

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

NAYRA SOARES DO AMARAL

**ESPECTRO DE MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS AO ADENOCARCINOMA DE
PÂNCREAS EM PACIENTES DO SUDESTE BRASILEIRO.**

BELO HORIZONTE
AGOSTO DE 2013

NAYRA SOARES DO AMARAL

**ESPECTRO DE MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS AO ADENOCARCINOMA DE
PÂNCREAS EM PACIENTES DO SUDESTE BRASILEIRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Luiz Armando Cunha De Marco

Co-Orientadoras: Profa. Vivian Resende

Profa. Luciana Bastos Rodrigues

BELO HORIZONTE
AGOSTO DE 2013

“Talvez não tenha conseguido fazer o meu melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a sua concretização.

Agradeço ao meu orientador professor Luiz Armando De Marco, pela confiança, disponibilidade, colaboração e conhecimentos transmitidos.

À professora Luciana Bastos Rodrigues, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho.

À professora Vivian Resende, obrigada pela contribuição essencial para este trabalho, além da grande amizade e entusiasmo.

Ao professor José Sebastião pela colaboração que muito nos enriqueceu.

Agradeço a professora Paula Vidigal por se disponibilizar e nos auxiliar com a anatomia patológica.

A todas as colegas do laboratório: Cristina, Patrícia, Mariana, Fanciele, Helena, Lucélia, Flávia Melo, Flavia Lage, Flavia Passos, pelos bons momentos, trocas de experiências e principalmente pelas amizades que ficarão. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas do programa Medicina Molecular pela ajuda e cooperação sempre que precisei.

Agradeço muito àqueles que me incentivaram a entrar para o mestrado. Juliana Carneiro, obrigada por me indicar o lugar certo! Juliana Pimenta, obrigada pelos ensinamentos além da Biologia Molecular.

Aos pacientes que participaram dessa pesquisa.

Aos meus pais por serem exemplos de dedicação. Não consigo expressar em palavras o meu amor e gratidão por vocês. Aos meus irmãos e familiares pelo carinho e apoio.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento.

RESUMO

Introdução: O adenocarcinoma é o tipo histológico mais prevalente entre os tumores de pâncreas (90%) e possui alta taxa de mortalidade devido ao seu mau prognóstico. A importância de se compreender a carcinogênese pancreática é determinar novos alvos terapêuticos e biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce. A progressão do adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é relacionada ao acúmulo de mutações em lesões pré cancerígenas como a Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN). Alterações em oncogenes como: K-ras, EGFR, BRAF, PIK3CA e perda de função em supressores tumorais como CDKN2A e p53 estão envolvidas no desenvolvimento do tumor. Nosso objetivo foi avaliar a frequência de mutações nos genes envolvidos com a progressão do câncer e correlacioná-las com os achados clínicos e a ancestralidade genômica

Material e Método: A análise das mutações foi feita por sequenciamento e a ancestralidade através de 40 indels bialélicos em 23 pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático.

Resultados: Dentre todos os genes estudados, as mutações no códon 12 de K-ras foram as mais frequentes (60%) em nossa amostragem. Em PIK3CA, identificamos uma mutação não descrita (M983K) em um paciente. Mutações nos genes EGFR, BRAF, PIK3CA, CDKN2A e p53 não foram frequentes em nosso estudo. A ancestralidade genômica dos nossos pacientes não diferiu do grupo controle, contudo, observamos que os pacientes com maior componente ancestral africano apresentaram mutações em K-ras.

Conclusão: Observamos em nossos pacientes uma menor frequência de mutações em K-ras em relação à maioria dos resultados já descritos, porém mais aproximada à da população coreana, além disto, nossas amostras apresentaram menor frequência de mutações em CDKN2A e p53 em relação a outras populações já estudadas, reforçando a importância de se levar em consideração diferenças étnicas nos estudos envolvendo alterações genéticas em pacientes com adenocarcinoma pancreático. Devido à alta miscigenação da população brasileira, é interessante que outros estudos como este sejam realizados em outras regiões do país, para caracterizar o perfil genético da população brasileira com adenocarcinoma pancreático.

Palavras chaves: Adenocarcinoma pancreático, K-ras, EGFR, BRAF, PIK3CA, CDKN2A, p53, mutações, ancestralidade genômica.

ABSTRACT

Introduction: Adenocarcinoma is the most prevalent histological type among tumors of the pancreas (90 %) and has high mortality. The importance of understanding the pancreatic carcinogenesis is to determine new therapeutic targets and biomarkers to assist in early diagnosis. The progression of pancreatic ductal adenocarcinoma involved the accumulation of mutations in pre- cancerous lesions, for example, the pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) . Molecular alterations in oncogenes such as K-ras, EGFR , BRAF , PIK3CA and loss function of tumor suppressor, such as CDKN2A and p53 are involved in tumor development. Our objective was to evaluate the frequency of mutations in genes involved in cancer progression and correlate them with the clinical and genomic ancestry

Material and Methods: Mutation analysis was made by direct sequencing in 23 samples with pancreatic adenocarcinoma and ancestry was analyzed using 40 biallelic indels.

Results: Among all the genes, mutations in codon 12 of K - ras were the most frequent (60 %). In PIK3CA, was identified a new mutation in one patient, do not described in the literature (M983K). Mutations in EGFR , BRAF , PIK3CA , CDKN2A and p53 were infrequent in our study . The genomic ancestry of our patients did not differ from the control group, however, we observed that all patients with higher African ancestral component showed mutations in K - ras .

Conclusion: We observed in our patients a lower frequency of mutations in K - ras in relation to most of the results already described in other countries, but closer to the Korean population , and our samples showed a lower frequency of mutations in CDKN2A and p53 in relation to other populations, reinforcing the importance of th ethnic differences in studies involving genetic alterations in patients with pancreatic adenocarcinoma . Due to the high miscegenation of the Brazilian population, it is interesting that other studies like this are done in other regions of the country, with the objective of to characterize the genetic profile of Brazilian population with pancreatic adenocarcinoma .

Key words: pancreatic adenocarcinoma , K - ras , EGFR , BRAF , PIK3CA , CDKN2A , p53 mutations , genomic ancestry

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Pâncreas..... | 15 |
| Figura 2 Modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma pancreático. | 23 |
| Figura 3 Regulação da atividade de <i>K-ras</i> | 24 |
| Figura 4 Via de sinalização celular: progressão, transcrição, proliferação, sobrevivência, invasão e motilidade. | 25 |
| Figura 5 Papel de P16 na regulação do ciclo celular..... | 31 |
| Figura 6 Indução de p53 pela via de ARF..... | 33 |
| Figura 7 Eletroferograma mostrando a mutação G12V em heterozigose no códon 12 de <i>K-ras</i> | 45 |
| Figura 8 Eletroferograma mostrando a mutação G12R em heterozigose no códon 12 de <i>K-ras</i> | 45 |
| Figura 9 Eletroferograma mostrando a mutação G12D em heterozigose no códon 12 de <i>K-ras</i> | 46 |
| Figura 10 Eletroferograma mostrando a mutação G12S em heterozigose no códon 12 de <i>K-ras</i> | 46 |
| Figura 11 Gel de acrilamida representando a detecção de mutação em <i>K-ras</i> , códon 12, pela técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima MVAI | 48 |
| Figura 12 Eletroferograma mostrando a mutação P753S em heterozigose no éxon 19 de EGFR | 48 |
| Figura 13 Impacto da mutação P753S em EGFR..... | 49 |
| Figura 14 Eletroferograma mostrando a mutação não descrita, M983K, em heterozigose no éxon 20 de PIK3CA | 49 |
| Figura 15 Impacto de M983K em PIK3CA | 50 |
| Figura 16 Sequências de aminiácidos na região mutada de PIK3CA entre várias espécies . | 50 |
| Figura 17 Eletroferograma mostrando a alteração A148T em heterozigose no éxon 2 de CDKN2A | 51 |
| Figura 18 Impacto de A148T em CDKN2A | 51 |
| Figura 19 Eletroferograma mostrando a mutação R273C em heterozigose no éxon 8 de P53 | 51 |
| Figura 20 Eletroferograma mostrando a mutação R306* em heterozigose no éxon 8 de P53 | 52 |
| Figura 21 Impacto da mutação R273C em p53..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Tipos de tumores endócrinos de acordo com a origem celular (modificada de Beger <i>et al.</i> , 2008). | 21 |
| Tabela 2 Características da amplificação por PCR dos genes estudados | 43 |
| Tabela 3: Características clínicas dos pacientes com adenocarcinoma pancreático | 44 |
| Tabela 4: Avaliação do dano protéico causado pelas mutações encontradas no códon 12 de K-ras..... | 46 |
| Tabela 5 Mutações e polimorfismos encontrados | 53 |
| Tabela 6 Índices de ancestralidade genômica dos pacientes com adenocarcinoma pancreático..... | 55 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 Taxa de sobrevivência média em pacientes com diferentes tipos de tumores do trato gastrointestinal | 17 |
| Gráfico 2 Distribuição das mutações no códon 12 de K-ras | 47 |
| Gráfico 3 Análise da ancestralidade genômica dos pacientes com câncer de pâncreas..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ADP | Adenocarcinoma Ductal Pancreático |
| ARF | “Alternate Reading Frame” |
| BRAF | “B-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| BRCA2 | “Breast câncer 2” |
| CCA | Carcinoma de células acinares |
| CDKN2A | Inibidor de quinase dependente de ciclina 2 ^a |
| CDKs | Quinases dependentes de ciclina |
| CFRT | “Cystic Fibrosis Transmembrane” |
| CP | Câncer de Pâncreas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) |
| EDTA | Ácido etileno di-amino tetra-acético (“ethylenediaminetetraacetic acid) |
| EGFR | “Epidermal Growth Factor Receptor |
| FMRP-USP | Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| GAPs | Proteínas ativadores de GTPase |
| GDP | Guanosina-difosfato |
| GEFs | Fatores de troca do nucleotídeo guanidina |
| GTP | Guanosina-trifosfato |
| HC | Hospital das Clínicas |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| Indels | “Short insertion/deletion polymorphisms” |
| kDa | Kilodaltons |
| K-ras | “V-Ki-ras2 Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog” |
| M | Molar |
| MDM2 | “Mouse double minute 2 homolog” |
| MEN1 | Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| Mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| P14 | Proteína 14 |
| P16 | Proteína 16 |
| P53 | Proteína 53 |
| PanIN | Neoplasia Intraepitelial Pancreática |
| Pb | Pares de base |
| PBS | Tampão salino fosfatado (“phosphate buffered saline”) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”) |
| PCR-RLFP | Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição |
| PIK3 | “Phosphatidylinositol 3 kinase” |
| PIK3CA | “Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha” |
| Rb | Proteína do retinoblastoma |
| SMAD4 | “SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)” |
| TBE | Tris Base EDTA |
| TE | Tumores endócrinos |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| TGF | Fator transformador de crescimento |

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| TK | Tirosina quinase |
| TM | Temperatura de anelamento |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UICC | União Internacional Contra o Câncer |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Pâncreas | 14 |
| 1.2 Câncer de Pâncreas | 15 |
| 1.2.1 Fatores de Risco | 17 |
| 1.2.2 Tratamento..... | 20 |
| 1.2.3 Classificações Histológicas | 21 |
| 1.3 Alterações genéticas no adenocarcinoma pancreático | 23 |
| 1.3.1 K-ras..... | 23 |
| 1.3.2 EGFR | 26 |
| 1.3.3 BRAF | 27 |
| 1.3.4 PIK3CA | 28 |
| 1.3.5 CDKN2A (p16)..... | 30 |
| 1.3.6 P53..... | 31 |
| 1.4 Impacto da etnia no câncer de pâncreas..... | 33 |
| 2 OBJETIVOS..... | 35 |
| 3 MATEIRIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1 Pacientes e controles | 36 |
| 3.2 Coleta das Amostras..... | 37 |
| 3.3 Coleta dos dados clínicos | 37 |
| 3.4 Análises moleculares | 38 |
| 3.4.1 Extração de DNA do tumor | 38 |
| 3.4.2 Amplificação e sequenciamento das amostras..... | 38 |
| 3.4.3 Análise de mutação do códon de K-ras por PCR - RFLP | 40 |
| 3.4.5 Análises de Ancestralidade | 41 |
| 3.5 Análises Estatísticas..... | 42 |
| 4 RESULTADOS..... | 44 |
| 4.1 Características clínicas dos pacientes..... | 44 |
| 4.2 Análise de Seqüenciamento | 45 |
| 4.2.1 K-ras..... | 45 |
| 4.2.2 EGFR | 48 |
| 4.2.3 BRAF | 49 |
| 4.2.4 PIK3CA | 49 |
| 4.2.5 CDKN2A | 50 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4.2.6 P53..... | 51 |
| 4.3 Análise de Ancestralidade | 53 |
| 5 DISCUSSÃO | 56 |
| 6 CONCLUSÕES | 63 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |
| ANEXO 1..... | 75 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas

O pâncreas é um órgão que possui funções endócrinas e exócrinas. A porção exócrina do pâncreas é composta por células acinares que produzem e secretam enzimas digestivas, tais como lipases e nucleases, e por células ductais que transportam as enzimas acinares, íons e bicarbonato ao intestino para auxiliarem na digestão dos alimentos (Perera e Bardeesy, 2012). O tecido pancreático exócrino compreende 90-95% do órgão, já a região endócrina é composta pelas ilhotas de Langerhans, que secretam hormônios responsáveis pelo controle do nível de glicose no organismo (Beger *et al.*, 2008). As principais células endócrinas são α , β , δ e PP que produzem glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. As células α representam 15-20 % das células endócrinas, células β compõem 60-80%, células δ 5-10% e as células PP constituem menos de 2% do pâncreas endócrino. A insulina é liberada em resposta ao aumento dos níveis de glicose no sangue após a ingestão dos alimentos e estimula o armazenamento da glicose no fígado, músculos e tecido adiposo. A liberação de glucagon é estimulada em estado de hipoglicemia, estimulando a gliconeogênese e a glicogenólise para restabelecer os níveis de glicose na corrente sanguínea. A somatostatina e o polipeptídeo pancreático também estão envolvidos no controle da glicemia (Edlund, 2002).

