o limite de aflatoxina em alimentos era de 30ppb, enquanto em países com baixa incidência de CHC, como os EUA, o limite é de 15ppb.

Não foi observada correlação estatística entre a presença da mutação do códon 249 e a presença do DNA do VHB nas amostras tumorais. Entretanto, neste ensaio apenas foi analisada a presença do DNA total do vírus, e não sua expressão gênica. Como é descrito em trabalhos anteriores o processo pelo qual o VHB leva ao surgimento da 249^{Ser} estaria relacionado à ação da proteína HBx (que não foi estudada neste projeto).

O fato dos resultados obtidos neste estudo apontarem que a 249^{Ser} está relacionada com tumores maiores e menos diferenciados poderia sugerir que esta mutação é um efeito tardio na carcinogênese hepática. Esta afirmação poderia soar contrária à hipótese de que a AFB1 é um fator causal do CHC no Brasil. Entretanto, existem estudos relatando as vantagens seletivas que células portadoras destas mutações possuem. Entre elas, podem ser citadas: Aumento do crescimento celular avaliado *in vitro* após a transfeção de células com 249^{Ser} em células normais [67], inibição da via da apoptose mediada pela forma não

mutada da p53 [68] e finalmente a forma 249^{Ser} da p53 possui maior eficiência que as outras mutações em suprimir a atividade de p53 normal [69].

Oda et al [70] já haviam descrito que mutações no gene TP53 estavam associadas a uma menor diferenciação do CHC. Mais tarde Ng [71, 72] chegou a uma mesma conclusão. Entretanto, em ambos os trabalhos havia uma baixa frequência da mutação 249^{Ser} e os dados foram relacionados à mutações do TP53 de maneira geral, e não especificamente ao códon 249. Apesar de não ter demonstrado significância estatística, foi observado uma tendência de que a mutação foi mais frequente em fígado cirrótico em relação ao não cirrótico. Mesma tendência foi demonstrada quanto ao sexo: a mutação foi mais frequente em homens em relação às mulheres ($p = 0,076$).

A presença da mutação 249^{Ser} em um paciente acometido por esquistossomose hepática sugere que o *Schistosoma* pode contribuir para a carcinogênese hepática via TP53 e pode ter um fator sinérgico a AFB1 como descrito por Habib [46]. Entretanto em nossa casuística apenas um paciente era portador deste parasita, demandando novos estudos para avaliar a relação *Schistosoma*/AFB1 no CHC.

Devido à falta de tempo, até o fechamento desta dissertação não foi possível realizar um ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão da p53 nesta casuística. Com os dados de imunohistoquímica seria possível avaliar qual amostra que - apesar de não apresentar mutação no códon 249 - possui hiperexpressão da p53. Essa informação seria útil para direcionar a pesquisa de outros “hot-spots” do TP53 relacionados com o CHC em pacientes no Brasil.

Como grupo controle neste estudo foram utilizadas amostras de fígado necropsiado de indivíduos sem hepatopatias, para avaliar a presença da mutação no fígado saudável. Entretanto, um grupo interessante para ser utilizado (tendo em vista os dados obtidos) seriam amostras de fígado cirrótico ou com hepatites crônicas. Como a mutação estudada é um fator causal do CHC, ela teoricamente deveria estar presente em algumas amostras que possivelmente evoluirão para o CHC.

Uma vez que as amostras parafinadas obtidas para o presente estudo datam de 1996-2005, foi observado um baixo rendimento referente à concentração de DNA obtida, além disso o DNA apresentou-se extremamente degradado. Comparando o DNA extraído de parafina com DNA extraído de sangue periférico armazenado a -20°C fica evidente a diferença de integridade e de quantidade.

Figura 15: Comparação entre DNA extraído de parafina (P) e de sangue periférico (SP) armazenado a -20 °C. O marcador de peso molecular e de concentração utilizado foi o Low Mass Ladder (LM)

Isso pode ter sido um dos fatores responsáveis pela baixa eficiência da reação de PCR em algumas amostras, inclusive pela ausência de amplificação de 6 delas.