Anatomicamente, o pâncreas é dividido em três principais regiões: cabeça, corpo e cauda e está localizado no retroperitônio, posteriormente ao estômago, entre o duodeno e o baço (Beger *et al.*, 2008). A cabeça corresponde à sua maior parte e está intimamente associada com a superfície côncava do duodeno. A cauda está na extremidade oposta do órgão e o corpo compreende a região entre a cabeça e a cauda. Entre a cabeça e o corpo ocorre um estreitamento referido como colo do pâncreas, o processo uncinado é uma projeção da parte inferior da cabeça e se localiza posteriormente à artéria mesentérica superior. (Figura 1) (Beger *et al.*, 2008).

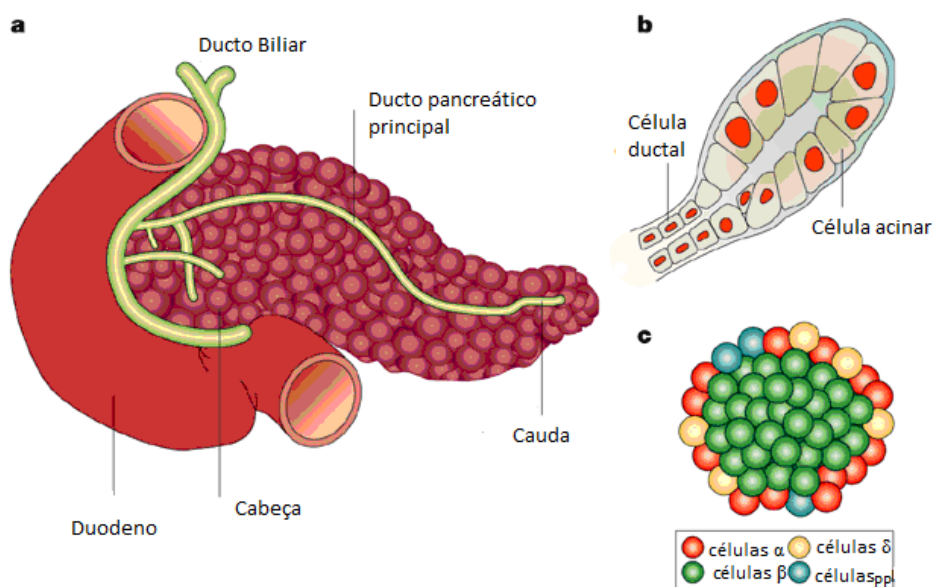


Figura 1 Pâncreas a- O pâncreas é dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda e sua localização é adjacente ao duodeno. b- disposição das células ductais e acinares. c- As principais células que constituem o pâncreas endócrino: α , β , δ e PP (modificado de Edlund, 2002).

1.2 Câncer de Pâncreas

O câncer de pâncreas (CP) possui alta taxa de mortalidade, sendo esta quase equivalente à taxa de incidência. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, a

incidência para 2013 nos Estados Unidos é de 45.220 novos casos. Atualmente é a quarta causa de morte por câncer entre os homens e mulheres (Yeo e Lowenfels, 2012). Segundo dados do Instituto Nacional do Cancer (INCA), no Brasil, foram estimados 9.320 novos casos em 2009 e 7.440 mortes por câncer de pâncreas em 2010, sendo responsável por cerca de 2% de todos os tipos de cânceres diagnosticados e por 4% do total de mortes por câncer. De acordo com a União Internacional Contra o Câncer (UICC) os casos da doença aumentam com o avanço da idade: de 10/100.000 habitantes entre 40 e 50 anos para 116/100.000 habitantes entre 80 e 85 anos.

Apenas 5% dos pacientes vivem cinco anos após o diagnóstico, sendo a sobrevida média de quatro meses. Dentre outros tipos de câncer do trato gastrointestinal o câncer de pâncreas possui a menor taxa de sobrevida (Gráfico 1) (Coupland *et al.*, 2007). A sobrevida média dos pacientes submetidos à ressecção do tumor que não apresentam metástase é de 11 a 20 meses. Quando não submetidos a ressecção e não possuem metástase a sobrevida é apenas de 6 a 11 meses e para doença metastática é de 2 a 6 meses. Portanto, há um aumento na expectativa de vida dos pacientes após tratamento cirúrgico (Richter *et al.*, 2003; Ghaneh e Neoptolemos, 2004). Entretanto, aproximadamente 85% dos pacientes apresentam metástase quando a doença é diagnosticada, sendo, portanto, tumores incuráveis (Jesnowski *et al.*, 2007).

A alta taxa de mortalidade do câncer de pâncreas pode estar atribuída ao diagnóstico tardio, à rápida progressão da doença e à resistência a quimioterapia e a radioterapia (Villanueva *et al.*, 2013). Muitas vezes o diagnóstico é equivocado quanto à ressectabilidade e vários pacientes são submetidos apenas a intervenções paliativas (Truty *et al.*, 2012).

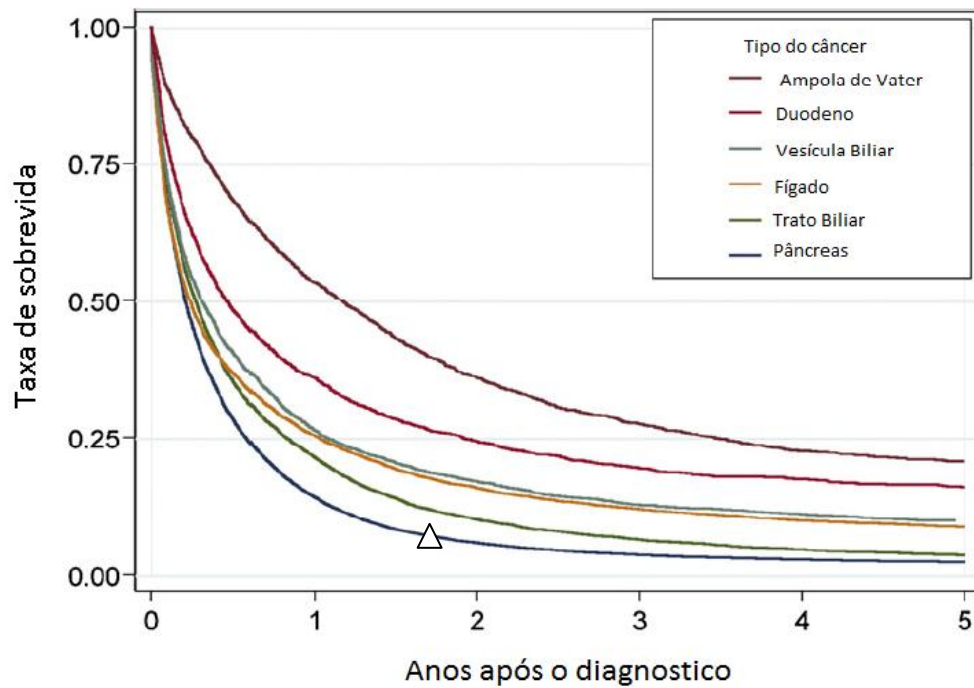


Gráfico 1 Taxa de sobrevivência média em pacientes com diferentes tipos de tumores do trato gastrointestinal. Aproximadamente 5% dos pacientes com câncer de pâncreas sobrevivem após o quinto ano do diagnóstico (modificado de Coupland *et al.*, 2007).

1.2.1 Fatores de Risco

Os principais fatores de risco para o câncer de pâncreas incluem: idade avançada, história familiar, tabagismo, etilismo, obesidade, diabetes e pancreatite. Por outro lado, a etnia também é um fator relevante, uma vez que fatores sócio-econômicos e culturais podem influenciar neste aspecto (Yeo e Lowenfels, 2012).

1.2.1.1 Idade Avançada

Idade avançada é o principal fator de risco para o câncer de pâncreas, bem como para a maioria dos outros cânceres. O predomínio dos casos ocorre na faixa etária entre 40 e 80 anos, sendo a média de 71 anos. Menos de 3% dos casos são

diagnosticados antes dos 44 anos e 54% dos diagnósticos encontram-se entre a faixa etária de 65 e 84 anos (Yeo e Lowenfels, 2012).

1.2.1.2- Histórico Familiar

Famílias com o risco aumentado para desenvolver o carcinoma pancreático são aquelas nas quais pelo menos dois parentes de primeiro grau tenham tido a doença (Stoita *et al.*, 2011). A minoria dos casos de câncer de pâncreas é hereditária, sendo que aproximadamente 80% são casos esporádicos (Yeo e Lowenfels, 2012). Mutações germinativas no gene BRCA2 foi a alteração genética mais comum em pacientes com câncer pancreático familiar, cerca de 6 a 19% dos casos, sendo assim, mutação neste gene pode auxiliar no rastreamento dos indivíduos de uma família com maior probabilidade de desenvolver o câncer de pâncreas. (Stoita *et al.*, 2011; Yeo e Lowenfels, 2012).

1.2.1.2 Tabagismo

O acúmulo de agentes cancerígenos no cigarro pode agir no DNA gerando mutações pontuais responsáveis pela progressão do câncer de pâncreas (Wittel *et al.*, 2012)

1.2.1.3 Etilismo

O consumo excessivo de álcool tem sido proposto durante décadas como um fator de risco para o câncer de pâncreas. O provável mecanismo fisiopatológico pelo qual o álcool leva à carcinogênese é a destruição do parênquima pancreático. Além disso, o álcool é um fator de risco para o desenvolvimento da pancreatite, que está associada ao desenvolvimento do câncer de pâncreas (Yeo e Lowenfels, 2012).

1.2.1.4 Obesidade

A associação positiva entre a obesidade e o câncer de pâncreas se dá pelo acúmulo do tecido adiposo que altera o metabolismo da glicose, a hiperinsulinemia e efeitos inflamatórios (Yeo e Lowenfels, 2012; Bracci, 2012). O desequilíbrio do metabolismo de glicose e lipídeos pode ser responsável pela associação entre obesidade e o câncer pancreático (Wittel *et al.*, 2012)

1.2.1.5 Diabetes

A diabetes do tipo 2 é considerada o terceiro fator de risco mais relacionado com a tumorigênese pancreática. Diabetes ou tolerância diminuída à glicose está presente em cerca de 50-80% dos pacientes com câncer pancreático, entretanto, os mecanismos envolvidos não estão bem estabelecidos (Li, 2012).

1.2.1.6 Pancreatite Crônica

A pancreatite crônica está associada ao desenvolvimento do câncer de pâncreas quando ocorre em até dois anos antes do diagnóstico do câncer. Apenas 3% dos pacientes com pancreatite crônica desenvolvem o CP (Yeo e Lowenfels, 2012). Um estudo recente demonstrou que pacientes que possuíam pancreatite e mutação no gene "Cystic Fibrosis Transmembrane" CFRT apresentavam maior ocorrência de câncer pancreático de forma significativa (Hamoir *et al.*, 2013).

1.2.1.8- Etnia

Americanos africanos apresentam taxa de incidência de câncer de pâncreas maior que outras etnias (Signal *et al.*, 2012). As taxas de mortalidade também são maiores para negros com diagnóstico de câncer pancreático quando comparado com pacientes brancos (Yeo e Lowenfels, 2012).

1.2.2 Tratamento

A classificação do tipo do tumor pancreático é muito importante, uma vez que a conduta terapêutica e o prognóstico são bem diferentes de acordo com a origem e estadiamento do tumor (Saif, 2011).

O tratamento para o câncer endócrino inclui cirurgia, quimioterapia e tratamento com hormônios. O prognóstico do tumor endócrino depende do tipo de célula das ilhotas pancreáticas acometida, da presença de metástase, da extensão do tumor e da saúde geral do paciente (Strosberg *et al.*, 2009).

As opções de tratamento para o câncer de pâncreas exócrino podem variar de acordo com sua classificação: ressecável, localmente avançado ou metastático. No caso dos tumores ressecáveis, a ressecção cirúrgica é o padrão escolhido seguido de quimioterapia (Li *et al.*, 2010). Para o câncer de pâncreas localmente avançado, ainda não há consenso sobre as opções de tratamento. Ensaio com quimioterapia, radioterapia, ou a combinação dos dois, podem ser utilizados (Saif, 2011). Os tumores pancreáticos metastáticos são altamente resistentes ao tratamento. O objetivo da quimioterapia sistêmica é fornecer alívio sintomático e prolongar a sobrevivência do paciente (Li *et al.*, 2010).

1.2.3 Classificações Histológicas

Os tumores sólidos do pâncreas são classificados como tumores neuroendócrinos (TNE), carcinoma de células acinares (CCA) e adenocarcinoma ductal pancreático (ADP).

1.2.3.1 Tumores neuroendócrinos

Os tumores endócrinos correspondem apenas a 2% dos casos dos cânceres pancreáticos. São geralmente esporádicos, mas também podem estar envolvidos em outras doenças como neoplasia endócrina múltipla tipo I (MEN 1) ou doença de Von Hippel-Lindau. O prognóstico, geralmente, é melhor do que dos adenocarcinomas, uma vez que a proliferação celular é mais lenta (Beger *et al.*, 2008).

Os tumores TNE sintomáticos são diagnosticados devido às complicações causadas pelo excesso de hormônios ativos na circulação sanguínea. (Beger *et al.*, 2008). Os diferentes tumores neuroendócrinos são classificados de acordo com o tipo de hormônio produzido pela célula (Tabela 1)

Tabela 1 Tipos de tumores endócrinos de acordo com a origem celular (modificada de Beger *et al.*, 2008).

| Tumor Endócrino Funcional | Hormônio produzido |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Insulinoma | Insulina |
| Glucagoma | Glucagon |
| Gastrinoma | Gastrina |
| Somatostatina | Somatostatina |
| Vipomas | Peptídeo Vasoativo Intestinal |
| PPomas | Polipeptídeo Pancreático |

Os tumores endócrinos não funcionantes crescem lentamente e são considerados menos agressivos, pois secretam peptídeos não ativos como: neurotensina ou cromogranina A (Saif, 2011).

1.2.3.2 Carcinoma de Células Acinares

O carcinoma de células acinares é o tumor mais raro, constituindo apenas 1% dos tumores pancreáticos. Mutações freqüentemente encontradas em adenocarcinoma ductal pancreático como, K-ras e p53 não estão relacionadas ao carcinoma de células acinares. Devido ao pequeno número de pacientes acometidos pelo carcinoma de células acinares, a caracterização da taxa de crescimento tumoral e a estimativa média de sobrevida ainda não estão totalmente elucidadas (Lowery *et al.*, 2011). O carcinoma de células acinares é considerado mais agressivo que os tumores endócrinos e menos que os adenocarcinomas pancreáticos (Holen *et al.*, 2002).

1.2.3.3 Adenocarcinoma Ductal Pancreático

O adenocarcinoma ductal pancreático é o câncer pancreático mais prevalente, constituindo cerca de 85% dos casos. Destes, apenas 15 a 20% são tumores ressecáveis e apenas 20% dos pacientes têm uma sobrevida de cinco anos (Tahira *et al.*, 2011). As taxas de incidência e de mortalidade do adenocarcinoma pancreático são semelhantes, o que demonstra o pior prognóstico desta doença (Immervoll *et al.*, 2006).

O adenocarcinoma ductal pancreático está intimamente relacionado a lesões ductais precursoras ao câncer, sendo a Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN) a mais freqüente. A classificação de PanIN varia de 1 a 3 de acordo com o nível da lesão (Villanueva *et al.*, 2013). A progressão de PanIN ao adenocarcinoma pancreático está relacionada com o acúmulo de alterações genéticas durante a progressão do câncer. As mutações no gene *K-ras* ocorrem na fase precoce de PanIN, a inativação de *CDKN2A* está relacionada a seu estágio intermediário e alterações em *p53* e *SMAD4* estão

mais relacionadas no seu estágio mais avançado (figura 2) (Qian *et al.*, 2005). Além do K-ras, outros genes envolvidos na via RAS também estão relacionados com o câncer de pâncreas, tais como EGFR, BRAF e PIK3 (Neuzillet *et al.*, 2012).

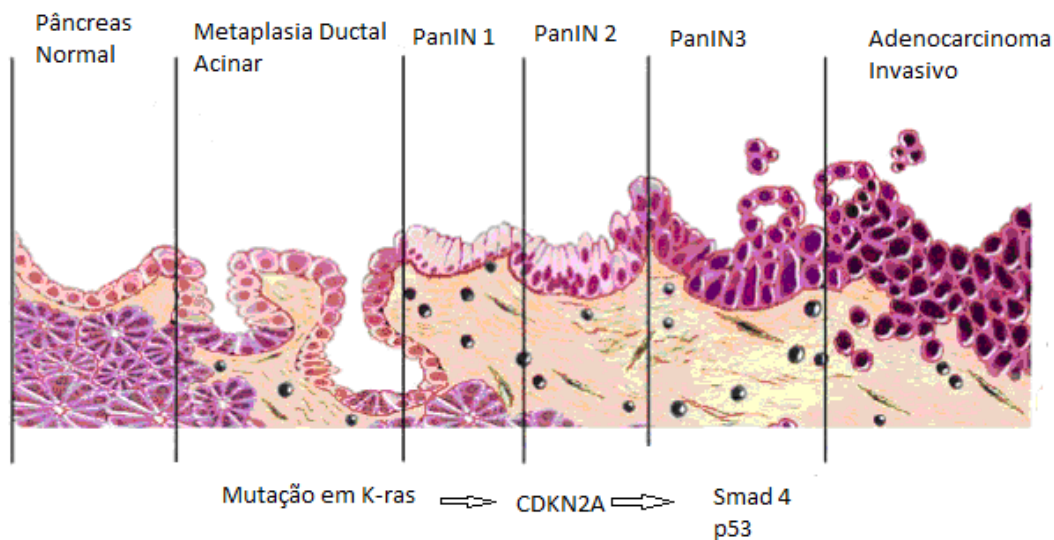


Figura 2 Modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma pancreático. Mutação em *K-ras* e perda funcional de *CDKN2A* são os eventos iniciais que ocorrem no desenvolvimento do carcinoma, seguido de mutações em supressores tumorais como *p53* e *SMAD4* (Adaptado de Springer Images, 2013)

1.3 Alterações genéticas no adenocarcinoma pancreático

Assim como em outros cânceres, durante a carcinogênese pancreática, ocorre acúmulo de alterações genéticas em oncogenes e em genes supressores tumorais (Immervoll *et al.*, 2006). A elucidação de alterações genéticas têm se tornado objetivo de inúmeros estudos, uma vez que tais alterações podem ser alvo de tratamento, além de auxiliarem no diagnóstico precoce das doenças (Villanueva, 2013).

1.3.1 K-ras

O gene *k-ras*, mapeado no cromossomo 12, é composto por seis exons. A família das proteínas RAS desempenha importante papel no ciclo celular (Downward, 2003). As proteínas RAS estão acopladas no lado citoplásmico da membrana plasmática através de ligação covalente a um grupo de lipídeos. Vários estudos mostraram que RAS desempenha importante papel na mitogênese, transmitindo sinal da superfície celular para outras estruturas no interior da célula (Alberts *et al.*, 2002; Cotran *et al.*, 1999).

RAS alterna entre a forma ativada que transmite sinais e um estado inativo quiescente. A forma inativa da proteína RAS está ligada à guanosina-difosfato (GDP) e a forma ativa está ligada à guanosina-trifosfato (GTP). As células tornam-se ativas quando estimuladas por fatores de crescimento ou por outras interações com receptores de membrana (Downward, 2003). As proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) inativam Ras pela indução da hidrólise do GTP ligante, enquanto os fatores de troca do nucleotídeo guanidina (GEFs) a ativam, estimulando a dissociação do GDP (Figura 3A). Mutações pontuais em K-ras codificam uma oncoproteína que difere do tipo selvagem em um único aminoácido. O efeito dessa mutação de ponto de sentido trocado não permite a hidrólise de GTP, permanecendo no complexo ativo, pois diminui a interação de K-ras com as GAPs (Figura 3B) (Linardou *et al.*, 2011).

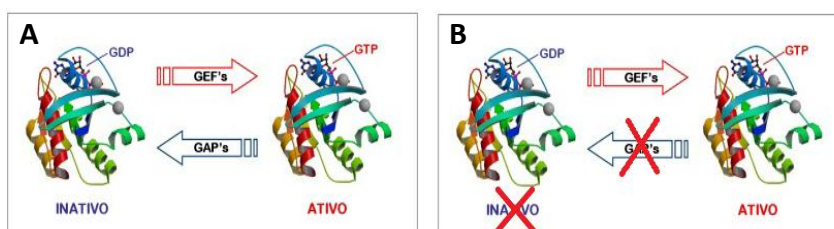


Figura 3 Regulação da atividade de *K-ras*. **A-** Proteína em estado normal de funcionamento. **B-** Oncoproteína Ras pelo ciclo GTP-GDP (Adaptação de Linardou *et al.*, 2011 e Protein Data Banking, 2012)

A proteína RAS ativada excita a via de MAP-quinase ao recrutar a proteína citosólica raf-1, promovendo a mitogênese (Downward, 2003; Robbins, 2010). RAS, além de ativar a via MAP-quinase, também ativa a via PI-3-Kinase (phosphatidylinositol 3 kinase), outra via de sinalização importante que promove crescimento celular (Figura 4) (Alberts *et al.*, 2002; Downward, 2003).

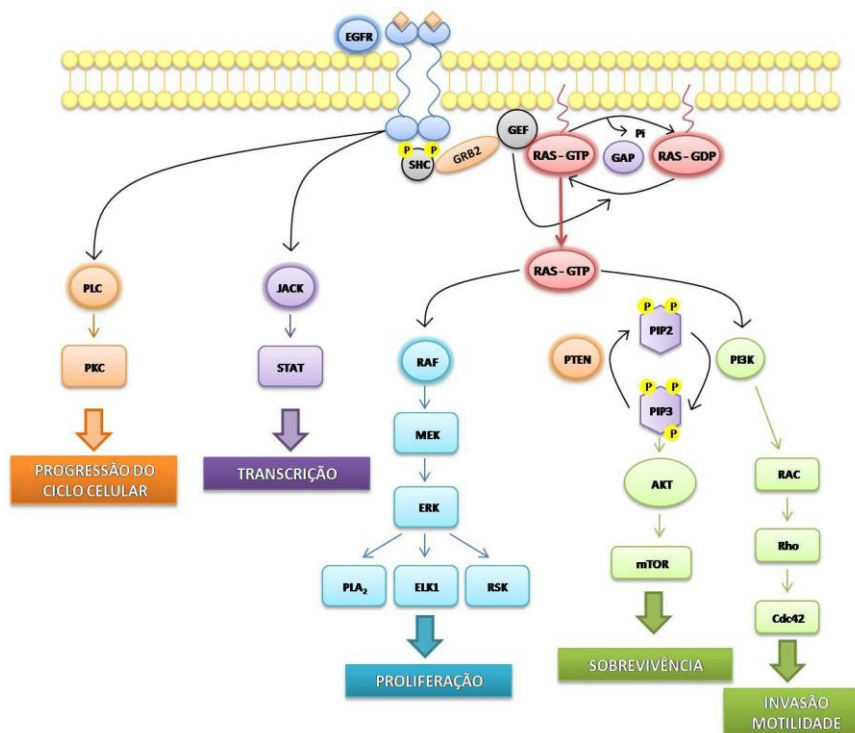


Figura 4 Via de sinalização celular: progressão, transcrição, proliferação, sobrevivência, invasão e motilidade.