A degradação excessiva do DNA não é apenas pelo fato da idade da amostra: um dos maiores motivos deste fenômeno é o período em que a peça cirúrgica fica imersa em formol. Após 8 dias em formol tamponado, o DNA de uma peça não produz fragmentos de PCR maiores que 989pb; após 30 dias em formol tamponado, só é possível amplificar fragmentos de até 268pb [73].

No Departamento de Patologia do HC-FMUSP não há um critério rígido de permanência da peça no formol. A amostra fica no mínimo 24h em formol podendo ficar até 10 dias. Este fato pode comprometer a integridade do material genético já que uma armazenagem em formol (mesmo que

tamponado) por um período superior a uma semana é suficiente para a degradação dos ácidos nucleicos [74].

Outro obstáculo enfrentado neste estudo foi em relação à obtenção de dados clínicos dos pacientes. Como a maioria dos pacientes já havia falecido, seus prontuários encontravam-se inativos, além disso, nem todos os prontuários possuíam as informações necessárias.

6 CONCLUSÃO

1- Foi possível concluir neste estudo que no Brasil a mutação pontual no códon 249 do TP53 é um fator significativo na carcinogênese do CHC estando presente em 28% das amostras, sugerindo a presença de aflatoxina nos alimentos. Esta frequência é maior que a encontrada em países com baixa exposição à AFB1, porém menor que em países com alta exposição.

2- Neste estudo a presença de VHB não demonstrou estar relacionada com o surgimento da mutação no códon 249 do TP53.

3- A mutação está associada a uma forma maior e menos diferenciada de CHC.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology*. 2001 Sep;2(9):533-43.
- [2] Nita ME, Alves VA, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2002 Jan-Feb;44(1):39-48.
- [3] Bruix J, Llovet JM. Hepatocellular carcinoma: is surveillance cost effective? *Gut*. 2001 Feb;48(2):149-50.
- [4] Rocken C, Carl-McGrath S. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2001;19(4):269-78.
- [5] Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 1991 Apr 4;350(6317):427-8.
- [6] Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991 Apr 4;350(6317):429-31.
- [7] Bosch FX, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Seminars in liver disease*. 1999;19(3):271-85.
- [8] Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, et al. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. *Brescia HCC Study. International journal of cancer*. 1999 May 31;81(5):695-9.
- [9] Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, et al. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2004 Mar;39(3):826-34.
- [10] Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3756-70.
- [11] El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatology Res*. 2007 Sep;37 Suppl 2:S88-94.

- [12] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76.
- [13] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S27-34.
- [14] El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *The New England journal of medicine*. 1999 Mar 11;340(10):745-50.
- [15] Gallus S, Bertuzzi M, Tavani A, Bosetti C, Negri E, La Vecchia C, et al. Does coffee protect against hepatocellular carcinoma? *British journal of cancer*. 2002 Oct 21;87(9):956-9.
- [16] Inoue M, Yoshimi I, Sobue T, Tsugane S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005 Feb 16;97(4):293-300.
- [17] Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, et al. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *British journal of cancer*. 2005 Sep 5;93(5):607-10.
- [18] Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer research*. 1992 Dec 1;52(23):6525-30.
- [19] Contran RS, Kumar V, Collins T. Neoplasia. In: Contran RS, Kumar V, Collins T, eds. *Robbins: Patologia Estrutural e Funcional* 6ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 2000:233-95.
- [20] Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2000 Jan;33(1):1-6.
- [21] Kubbutat MH, Vousden KH. Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Molecular medicine today*. 1998 Jun;4(6):250-6.
- [22] Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992 Aug 21;70(4):523-6.
- [23] Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Dec 17;274(51):36031-4.
- [24] Alves VA, Nita ME, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Wakamatsu A, Lehrbach DM, et al. p53 immunostaining pattern in Brazilian patients with hepatocellular carcinoma. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2004 Jan-Feb;46(1):25-31.