Mutação em K-ras é um acontecimento crítico no desenvolvimento do câncer de pâncreas, ocorrendo em cerca de 80 a 100% dos casos. As mutações pontuais, na maioria das vezes, estão presentes nos códons 12 e 13 e, raramente no códon 61, nos exons 2 e 3 do gene (Lowery, 2012). Mutação em K-ras é um dos eventos mais precoces na carcinogênese pancreática e por possuir elevada frequência no adenocarcinoma tornou-se um atrativo alvo terapêutico. Além disso, a principal

mutação em K-ras, G12D, tem sido considerada um possível biomarcador plasmático que auxilia no diagnóstico precoce da doença (Singh *et al.*, 2011).

Entretanto, Yanagisawa e colaboradores (1993) demonstraram a presença de mutações em K-ras em biopsia de pancreatite crônica e em lesões pré cancerígenas sem desenvolvimento do câncer e, por isso, outras mutações são necessárias para que ocorra a tumorigênese.

1.3.2 EGFR

O gene que transcreve o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mapeado no cromossomo 7, possui 28 exons (Riely *et al.*, 2006; Irmer *et al.*, 2007). EGFR é um receptor transmembrana de 170 kDa composto por um domínio N-terminal que liga o meio extra-celular ao domínio citoplasmático (Preis e Korc, 2010). Existem vários ligantes que se acoplam ao EGFR, tais como o fator de crescimento epidermal, o fator transformador de crescimento alfa (TGF α), anfirregulina e betacelulina (Singh *et al.*, 2011). A ativação do complexo EGFR-tirosina quinase tem sido identificada como evento iniciador de uma grande variedade de cascatas de sinalização, incluindo a via Ras-Raf-MAP quinase (Ahmed *et al.*, 2006). Estas cascatas de sinalização intracelular levam à proliferação celular, sobrevivência, angiogênese e metastatização.

A superexpressão de EGFR em adenocarcinoma pancreático foi encontrada em 50-60% dos casos, tanto em níveis de mRNA quanto da proteína (Preis e Korc, 2010). O aumento da expressão de EGFR no adenocarcinoma pancreático tem sido

correlacionado ao avanço da doença, fenótipo de agressividade e redução no tempo de sobrevida (Singh *et al.*, 2011).

A importância do EGFR na carcinogênese pancreática foi demonstrada pela redução significativa na atividade mitogênica, ao bloquear o receptor em quatro culturas celulares do câncer (Preis e Korc, 2010). Mutações em *EGFR* são, atualmente, usadas como marcadores no prognóstico do câncer de pulmão, assim como alvo de terapias específicas (Murray *et al.*, 2006). Entretanto, estudos populacionais em países da Europa, como Noruega e Espanha, demonstraram que mutações em EGFR não são frequentes no câncer de pâncreas (Immervoll *et al.*, 2006; Lozano-Leon *et al.*, 2011).

1.3.3 BRAF

O gene BRAF está localizado no cromossomo 7 e é o mais potente ativador da via de MAPK da família RAF (Trovisco *et al.*, 2006; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011).

Como já citado, a via de RAS/RAF/MEK/ERK envia sinais do meio extracelular para o núcleo. RAS ativo induz alterações conformacionais em RAF que permite seu recrutamento para a membrana celular (Garnett e Marais, 2004). Após a ativação de BRAF sinais são enviados através MEK para ativar ERK, que, por sua vez ativa fatores de transcrição para induzir uma série de processos bioquímicos, incluindo a diferenciação, proliferação, crescimento celular e apoptose (Davies *et al.*, 2002).

Dezenas de mutações em *BRAF* já foram identificadas em cânceres humanos, sendo que 90% destas correspondem à mutação somática no exon 15, BRAFV600E,

que resulta na mudança do resíduo 600, substituindo uma valina por glutamina (Davies *et al.*, 2002; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011). A troca do aminoácido ativa a proteína, pois propicia a fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, conferindo capacidade oncogênica (Wan *et al.*, 2004).

Tumores que apresentam BRAFV600E são mais invasivos e agressivos (Nucera *et al.*, 2011). Mutações em *BRAF* e *K-ras* são mutuamente exclusivas (Davies *et al.*, 2002). Mutações em *K-ras* e *BRAF* são fatores independentes durante a proliferação celular em câncer de pulmão (Naoki *et al.*, 2002). Ishimura e colaboradores (2003) foram os primeiros a reportarem mutação em *BRAF* no adenocarcinoma pancreático. Entretanto, neste estudo duas amostras positivas para a mutação em BRAFV600E eram positivas também para mutações em *K-ras*.

Apenas a mutação V600E não representou um marcador de mau prognóstico em carcinoma papilar de tireóide, no entanto, a coexistência de mutações em *BRAF* e *PIK3CA* foi relacionada à agressividade do tumor (Liao *et al.*, 2012). A ativação de RAS, além de desencadear a sinalização intracelular da via RAS-ERK, envia sinais para a via PIK-AKT-Mtor, que também está envolvida na proliferação e invasão celular (Neuzillet *et al.*, 2012)

1.3.4 PIK3CA

O gene que codifica a subunidade catalítica de PI3K p110 α (PIK3CA) está localizado no cromossomo 3. Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) são quinases lipídicas envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo a proliferação celular. Muitas

mutações já foram identificadas em PIK3CA em tumores sólidos humanos, incluindo cólon, mama, cérebro, ovário, fígado e pulmão (Liao *et al.*, 2012).

Após a ativação de EGFR, além da via RAS/RAF/MEK, a via PI3K/AKT/mTOR também está envolvida na invasão, migração e proliferação celular. A ativação de PI3K é, freqüentemente, mediada por mutações na subunidade p110 α , principalmente nos exons 9 e 20 (Janku *et al.*, 2011). Tanto as mutações no exon 9 ou exon 20 em PIK3CA resultam em ganho da função da proteína, promovendo a ação oncogênica. A coexistência de mutações em ambos os exons leva a um ganho sinérgico de função (Liao *et al.*, 2012).

A mutação comumente encontrada em PIK3CA, denominada H1047R, gera a troca do aminoácido histidina por arginina. Esta mutação está localizada em uma região conservada, presente no códon 20 que é responsável por codificar o domínio quinase da proteína (Janku *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2013).

A presença simultânea de mutações em PIK3CA e K-ras foi encontrada em 24% dos casos de pacientes com câncer colorretal (Kennedy *et al.*, 2011). Mutações em K-ras e outros genes em sua via, como o PIK3CA, são importantes para o desenvolvimento do câncer de pâncreas. Entretanto, genes de outras vias também estão envolvidos na progressão da doença. Experimentos em animais mostraram que mutação em *k-ras* foi o suficiente para induzir o desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas e deleção de *Cdkn2a* levou ao rápido avanço da progressão e invasão do câncer de pâncreas (Qiu *et al.*, 2011).

1.3.5 CDKN2A (p16)

O gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) está localizado no cromossomo 9. Este gene possui três exons que geram dois genes supressores de tumor devido ao “splicing” alternativo originado do exon 2 , p16 e p14, que resultam em duas proteínas, INK4 α e ARF, respectivamente (Williams *et al.*, 2011). Ambas as proteínas atuam no ciclo celular e possuem atividade de supressão tumoral. A interação de ARF com MDM2 leva a ativação de P53. A inativação de p16 tem sido mais associada ao desenvolvimento do câncer de pâncreas devido às mutações germinativas identificadas em casos esporádicos (Singh *et al.*, 2011). Durante o ciclo celular, as quinases dependentes de ciclina (CDKs) são ativadas quando ligadas a ciclinas, o complexo Ciclina D/CDK4 fosforila a proteína do retinoblastoma (Rb), que quando fosforilada torna-se inativa e libera fatores de transcrição que irão permitir o avanço da fase G1 para S durante o ciclo celular (Peurala *et al.*, 2013). A proteína INK4 α codificada por p16 inibe a formação do complexo Ciclina D/CDK4, impedindo assim a fosforilação de Rb e a progressão do ciclo celular (Figura 5) (Chen *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2011).

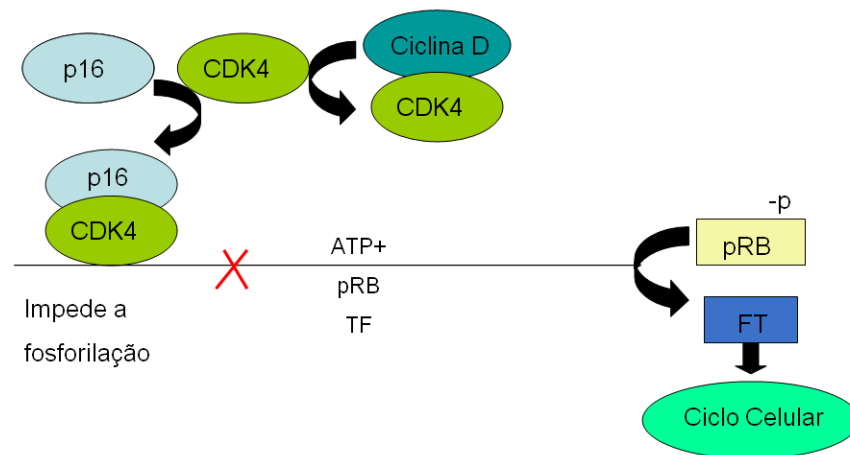


Figura 5 Papel de P16 na regulação do ciclo celular. A proteína p16 se liga a CDK4 e forma o complexo p16-CDK4, impedindo a fosforilação de pRB. pRB hipofosforilado mantém-se como supressor de tumor. Por outro lado, no caso de disfunção do p16, a CDK4 pode ligar-se à ciclina D e formar o complexo CDK4-ciclina D. Este complexo promove a fosforilação de pRB e libera o fator de transcrição (TF), o qual ativa o ciclo celular (Adaptado de Chen *et al.*, 1999)

A perda de função de p16 ocorre em 80-95% dos casos esporádicos de adenocarcinoma pancreático (Lowery e Reilly, 2011). A perda de função de p16 pode ocorrer devido a mutações pontuais ou por hipermetilação na região promotora do gene. Alteração no gene p16 ocorre freqüentemente em PaIN II, sendo considerado, portanto, um gene envolvido na progressão do adenocarcinoma pancreático (Singh *et al.*, 2011).

1.3.6 P53

Outro gene supressor tumoral que está envolvido com a progressão do adenocarcinoma pancreático é o p53, que está localizado no cromossomo 17. Este gene é composto por 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante. O produto transcrito

é uma proteína nuclear de 53 KiloDaltons (kDa), denominada P53 em consequência do seu peso molecular (Hollstein *et al.*,1991).

O gene p53 é um dos supressores tumorais mais mutados nos cânceres humanos. Sua função é manter a integridade do genoma humano, regulando a transcrição de genes que estão envolvidos no ciclo celular, apoptose e nas vias de reparo de DNA (Rajagopalan *et al.*,2010).

Em condições fisiológicas, os níveis de expressão de p53 são baixos devido a sua meia vida curta, a qual é cerca de 20 minutos. Varias proteínas são responsáveis pelo controle da expressão e da ativação de p53 mediante as alterações no DNA. Os níveis normais de p53 são controlados pela ubiquitinação e degradação por proteossomas, mas o principal regulador negativo da expressão de p53 é a proteína MDM2, que atua no domínio de transativação da p53 para antagonizar sua ação sobre o DNA e impedir sua atividade transcricional, além de aumentar o transporte da proteína P53 para o citoplasma, onde ocorre sua degradação (Meek, 2009).

Em condições de estresse a proteína p53 é ativada. Um dos mecanismos que explica a ativação de p53 durante a proliferação celular é a via de ARF, que atua inibindo o papel de MDM2. Experimentos demonstraram que o aumento da expressão de oncogenes pode induzir a via de p53 através de ARF, por diversos mecanismos (Figura 6) (Meek, 2009; Fernandez e Sot, 2010).

Em resposta ao dano no DNA e ao aumento da proliferação celular, p53 torna-se ativa e seus níveis são aumentados no núcleo com a finalidade de impedir a progressão do ciclo celular da fase G1, levando a respostas biológicas que reparam o dano ocorrido e previnem assim a replicação do DNA danificado. Além disso, p53 também atua no processo de apoptose (Rajagopalan *et al.*, 210; Meek, 2009).