- [25] Tolbert D, Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, De Voe G, MacDonald J, Benedetti J, et al. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. *Cancer Causes Control*. 1999 Jun;10(3):227-31.
- [26] IARC TP53 Database. [cited; Available from: <http://www-p53.iarc.fr>]
- [27] Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Munoz A, Kensler TW, et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis*. 2003 Oct;24(10):1657-63.
- [28] Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trepo C, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from The Gambia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 Jan 19;92(2):148-53.
- [29] Turner PC, Sylla A, Kuang SY, Marchant CL, Diallo MS, Hall AJ, et al. Absence of TP53 codon 249 mutations in young Guinean children with high aflatoxin exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Aug;14(8):2053-5.
- [30] Stern MC, Umbach DM, Yu MC, London SJ, Zhang ZQ, Taylor JA. Hepatitis B, aflatoxin B(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Jun;10(6):617-25.
- [31] Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Human mutation*. 2003 Mar;21(3):201-16.
- [32] Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer research*. 2001 Sep 1;61(17):6350-5.
- [33] Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Aflatoxin M(1) and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. *Food additives and contaminants*. 2005 May;22(5):457-62.
- [34] Yu Y, Wan S, Tan P, Wan X, Miao Z. [Study on determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts using OASIS HLB cartridges with post-column derivatization HPLC and fluorescence detection]. *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui*. 2004 Nov;22(6):658.
- [35] Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S72-8.

- [36] Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2001 Apr;22(4):535-45.
- [37] Smela ME, Hamm ML, Henderson PT, Harris CM, Harris TM, Essigmann JM. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 May 14;99(10):6655-60.
- [38] Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*. 2003 Jul;16(3):497-516.
- [39] Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1996 Feb;74(2):203-9.
- [40] Tiemersma EW, Omer RE, Bunschoten A, van't Veer P, Kok FJ, Idris MO, et al. Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Jul;10(7):785-91.
- [41] Moncada C. Aductos, mecanismos patogénicos. *Gastr Latinoam*. 2001;1(13):37-9.
- [42] Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer research*. 1991 Nov 15;51(22):6185-9.
- [43] Denissenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, Gerber N, Pfeifer GP. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutation research*. 1999 Apr 6;425(2):205-11.
- [44] Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouet S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation research*. 1998 Jun 18;402(1-2):121-8.
- [45] Roebuck BD, Curphey TJ, Li Y, Baumgartner KJ, Bodreddigari S, Yan J, et al. Evaluation of the cancer chemopreventive potency of dithiolethione analogs of oltipraz. *Carcinogenesis*. 2003 Dec;24(12):1919-28.
- [46] Habib SL, Said B, Awad AT, Mostafa MH, Shank RC. Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. *Cancer detection and prevention*. 2006;30(6):491-8.

- [47] Resolução RDC numero 274, 15/10/2002. Diário Oficial da União 2002.
- [48] Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. [cited 15/01/2007]; Available from: <http://www.anvisa.gov.br/inspecao/alimentos/interditados.pdf>
- [49] Sabino M, Prado G, Inomata EI, Pedroso Mde O, Garcia RV. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. Food additives and contaminants. 1989 Jul-Sep;6(3):327-31.
- [50] Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature. 1991 May 23;351(6324):317-20.
- [51] Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. Journal of virology. 1996 Jul;70(7):4558-66.
- [52] Hosono S, Chou MJ, Lee CS, Shih C. Infrequent mutation of p53 gene in hepatitis B virus positive primary hepatocellular carcinomas. Oncogene. 1993 Feb;8(2):491-6.
- [53] Qu JH, Zhu MH, Lin J, Ni CR, Li FM, Zhu Z, et al. Effects of hepatitis B virus on p53 expression in hepatoma cell line SMMU-7721. World J Gastroenterol. 2005 Oct 21;11(39):6212-5.
- [54] Lunn RM, Zhang YJ, Wang LY, Chen CJ, Lee PH, Lee CS, et al. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. Cancer research. 1997 Aug 15;57(16):3471-7.
- [55] Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, Szymanska K, Whittle H, Goedert JJ, et al. 249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2005 Sep 1;24(38):5858-67.
- [56] Carrilho FJ, Alves VAF, Mello ES, Vezozzo DP. Carcinoma Hepatocelular. In: Gayotto LCC, Alves VAF, eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu 2001:997-1015.
- [57] Soini Y, Chia SC, Bennett WP, Groopman JD, Wang JS, DeBenedetti VM, et al. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. Carcinogenesis. 1996 May;17(5):1007-12.
- [58] Rodriguez DB, Sabino M. Mycotoxin reasearch in Brazil: the last decade in review. Brazilian Jourbal of Microbiology. 2002;33:1-11.