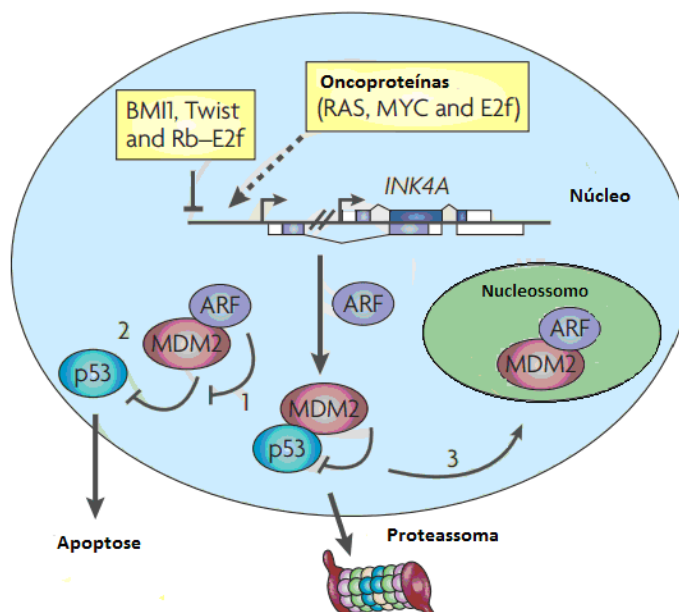


Figura 6 Indução de p53 pela via de ARF. A proteína ARF é normalmente expressa em baixos níveis na célula. Sinais de aumento de proliferação celular levam ao aumento da expressão desta proteína, que inibi a interação de MDM2 com p53 por três mecanismos diferentes. Mecanismo 1- Bloqueia a ubiquitinação de p53, mecanismo 2- desacoplamento de MDM2 e p53, mecanismo 3- seqüestro de MDM2 para o nucléolo, segregando p53 (modificado de Meek, 2009)

Em muitos tumores a função de p53 é perdida, resultando no aumento da sobrevida e progressão do crescimento tumoral. Mutações somáticas em p53 ocorrem em 50 a 70% dos casos de adenocarcinoma pancreático (Singh *et al.*, 2011).

Mutações em p53 foram identificadas na fase avançada de PanIN, sugerindo que a inativação de p53 é um evento tardio na progressão genética do adenocarcinoma ductal pancreático (Maitra *et al.*, 2003).

1.4 Impacto da etnia no câncer de pâncreas

Evidências mostram que a mortalidade e a incidência dos cânceres estão associadas a diferentes etnias (Wiencke, 2004). Pacientes africanos com câncer de

pâncreas têm pior sobrevida quando comparados a outras etnias (Singal *et al.*, 2012). A população brasileira foi formada pela extensa mistura entre europeus, africanos e ameríndios. Já foi demonstrado que a cor da pele dos brasileiros não é um bom indicador de origem ancestral e, por isso, a importância da utilização de marcadores genéticos para definir a ancestralidade da população em estudos onde etnia tem um impacto sobre a doença (Kurtz *et al.*, 2007).

Pouco se sabe das alterações genéticas de pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático. Devido à importância da caracterização molecular de genes envolvidos na carcinogênese pancreática para a busca de novos alvos terapêuticos e marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce da doença, em nosso estudo, avaliamos mutações nos principais genes envolvidos com a progressão do adenocarcinoma pancreático em pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático.

2 OBJETIVOS

Avaliar a frequência de mutações em *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA*, *CDKN2A* e *p53* em 23 amostras de pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático.

Correlacionar os achados clínicos com a caracterização molecular.

Determinar o componente de ancestralidade genômica dos pacientes e correlacioná-la as alterações genéticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes e controles

Foram estudados vinte e três pacientes que receberam o diagnóstico de adenocarcinoma pancreático. A coleta de doze amostras foi realizada pela professora Dra. Vivian Resende no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-MG) e outras onze foram fornecidas pelo banco de tumores coordenado pelo professor José Sebastião dos Santos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Projeto: CAAE 09135912.6.0000.5149) e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

Um grupo de noventa e seis amostras de indivíduos saudáveis, que pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Genética Molecular, foi utilizado como controle para o sequenciamento do exon 20 do gene PIK3CA.

Um grupo de cinquenta e cinco indivíduos saudáveis, residentes no estado de Minas Gerais, foi utilizado como controle para a análise de ancestralidade genômica. Esta amostragem está armazenada em um banco de amostras do laboratório de Genética Molecular para este tipo de estudo.

3.2 Coleta das Amostras

As amostras de tecido câncer de pâncreas foram coletadas no momento da cirurgia, e posteriormente, divididas em dois fragmentos. Um deles foi armazenado em um tubo de 1.5ml contendo solução RNA*later*® e mantido a -80°C e o outro, *foi* encaminhado para a confirmação histológica de adenocarcinoma pancreático. Após a coleta, as amostras foram codificadas como PC de 1 a 23.

3.3 Coleta dos dados clínicos

A obtenção dos dados clínicos dos pacientes por meio da análise de prontuários. Verificou-se a idade e sexo dos pacientes e o estadiamento do tumor, segundo AJCC. A histologia foi analisada por meio de exame anátomo-patológico e todos os pacientes incluídos na pesquisa apresentaram o câncer do tipo adenocarcinoma pancreático. Os dados clínicos foram analisados para avaliar possível relação com as alterações moleculares encontradas.

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Extração de DNA do tumor

O DNA das amostras de câncer de pâncreas foi isolado de acordo com protocolo de proteinase K (Miller *et al.*, 1988).

A amostra foi macerada e colocada em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 200µL de tampão de lise (Tris HCl 50mM, pH 8; EDTA 10mM; pH 8; SDS 0.5%; q.s.p 200mL H₂O) e proteinase K (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi mantido em banho-maria a 65°C por 1 hora. Após esse período, 200µL de tampão de lise foram adicionados à mistura. A amostra foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, centrifugada por 20 minutos a 11.000 x g.

O sobrenadante resultante foi coletado. Adicionou-se a ele duas vezes o seu volumes de etanol 100% e 10% de seu volume de acetato de sódio (3M pH 8). A amostra foi então homogeneizada até que o DNA pudesse ser visualizado. O DNA resultante foi lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em TE e armazenado a 80°C negativos.

3.4.2 Amplificação e sequenciamento das amostras

Um conjunto de iniciadores específicos para a amplificação dos diferentes exons de *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *p53* e *p16* foram desenhados utilizando-se o programa

Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (tabela 2). Todos foram conferidos manualmente por meio da análise da sequência disponível em banco de dados do (<http://www.ensembl.org>). O DNA extraído foi quantificado por meio de espectrofotometria. Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas diluições de 50ng/ μ L das amostras extraídas.

A reação padrão de PCR utilizada seguiu os parâmetros: 100ng de DNA, 2.5 μ L de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris-HCl 10mM, pH 8; Triton X-100 0.1%; MgCl₂ 1.5mM), 2.5 μ L de dNTPs (0.2mM), 0.5 μ L de cada par de iniciadores (10pmol/mL) e 0.5 μ L de Taq DNA polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador, utilizando-se as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 3 minutos, e, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento que variou entre 55 e 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para amplificação do gene K-ras o programa utilizado foi o COLD-PCR, (Zuo *et al.*, 2009) com o intuito de aumentar a sensibilidade na detecção da mutação. O programa consiste em aumentar o número de ciclos e diminuir a temperatura de anelamento. O programa COLD-PCR cicla 10 vezes em 95° por 10 minutos, 95° por 15 segundos, 57° por 30 segundos e 72° por um minuto, após os 10 ciclos a temperatura se mantém em 72° por 7 minutos, 95° por 2 minutos, e cicla mais 40 vezes em 95° por 15 segundos, 70° por 8 minutos, 80° em 3 segundos, 55° em 30 segundos e 72° por um minuto.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI). A visualização dos produtos da PCR e seus purificados foi realizada em gel de poliacrilamida 6.5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético 10%, lavagem

em água destilada por 3 minutos, impregnação em solução de nitrato de prata (10.5g AgNO₃, q.s.p 100mL H₂O, formaldeído 37%, q.s.p 50mL de água destilada) lavagem em água destilada e a etapa de revelação em solução de carbonato de sódio (3g de NaCO₃, q.s.p 100mL H₂O, 75mL de formaldeído 100% e 20mL de tiosulfato de sódio 10mg/mL).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se *BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit*, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) e analisadas utilizando-se o programa *Sequencher v.4.9*.

3.4.3 Análise de mutação do códon de K-ras por PCR - RFLP

Para a confirmação dos resultados da frequência da mutação no códon 12 de K-ras utilizou-se a técnica de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) foi utilizada. Após a PCR utilizando-se primers que possuem um erro de pareamento (*primers mismatches*), as amostras foram tratadas com enzima de restrição MVA1 em uma reação final de 15 µl, em tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl₂, 1 mM ditioneitol, 100 mM KCl), de acordo com as especificações do fabricante (Amersham) em um período de incubação por sete horas a 37°C. Um controle negativo foi empregado em cada ensaio. O *primer mismatche* cria o sítio de restrição para a enzima, porém as amostras com qualquer mutação no códon 12 de K-ras deixam de ser clivadas, o que permite visualizar-se o resultado pela da diferença do

tamanho do fragmento, após a eletroforese. O gel de acrilamida 6% foi utilizado na corrida de eletroforese para a visualização do produto tratado com a enzima de restrição.

3.4.4 Avaliação do impacto das mutações sobre a estrutura protéica

O *software PolyPhen-2* prediz o possível impacto das substituições de aminoácidos sobre a estrutura e função das proteínas. Este programa foi utilizado com a finalidade de avaliarmos os danos causados pelas mutações encontradas. O resultado é dado de acordo com o escore, quanto mais próximo de 1.000, maior o dano protéico causado pela mutação.

3.4.5 Análises de Ancestralidade

Todas as amostras foram submetidas à análise de ancestralidade genômica. Cada amostra foi genotipada de modo independente por meio de 40 indels bialélicos (Bastos-Rodrigues *et al.*, 2006). Os amplicons foram analisados em *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) usando o *software GeneMapper Version 4.0* (Applied Biosystems). Para estimar a proporção de ancestralidade europeia, africana e ameríndia de cada indivíduo foi utilizado o programa *Structure*, versão 2.3, disponível em: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.htm>

3.5 Análises Estatísticas

As análises entre os componentes ancestrais de pacientes e controles foram realizadas por meio do teste ANOVA pelo software GraphPad Prism 5.0, www.graphpad.com.

Tabela 2 Características da amplificação por PCR dos genes estudados

| Gene | Exon | Sequencia dos primers (forward/reverse) | Tm°C | Tamanho do produto (pb) |
|--------|---------|---|------|-------------------------|
| KRAS | 2 | 5'GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA3'/5'GAATGGTCCTGCACCAGTAA-3' | 55 | 170 |
| | 2 -MVAI | 5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT3'/ 5' TCAAAGAATGGTCCTGGACC 3' | 52 | 157 |
| | 3 | 5'-CCAGACTGTGTTTCTCCCTTC-3'/5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3' | 55 | 245 |
| BRAF | 15 | 5'- TCATAATGCTTGCTGTGATAGGA-3'/5'GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3' | 55 | 179 |
| EGFR | 18 | 5'- GCGTACATTTGTCCTCCC- 3'/ 5'- TGCCTTTGGTCTGTGAA-3' | 55 | 505 |
| | 19 | 5'-CCCAGCAATATCAGCCTT- 3'/ 5'-GCCTCCATTTCTTCATCAA-3' | 58 | 590 |
| | 20 | 5'-CTCTCCCACTGCATCTGTCA - 3'/ 5'- TATCTCCCCTCCCCGTATCT -3' | 56 | 421 |
| | 21 | 5'-TTCAAGCCCAGGTCTCAACT- 3'/ 5'- CAGCTGTGACCTTCCCAAT-3' | 56 | 675 |
| PIK3CA | 9 | 5'-CTGTGAATCCAGAGGGGAAA - 3' / 5'-ACATGCTGAGATCAGCCAAA-3' | 52 | 269 |
| | 20 | 5'-TGACATTTGAGCAAAGACCTG-3'/5'-TTCCTATGCAATCGGTCTTTG-3' | 52 | 434 |
| P16 | 1 | 5'-CGGAGGAAGAAAGAGGAG-3'/5'-AACTTCGTCCTCCAGAGTC-3' | 56 | 319 |
| | 2 | 5'-GCTGAACCTTCTGTGCTGGAAAATG-3'/5'-GCTGAACCTTCTGTGCTGGAAAATG-3' | 52 | 310 |
| P53 | 4 | 5'-TGCTCTTTTCACCCATCTAC-3'/5'-ATACGGCCAGGCATTGAAGT-3' | 60 | 353 |
| | 5 6 | 5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3'/5'-TTAACCCCTCCTCCAGAGA-3' | 55 | 467 |
| | 7 | 5'-CTTGCCACAGGTCTCCCAA-3'/5'-AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA-3' | 60 | 237 |
| | 8 9 | 5' - TTGGGAGTAGATGGAGCCT - 3'/5'-AGTGTTAGACTGGAACTTT-3' | 58 | 445 |

Tm: Temperatura de anelamento

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes

As características clínicas estão demonstradas na Tabela 3. Das 23 amostras seqüenciadas foi possível obter os dados clínicos de 21 pacientes. Destas, quatorze eram mulheres (67%) e sete homens (33%) com a idade média de 58 anos, o estadiamento IIB foi o mais presente entre as amostras (62%). Não houve correlação entre os achados clínicos e as mutações encontradas.

Tabela 3: Características clínicas dos pacientes com adenocarcinoma pancreático

| Variantes | | N | % |
|-------------------------|----------------|-------|-----|
| Idade | Média | 58 | |
| | Varição | 32-90 | |
| Sexo | Masculino | 7 | 33 |
| | Feminino | 14 | 67 |
| Tipo Histológico | Adenocarcinoma | 21 | 100 |
| Estágio do tumor (AJCC) | IA | 1 | 5 |
| | IB | 2 | 9,5 |
| | IIB | 13 | 62 |
| | III | 2 | 9,5 |
| | IV | 3 | 14 |

4.2 Análise de Seqüenciamento

4.2.1 K-ras

Mutações no codon 12, presente no exon 2 de K-ras foi encontrada em 12 (60%) das 23 amostras analisadas. Foram identificadas quatro mutações distintas neste mesmo códon. A troca de glicina por valina (G12V) foi encontrada em cinco amostras (figura 7), quatro apresentaram trocas por arginina (G12R) (figura 8), três pacientes demonstraram a troca por ácido aspártico (G12D) (figura 9) e apenas uma por serina (G12S) (figura 10). Todas as mutações encontradas no códon 12 ocorreram em heterozigose.

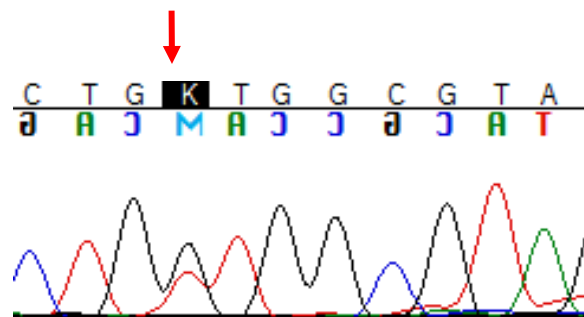


Figura 7 Eletroferograma mostrando a mutação G12V em heterozigose no códon 12 de K-ras

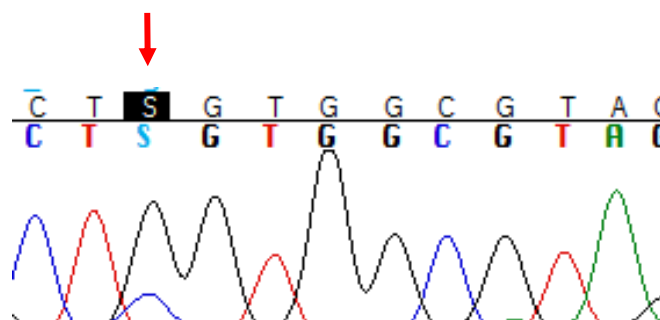


Figura 8 Eletroferograma mostrando a mutação G12R em heterozigose no códon 12 de K-ras

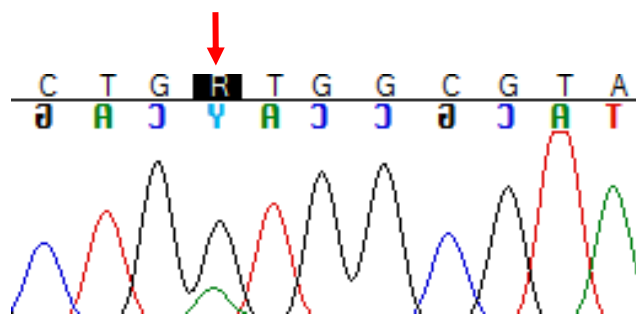


Figura 9 Eletroferograma mostrando a mutação G12D em heterozigose no códon 12 de K-ras

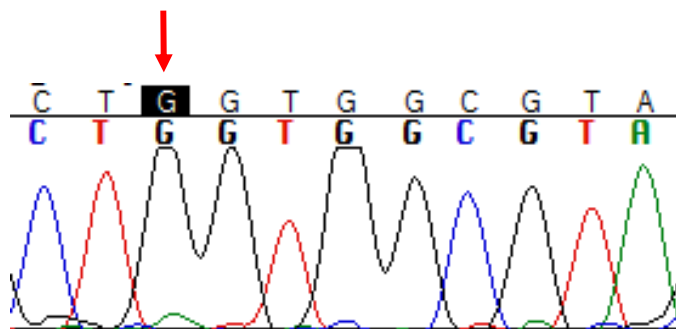


Figura 10 - Eletroferograma mostrando a mutação G12S em heterozigose no códon 12 de K-ras

Todas as mutações encontradas no códon 12 de K-ras foram avaliadas pelo *software PolyPhen 2*, todas apresentaram potencial dano na estrutura protéica de *K-ras*, sendo a mutação G12V a mais danosa (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação do dano protéico causado pelas mutações encontradas no códon 12 de K-ras

| Mutação | Diagrama | Escore |
|---------|----------|--------|
| G12V | | 0.999 |
| G12R | | 0.741 |
| G12D | | 0.517 |
| G12S | | 0.682 |

A mutação mais freqüente encontrada no códon 12 de K-ras foi G12V, encontrada em 43% das amostras mutadas, seguida da mutação G12R com 29%, G12D apresentou 21% e, por fim, a mutação menos freqüente foi G12S, encontrada em apenas 7%(Gráfico 2). Nenhuma mutação no exon 3 de *k-ras* foi encontrada entre as 23 amostras analisadas.

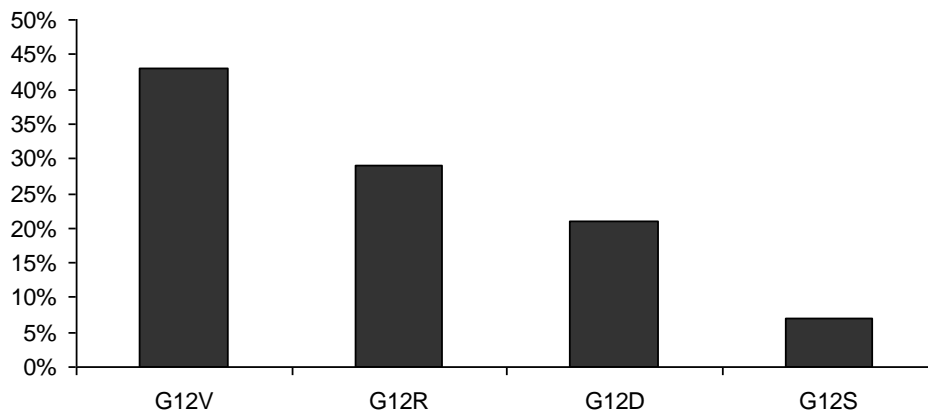


Gráfico 2 Distribuição das mutações no códon 12 de K-ras

A freqüência de mutações no códon 12 de K-ras foi confirmada através da técnica PCR-RLFP. As amostras em heterozigose apresentam dois alelos de tamanhos diferentes, o fragmento de 130 pb representa o alelo selvagem, e outra banda de aproximadamente 150 pb o alelo mutado. A figura 11 representa um gel de poliacrilamida com os resultados da técnica PCR-RLFP, sendo a amostra PC15 heterozigota para a mutação no códon 12 de K-ras e a PC 20 sem mutação. Juntamente com as amostras, o vetor Lambda passou pelo tratamento de restrição como controle positivo de funcionamento da enzima, uma vez que este apresenta vários sítios de restrição para MVA1.

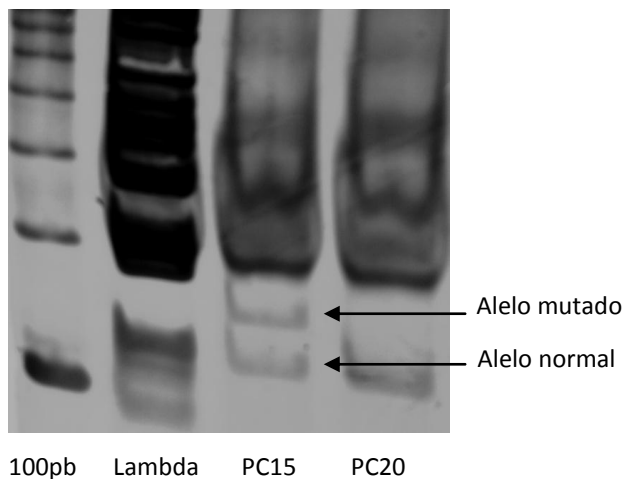


Figura 11 Gel de acrilamida representando a detecção de mutação em K-ras, códon 12, pela técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima MVAI

4.2.2 EGFR

No sequenciamento do gene EGFR, detectou-se a presença da mutação P753S (Figura 12) em apenas um paciente (4%), esta mutação é responsável pela troca de uma prolina por uma serina e está presente no éxon 19 deste gene. O paciente que apresentou a mutação P753S era do sexo masculino, 51 anos e ex-tabagista. No éxon 20 o polimorfismo rs1050171, previamente descrito, foi encontrado em 72% dos casos. Este polimorfismo é determinado pela troca do nucleotídeo guanina por adenina e resulta em uma variação sinônima. Não foi encontrada nenhuma mutação nem polimorfismos nos éxons 18 e 21 do gene EGFR.

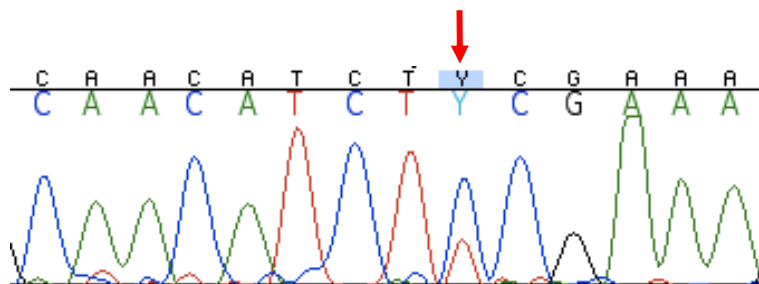


Figura 12 Eletroferograma mostrando a mutação P753S em heterozigose no éxon 19 de EGFR

O impacto da mutação P753S na estrutura terciária da proteína foi mensurado pelo software *PolyPhen-2* e foi considerada potencialmente danosa (figura 13)

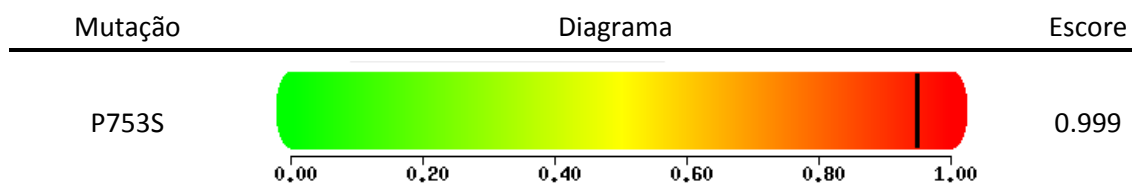


Figura 13 Impacto da mutação P753S em EGFR

4.2.3 BRAF

Nenhum dos 23 pacientes analisados apresentou mutação ou polimorfismo no exon 15 do gene *BRAF*.

4.2.4 PIK3CA

No seqüenciamento do exon 20 de *PIK3CA* identificou-se uma mutação (4%) não descrita na literatura em um único paciente. A substituição de uma timina por uma adenina na posição 2949 gerou a troca de metionina por uma lisina, denominada de M983K (figura 14).