- [59] Kimbi GC, Kew MC, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. 249ser p53 mutation in the serum of black southern African patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005 Aug;20(8):1185-90.
- [60] Huang XH, Sun LH, Lu DD, Sun Y, Ma LJ, Zhang XR, et al. Codon 249 mutation in exon 7 of p53 gene in plasma DNA: maybe a new early diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in Qidong risk area, China. *World J Gastroenterol*. 2003 Apr;9(4):692-5.
- [61] [cited; Available from: <http://www-p53.iarc.fr/Graph.asp>
- [62] Kubicka S, Trautwein C, Schrem H, Tillmann H, Manns M. Low incidence of p53 mutations in European hepatocellular carcinomas with heterogeneous mutation as a rare event. *Journal of hepatology*. 1995 Oct;23(4):412-9.
- [63] Hoque A, Patt YZ, Yoffe B, Groopman JD, Greenblatt MS, Zhang YJ, et al. Does aflatoxin B1 play a role in the etiology of hepatocellular carcinoma in the United States? *Nutrition and cancer*. 1999;35(1):27-33.
- [64] Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 1993 Dec;17(12):1244-51.
- [65] Garcia S, Heredia N. Mycotoxins in Mexico: epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*. 2006 Sep;162(3):255-64.
- [66] Coursaget P, Depril N, Chabaud M, Nandi R, Mayelo V, LeCann P, et al. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas from Senegal. *British journal of cancer*. 1993 Jun;67(6):1395-7.
- [67] Ponchel F, Puisieux A, Tabone E, Michot JP, Froschl G, Morel AP, et al. Hepatocarcinoma-specific mutant p53-249ser induces mitotic activity but has no effect on transforming growth factor beta 1-mediated apoptosis. *Cancer research*. 1994 Apr 15;54(8):2064-8.
- [68] Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, et al. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer research*. 1995 Dec 15;55(24):6012-6.
- [69] Forrester K, Lupold SE, Ott VL, Chay CH, Band V, Wang XW, et al. Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent. *Oncogene*. 1995 Jun 1;10(11):2103-11.

- [70] Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 1992 Nov 15;52(22):6358-64.
- [71] Ng IO, Chung LP, Tsang SW, Lam CL, Lai EC, Fan ST, et al. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese. *Oncogene*. 1994 Mar;9(3):985-90.
- [72] Ng IO, Srivastava G, Chung LP, Tsang SW, Ng MM. Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people. *Cancer*. 1994 Jul 1;74(1):30-7.
- [73] Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR methods and applications*. 1991 Aug;1(1):46-50.
- [74] Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001 Dec;25(4):409-18.

1. Comparação entre as amostras de CHC do HC-FMUSP e do HAOC

A comparação das amostras recebidas do DAP – HCFMUSP e do CICAP – HAOC está descrita abaixo.

	HC-FMUSP	HAOC	p
Casuística	51 amostras	23 amostras	-
Idade média (anos)	50,28($\pm$ 18,5)	61,82($\pm$ 11,4)	0,007
Mulheres	17	4	0,12
Presença de cirrose	31	18	0,141
Tamanho do tumor	8,08	3,22	0,0015
Tumor Grau 4	7	2	0,4
Tumor Grau 3	26	8	0,14
Tumor Grau 2	13	12	0,024
Tumor Grau 1	0	1	-
249^{Ser}	17	4	0,12
Presença de VHB	11	2	0,15

2. Distribuição das 748 mutações do TP53 descritas no CHC

Número do Códon	Numero de Mutações	%
35	1	0.13368983957219252
56	1	0.13368983957219252
62	1	0.13368983957219252
68	3	0.40106951871657753
73	1	0.13368983957219252
100	1	0.13368983957219252
106	2	0.26737967914438504
110	3	0.40106951871657753
111	3	0.40106951871657753
118	1	0.13368983957219252
130	2	0.26737967914438504
131	5	0.6684491978609626
132	2	0.26737967914438504
133	3	0.40106951871657753
135	3	0.40106951871657753
136	1	0.13368983957219252
137	2	0.26737967914438504
138	1	0.13368983957219252
139	2	0.26737967914438504
140	1	0.13368983957219252
141	3	0.40106951871657753
143	1	0.13368983957219252
144	1	0.13368983957219252
145	1	0.13368983957219252
146	1	0.13368983957219252
147	1	0.13368983957219252
151	2	0.26737967914438504
152	3	0.40106951871657753
154	4	0.5347593582887701
155	1	0.13368983957219252
156	1	0.13368983957219252
157	17	
158	3	0.40106951871657753
159	11	14.705882352941100
161	3	0.40106951871657753
162	2	0.26737967914438504