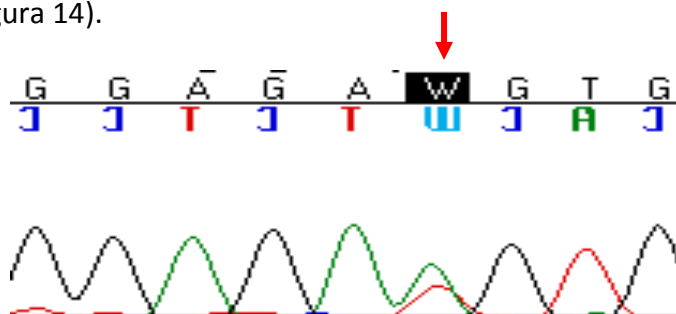


Figura 14 Eletoferograma mostrando a mutação não descrita, M983K, em heterozigose no exon 20 de *PIK3CA*

O programa *PolyPhen-2* foi utilizado e o valor do escore encontrado foi de 0.907 (Figura 15).

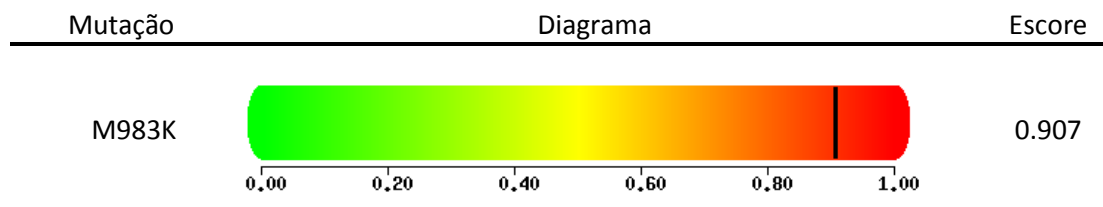


Figura 15 Impacto de M983K em PIK3CA

Não foi encontrada a alteração M983K em nenhum dos 100 controles sequenciados.

Analisamos pelo NCBI a conservação do aminoácido metionina entre outras espécies e observamos que esta é uma região conservada da proteína (Figura 16).

| | | |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Homo sapiens: | LIVISKGAQECTKTREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Mus musculus: | LIVISKGAQEYTKREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Rattus norvegicus: | LIVISKGAQEYTKREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Pan troglodytes: | LIVISKGAQECTKTREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Canis lupus familiaris: | LIVISKGAQECTKTREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Bos taurus: | LIVISKGAQECTKTREFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |
| Xenopus tropicalis: | LIVISKGIQECTKTRDFERFQEM | CYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA |

Figura 16 Sequências de aminoácidos na região mutada de PIK3CA entre várias espécies

Dois polimorfismos foram encontrados no exon 20 de PIK3CA: rs141178472 e rs17849079.

4.2.5 CDKN2A

Apenas uma amostra apresentou a alteração A148T em heterosigose no gene CDKN2A/ INK4 α . A substituição do nucleotídeo guanina por citosina gerou a troca do

aminoácido alanina por treonina na posição 148 (figura 17). O score do dano proteico gerado pelo *software* polyphen foi mediano (figura 18)

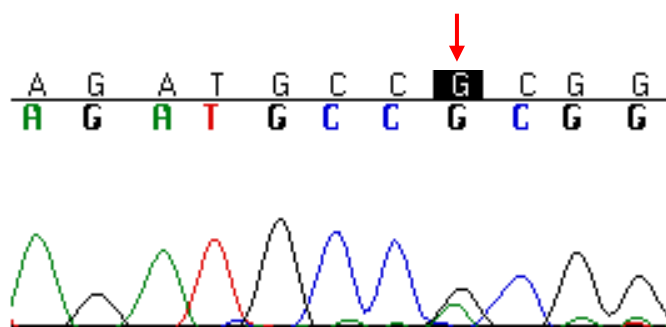


Figura 17 Eletroferograma mostrando a alteração A148T em heterozigose no éxon 2 de CDKN2A

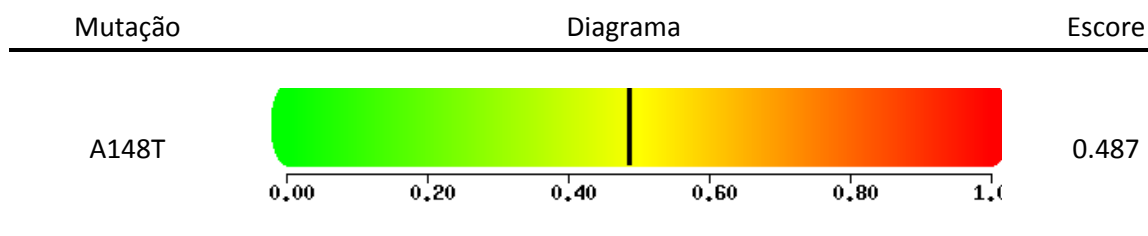


Figura 18 Impacto de A148T em CDKN2A

4.2.6- P53

O polimorfismo rs1042522, presente no éxon 4 de p53, foi encontrado em 64% dos casos. Este polimorfismo leva a substituição de uma prolina por uma arginina, R72P. Outro polimorfismo encontrado no éxon 4 foi o rs1800371, encontrado em apenas uma amostra. Nenhuma amostra apresentou mutações ou polimorfismos nos éxons 5,6 e 7 de p53. No éxon 8, duas amostras (8%) possuíam duas mutações distintas, ambas em heterozigose. A mutação R273 foi encontrada em um paciente, esta mutação gera uma troca de arginina para uma cisteína (figura 19).

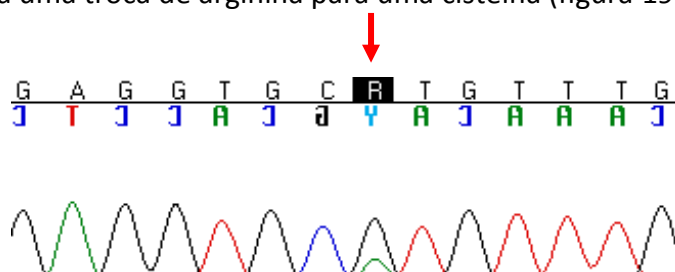


Figura 19 Eletroferograma mostrando a mutação R273C em heterozigose no éxon 8 de P53

Outra alteração encontrada no exon 8 foi a mutação R306*, encontrada apenas em um paciente (4%), esta mutação gera um códon de parada na proteína na posição 306 de P53 (figura 20).

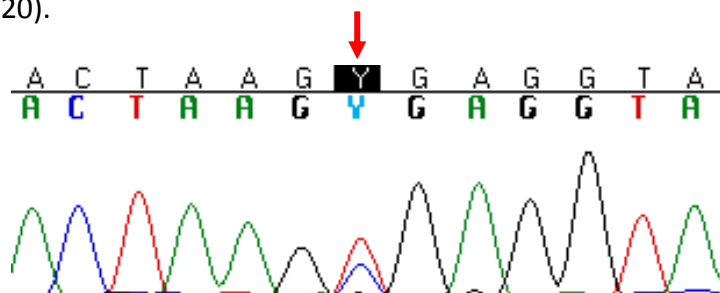


Figura 20 Eletroferograma mostrando a mutação R306* em heterozigose no éxon 8 de P53

A análise no *software Polyphen 2* para avaliar a troca de aminoácidos demonstrou um score máximo de 1.000, representando um grande dano na estrutura protéica (figura 21). A mutação R306* gera um códon de parada e por isso não foi possível aferir o dano causado na proteína, uma vez que o *software Polyphen 2* apenas prediz mutações que geram troca de aminoácidos.

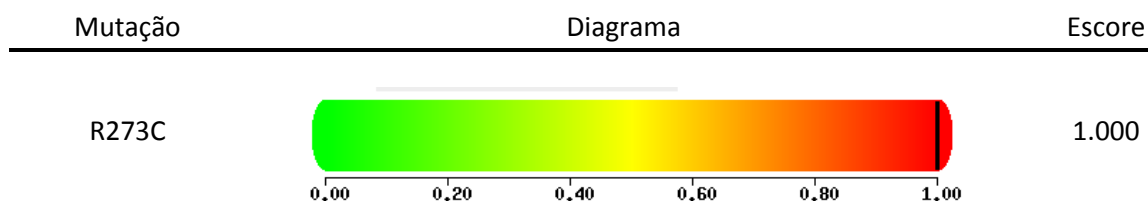


Figura 21 Impacto da mutação R273C em p53

Os resultados da frequência das mutações e dos polimorfismos encontrados foram resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 Mutações e polimorfismos encontrados

| Gene | Mutação / Polimorfismo | Frequência (%) |
|--------|------------------------|----------------|
| K-ras | G12V (6) | 26 |
| | G12R (4) | 17 |
| | G12D (3) | 13 |
| | G12S (1) | 4 |
| EGFR | P753S (1) | 4 |
| | rs1050171 (16) | 60,8 |
| PIK3CA | M983K (1) | 4 |
| | rs141178472 (1) | 4 |
| | rs17849079 (1) | 4 |
| CDKN2A | A148T (1) | 4 |
| P53 | R273C (1) | 4 |
| | R306* (1) | 4 |
| | rs1042522 (18) | 78 |
| | rs1800371 (1) | 4 |

4.3 Análise de Ancestralidade

As diferenças nas proporções de ancestralidade genômica africana, europeia e ameríndia entre os dois grupos caso e controle não foram significativas. Portanto, pacientes com câncer de pâncreas apresentam um componente ancestral semelhante ao da população do grupo controle (gráfico 3). A tabela 6 mostra os índices de ancestralidade genômica dos pacientes com adenocarcinoma pancreático. Os pacientes que estão sublinhados na tabela 6 apresentaram o maior índice de componente ancestral africano e todos estes eram mutados no códon 12 de K-ras.

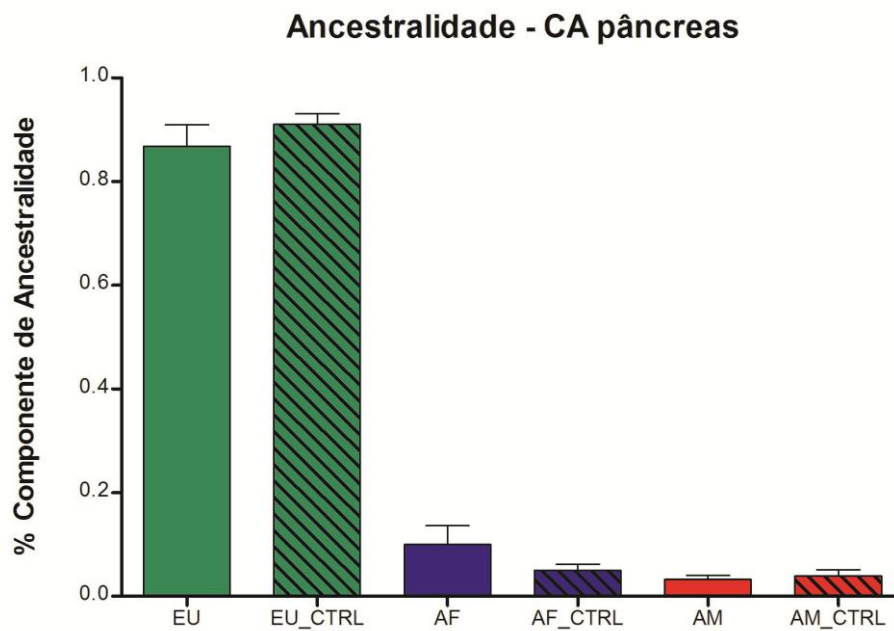


Gráfico 3 Análise da ancestralidade genômica dos pacientes com câncer de pâncreas. EU: Europeus; AF: Africanos; AM: Ameríndios, CTRL: controles. Não foi verificada diferença significativa no componente ancestral entre as amostras de câncer de pâncreas e os controles.