163	6	0.8021390374331551
164	2	0.26737967914438504
166	15	20.053475935828800
167	1	0.13368983957219252
168	1	0.13368983957219252
170	1	0.13368983957219252
171	2	0.26737967914438504
172	3	0.40106951871657753
173	1	0.13368983957219252
174	5	0.6684491978609626
175	12	16.042780748663100
176	9	12.032085561497300
177	2	0.26737967914438504
179	7	0.9358288770053476
181	1	0.13368983957219252
184	3	0.40106951871657753
187	1	0.13368983957219252
189	3	0.40106951871657753
192	5	0.6684491978609626
193	5	0.6684491978609626
194	2	0.26737967914438504
195	2	0.26737967914438504
196	3	0.40106951871657753
197	1	0.13368983957219252
198	2	0.26737967914438504
199	1	0.13368983957219252
200	1	0.13368983957219252
204	2	0.26737967914438504
205	3	0.40106951871657753
206	1	0.13368983957219252
208	1	0.13368983957219252
210	2	0.26737967914438504
211	1	0.13368983957219252
213	6	0.8021390374331551
214	5	0.6684491978609626
215	5	0.6684491978609626
216	2	0.26737967914438504
217	1	0.13368983957219252
218	1	0.13368983957219252
220	10	13.368983957219200
221	3	0.40106951871657753

226	2	0.26737967914438504
227	1	0.13368983957219252
230	1	0.13368983957219252
232	2	0.26737967914438504
235	2	0.26737967914438504
236	5	0.6684491978609626
237	2	0.26737967914438504
238	4	0.5347593582887701
239	7	0.9358288770053476
240	1	0.13368983957219252
241	6	0.8021390374331551
242	10	13.368983957219200
243	3	0.40106951871657753
244	14	18.716577540106900
245	9	12.032085561497300
246	5	0.6684491978609626
247	3	0.40106951871657753
248	15	20.053475935828800
249	248	33.155080213903700
250	4	0.5347593582887701
251	16	21.390374331550800
252	1	0.13368983957219252
254	1	0.13368983957219252
255	2	0.26737967914438504
257	2	0.26737967914438504
258	7	0.9358288770053476
259	2	0.26737967914438504
260	1	0.13368983957219252
262	1	0.13368983957219252
265	1	0.13368983957219252
266	6	0.8021390374331551
267	3	0.40106951871657753
270	1	0.13368983957219252
271	3	0.40106951871657753
272	6	0.8021390374331551
273	31	4.144385026737960
274	5	0.6684491978609626
75	5	0.6684491978609626
276	1	0.13368983957219252
277	1	0.13368983957219252
278	5	0.6684491978609626

280	7	0.9358288770053476
281	5	0.6684491978609626
282	7	0.9358288770053476
283	2	0.26737967914438504
285	6	0.8021390374331551
286	8	10.695187165775400
287	2	0.26737967914438504
288	2	0.26737967914438504
291	1	0.13368983957219252
292	1	0.13368983957219252
294	2	0.26737967914438504
296	1	0.13368983957219252
298	2	0.26737967914438504
300	1	0.13368983957219252
305	1	0.13368983957219252
306	2	0.26737967914438504
308	1	0.13368983957219252
314	1	0.13368983957219252
317	1	0.13368983957219252
319	1	0.13368983957219252
323	1	0.13368983957219252
324	1	0.13368983957219252
330	2	0.26737967914438504
337	3	0.40106951871657753
339	2	0.26737967914438504
342	6	0.8021390374331551

3. Dados dos Pacientes CHC

Caso CHC	Idade	Sexo	Cirrose	Grau	Tamanho Tumor (cm)	Invasão Vascular	Etiologia	249Ser	VHB
1	61	0	0	2	9	0	na	0	0
2	55	1	0	4	12.5	1	2	1	1
3	7	1	0	4	0,5	0	7	0	0
4	11	1	0	2	4	0	2	0	0
5	76	1	0	2	9	0	2	0	0
6	42	1	0	2	1.0	1	7	1	0
7	na	1	1	3	10	0	7	1	0
8	28	0	0	3	9.0	1	2	0	0
9	62	1	1	2	4.0	0	2	1	1
10	64	1	1	3	2.3	0	1	0	0
11	62	1	1	4	13,5	1	na	1	0
12	65	1	1	2	1.5	0	1	0	0
13	34	0	0	3	12	0	na	0	0
14	66	1	1	3	15	1	4	0	0
15	73	1	1	2	4	1	1	0	0
16	52	1	1	2	1.5	0	1	0	0
17	64	0	1	3	3	0	7	0	0
18	62	0	1	3	3	0	1	0	0
19	52	1	1	3	7	1	1	0	0
20	18	1	1	3	2.5	0	7	0	0
21	64	1	1	2	na	0	1	1	0
22	37	0	1	4	na	1	2	0	1
23	48	1	1	3	3	0	5	1	0
24	53	0	1	3	2.5	0	1	0	1
25	12	1	0	4	13	1	7	0	0
26	41	1	1	4	20	1	1	1	0
27	54	1	1	3	20	1	2	1	0
28	66	0	0	3	11	1	na	0	0
29	55	1	1	2	1.7	0	3	1	1
30	58	1	0	2	13	1	7	0	0
31	58	0	1	3	na	0	na	1	0
32	59	1	0	2	5	0	na	0	0
33	21	1	1	3	18	1	2	1	0
34	39	1	1	3	3	0	1	0	0
35	64	0	0	3	3	1	1	0	0
36	17	0	0	2	17	1	1	0	0
37	39	1	0	2	23	0	7	1	0
38	64	0	1	4	3.0	0	1	1	0
39	24	0	0	2	24	1	na	0	0

40	50	0	1	3	3.2	1	2	0	1
41	69	0	0	3	6.4	1	7	0	0
42	67	1	1	3	16	0	2	1	1
43	80	1	1	2	2.3	0	1	0	0
44	30	1	0	2	16	0	2	0	1
45	54	1	1	3	3.0	1	2	0	1
46	80	0	1	3	4.0	1	1	0	0
47	45	1	0	3	7.0	1	3	0	1
48	54	1	1	3	4.0	0	1	0	0
49	49	1	1	3	na	1	3	0	1
50	69	0	0	3	12	1	na	1	0
51	49	1	1	2	1.8	0	1	1	0
52	na	na	1	na	2.0	1	na	na	Na
53	74	1	1	2	5.9	1	na	0	0
54	67	1	1	2	2.8	0	na	0	0
55	46	1	1	2	4	1	na	0	0
56	70	0	1	2	2	0	1	0	0
57	na	na	0	na	na	na	na	na	Na
58	na	na	0	3	3.2	1	4	na	Na
59	55	1	0	2	na	0	na	0	0
60	71	1	0	3	3.5	1	na	0	0
61	58	1	0	3	6	0	na	0	0
62	53	1	1	4	3	1	1	1	0
63	49	1	1	3	2.5	0	2	0	1
64	48	1	1	2	1.2	0	na	0	0
65	48	1	1	2	4.5	0	1	0	0
66	na	1	1	4	4	1	4	na	Na
67	na	na	na	na	na	na	na	na	Na
68	35	1	1	2	3	0	na	1	0
69	57	1	1	3	2	0	1	0	0
70	73	1	1	3	2.7	0	2	0	1
71	77	0	1	2	2.1	0	1	0	0
72	na	na	na	na	na	na	na	na	Na
73	65	1	1	2	4	1	1	0	0
74	71	1	1	1	1,2	0	1	0	0
75	77	1	0	3	na	1	na	0	0
76	70	0	1	3	1.5	1	1	0	0
77	72	1	0	2	1.3	1	1	0	0
78	63	0	1	2	1.6	1	1	0	0
79	59	1	1	4	11	1	na	1	0
80	64	1	1	3	2	0	na	1	0

na = Não avaliado

■ = Excluído por não apresentar amplificação na PCR