Tabela 6 Índices de ancestralidade genômica dos pacientes com adenocarcinoma pancreático

| | Europeu | Africano | Ameríndio |
|------|---------|----------|-----------|
| PC1 | 0.933 | 0.045 | 0.022 |
| PC3 | 0.947 | 0.046 | 0.007 |
| PC4 | 0.953 | 0.041 | 0.006 |
| PC6 | 0.933 | 0.007 | 0.060 |
| PC8 | 0.954 | 0.019 | 0.026 |
| PC9 | 0.970 | 0.019 | 0.011 |
| PC10 | 0.981 | 0.006 | 0.013 |
| PC11 | 0.980 | 0.011 | 0.010 |
| PC12 | 0.297 | 0.641 | 0.062 |
| PC13 | 0.976 | 0.007 | 0.017 |
| PC14 | 0.943 | 0.031 | 0.026 |
| PC15 | 0.408 | 0.422 | 0.170 |
| PC16 | 0.792 | 0.140 | 0.067 |
| PC17 | 0.900 | 0.076 | 0.024 |
| PC18 | 0.982 | 0.011 | 0.007 |
| PC19 | 0.978 | 0.011 | 0.011 |
| PC21 | 0.961 | 0.015 | 0.024 |
| PC22 | 0.434 | 0.531 | 0.034 |
| PC23 | 0.831 | 0.073 | 0.096 |
| PC24 | 0.948 | 0.045 | 0.007 |
| PC25 | 0.974 | 0.008 | 0.018 |
| PC26 | 0.924 | 0.060 | 0.017 |
| PC27 | 0.961 | 0.028 | 0.011 |

5 DISCUSSÃO

A compreensão da patogênese do câncer de pâncreas é importante para que novos marcadores moleculares possam ser definidos e utilizados no diagnóstico precoce ou como alvos terapêuticos. Avanços na biologia molecular têm demonstrado associação das alterações genéticas e epigenéticas com a progressão do câncer. O desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático originado de lesões precursoras PanIN é gerado pelo acúmulo de mutações somáticas em oncogenes e genes supressores de tumor (Aguirre *et al.*, 2003; Rachakonda *et al.*, 2013). Esta foi a razão pela qual em nosso estudo, optamos por avaliar a frequência das mutações nos genes *K-ras*, *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA*, *CDKN2A* e *p53* em pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático.

Acredita-se que mutações em *K-ras* representem um evento precoce no desenvolvimento e progressão do adenocarcinoma pancreático em razão de sua alta frequência no estágio inicial de lesões precursoras ao adenocarcinoma (Ranchagani *et al.*, 2001; Agbunag e Sagi, 2013). As mutações em *K-ras* são as alterações descritas mais prevalentes em adenocarcinoma pancreático com frequência variando entre 80-100% dos casos (Ishimura *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2011). Porém em nosso estudo, mutações em *K-ras* foram encontradas em apenas 60% dos pacientes, aproximando-se mais dos resultados obtidos em estudos coreanos que variam de 49% a 52% (Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011).

A distribuição das mutações no códon 12 de *K-ras* também difere dos achados prévios, uma vez que a alteração mais prevalente encontrada foi a G12V (43%). Em outros estudos esta foi encontrada entre 17 e 23% das amostras mutadas. A mutação

G12D tem sido descrita como a mais encontrada nos pacientes mutados, 47 e 61% (Immervoll *et al.*, 2006; Rachakonda *et al.*, 2013), e esta foi encontrada em 21% das nossas amostras. Com base nestes achados, podemos sugerir que a alta frequência e a distribuição das mutações em K-ras em câncer pancreático podem variar de acordo com a população. Um estudo baseado na auto classificação, demonstrou que pacientes americanos africanos possuem a mutação G12V mais freqüente que pacientes americanos caucasianos com câncer de pâncreas (Pernick *et al.*, 2003). A ancestralidade dos nossos pacientes, que foi avaliada por meio de marcadores genéticos de acordo com Bastos-Rodrigues e colaboradores (2006), mostrou que os quatro pacientes que apresentaram os maiores índices de ancestralidade africana possuíam mutações no codon 12 de K-ras. Pacientes que apresentam mutações no codon 12 de K-ras possuem uma redução na sobrevida em relação aos pacientes sem a mutação (Rachakonda *et al.*, 2013). Singal e colaboradores (2012) demonstraram que pacientes negros apresentam uma sobrevida reduzida em 20% quando comparados a pacientes brancos, desta forma podemos sugerir que pacientes negros tenham uma sobrevida reduzida em comparação aos pacientes brancos por possuírem maior frequência de mutações em K-ras. Entretanto, novos estudos com maior amostragem devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

O gene KRAS é o alvo mais atraente por estar mutado na grande maioria dos adenocarcinomas pancreáticos. No entanto, os inibidores da proteína de Kras têm sido mal sucedidos no tratamento, recentemente outros genes *downstream* na via RAS, têm sido foco como alvo terapêutico (Wolfgang *et al.*, 2013). Considerando que a frequência de mutações detectadas em K-ras foi menor que a encontrada em outros trabalhos e sabendo da importância da via de Ras na progressão do adenocarcinoma

pancreático, mutações em outros genes desta via, tais como: EGFR, BRAF e PIK3CA foram avaliados neste estudo.

Estudos indicam que mutações em EGFR são pouco freqüentes em câncer de pâncreas (Lee *et al.*, 2007) Weiss e colaboradores (2013) relataram uma freqüência de 2%. Nenhum estudo de pacientes brasileiros com adenocarcinoma pancreático relatou a freqüência de mutações em EGFR. Mutação neste gene foi encontrada em apenas um paciente em nosso estudo (P753S). Esta mesma mutação já foi descrita nos cânceres de pulmão, próstata e glândula salivar (Shimamura *et al.*, 2005; COSMIC, 2013). Entretanto, ainda não foi descrita em câncer de pâncreas, portanto é desconhecido o seu papel na carcinogênese pancreática. Além desta alteração, detectamos o polimorfismo rs105017 em 72% dos pacientes, o qual é muito comum na população (Ensembl, 2013) e, por isto, não o relacionamos com o adenocarcinoma pancreático. Apesar da baixa freqüência de mutações encontradas em EGFR em adenocarcinoma pancreático, o receptor é considerado um alvo terapêutico uma, vez que sua expressão está aumentada no câncer pancreático e nos estágios iniciais das lesões precursoras nos ductos pancreáticos (Ghaneh *et al.*, 2007; Navas *et al.*, 2012).

Estudos em câncer de pulmão demonstraram que a ativação de BRAF causada pela mutação V600E é encontrada em casos que não apresentam mutação em K-ras, por isso, são consideradas mutações independentes e mutualmente exclusivas (Davies *et al.*, 2002; Neuzillet *et al.*, 2012). Entretanto, os resultados encontrados por Ishimura e colaboradores (2003) em adenocarcinoma pancreático não corroboram estes achados, uma vez que duas amostras positivas para a mutação em *k-ras* apresentaram também mutação em *BRAF*. Em nosso estudo, nenhuma amostra apresentou mutação no exon 15 de *BRAF*. Nossos dados são semelhantes aos de anteriores que

demonstram que mutações em BRAF são incomuns em adenocarcinoma pancreático (Ishimura *et al.*, 2003; Immervoll *et al.*, 2006). Apesar da mutação V600E ser pouco freqüente no câncer de pâncreas, foi demonstrado que esta mutação gera o desenvolvimento de lesões precursoras, PanIN, em ratos. Verificou-se, também, que a expressão de V600E associada à mutação em p53, R270H, resulta no desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático (Collisson *et al.*, 2012). Sugerimos que mutações em outros exons de *BRAF* possam estar associadas ao câncer de pâncreas.

A via PI3K-Akt participa da sinalização e controla a progressão do ciclo celular (Neuzillet *et al.*, 2012). A ativação de PI3K é um evento importante na sobrevivência e crescimento celular de diversos tipos de cânceres. Mutações na subunidade catalítica p110 de PI3K (PIK3CA) são as mais estudadas (Weiss *et al.*, 2013). Em nosso estudo encontramos um polimorfismo raro, rs141178472, na região 3'UTR. A troca do nucleotídeo timina por citosina na posição 3393 do transcrito é encontrada em 1% da população europeia (Ensembl, 2013). Não há relatos na literatura sobre a relação deste polimorfismo com o desenvolvimento do câncer de pâncreas e nem se esta alteração na região UTR pode influenciar a função protéica. Outro polimorfismo encontrado em nosso estudo foi o rs17849079, e não foi relacionado com o desenvolvimento do câncer de pâncreas por ser uma alteração sinônima. Um achado muito interessante em nosso estudo foi a identificação de uma mutação ainda não descrita no exon 20 de PIK3CA. Esta mutação foi encontrada em heterozigose em apenas uma de nossas amostras. A troca do nucleotídeo timina por adenina na posição 2949 do gene leva à substituição do aminoácido metionina por lisina, gerando potencial dano na estrutura protéica. Além disso, constatamos que a alteração ocorre na região conservada de PIK3CA e não foi encontrada em nenhum dos controles.

Sendo assim, sugerimos que esta nova mutação esteja relacionada com o desenvolvimento do tumor pancreático no paciente em que identificamos esta mutação. Estudos funcionais são necessários para a melhor compreensão do papel desta mutação, até então não descrita, na carcinogênese pancreática.

Weiss e colaboradores (2013), após revisão na literatura, selecionaram cinco artigos que avaliaram a presença de alterações genéticas em PIK3CA em adenocarcinoma pancreático. Destes, apenas dois estudos encontraram mutações no gene, sendo a média da frequência de mutações de 3,6%. Sendo assim, a frequência de mutações encontradas em nosso estudo foi semelhante às já descritas.

A perda de função de CDKN2A está presente em 80-95% dos cânceres pancreáticos esporádicos. Nossos resultados mostraram apenas a alteração A148 em uma amostra. Este polimorfismo é encontrado em 3% na população europeia (Ensembl, 2013) e, recentemente, um estudo brasileiro demonstrou aumento da susceptibilidade ao melanoma (Bakos *et al.*, 2011). Para avaliar a relação deste com o câncer pancreático um estudo com uma população maior deve ser realizado.

Williams e colaboradores em 2011 relataram baixa frequência de mutações germinativas em CDKN2A em leucócitos de pacientes com adenocarcinoma pancreático (0,6% dos casos). Em nosso estudo nenhuma mutação germinativa ou somática foi encontrada. Apesar da baixa frequência de mutações encontradas em p16, não podemos excluir a participação de CDKN2A na carcinogênese pancreática, uma vez que a perda de função deste gene pode ser por outros fatores genéticos e epigenéticos tais como: perda alélica ou metilação na região promotora (Oshima *et al.*, 2013). Além disso, não avaliamos a presença de mutações no outro transcrito de

CDKN2A, P14ARF, o qual pode ser gerado por “splicing” alternativo no exon 2 de CDKN2A.

As mutações em p53 estão envolvidas na fase tardia do modelo de progressão do adenocarcinoma pancreático e ocorrem nas lesões mais avançadas de PanIN (Maitra *et al.*, 2003). Mutações somáticas em p53 ocorrem de 50 a 75% dos casos de câncer pancreático (Singh *et al.*, 2011). Nossos resultados diferem dos demonstrados, pois essas alterações foram encontradas em apenas 8% dos casos. As duas mutações encontradas foram R306* e R273C. A mutação R306* gera um códon de parada e foi, recentemente, relatada em um adenocarcinoma do endométrio, sendo considerada como o “segundo hit”, uma vez que a paciente já apresentava outra mutação no exon 8 de p53, R273H (Sholl *et al.*, 2013). Entretanto, não identificamos nenhuma outra mutação na amostra que possuía esta alteração. Em nosso estudo, a outra mutação encontrada em p53 (R273C) é um “hot spot” que acarreta na alteração do domínio de transativação da proteína, o que impossibilita sua função de supressão tumoral (Brázdová *et al.*, 2013). A amostra que possuía esta mutação também apresentou a alteração G12R em *K-ras*. As mutações encontradas em p53, em nosso estudo, foram identificadas em heterozigose. De acordo com o modelo da haploinsuficiência, a perda de apenas um alelo em p53 é suficiente para a indução do câncer (Berger *et al.*, 2011), sendo assim, consideramos que as mutações encontradas têm um papel na progressão do tumor.

O polimorfismo rs1042522 em p53 que gera a troca de uma Arginina por uma Prolina, foi encontrado em 78% das nossas amostras. Este polimorfismo é encontrado comumente na Europa, 72% da população (Ensembl, 2013). Este polimorfismo está associado com o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer (Sagne *et al.*,

2013) e apresenta também risco aumentado para o câncer de pâncreas. Acredita-se que a forma selvagem da proteína induza a apoptose com mais eficiência (Naccarati *et al.*, 2010). Para a confirmação desta associação em nossa população são necessários estudos que utilizem uma amostragem maior, assim um maior grupo controle.

Como demonstrado, verificamos que mutações em K-ras, mesmo estando presente em 60% dos casos, são menos freqüentes que a detectada na maioria das outras populações. A freqüência de mutações encontradas nos genes *EGFR*, *BRAF* e *PIK3CA* foi semelhante às já descritas, sugerindo que na via Ras, as mutações em K-ras parecem estar mais envolvidas com a carcinogênese pancreática. Os resultados de mutações em *CDKN2A* e em *p53*, em nosso estudo, foram discrepantes em relação a outros achados, demonstrando a heterogeneidade de mutações em genes envolvidos com a progressão do adenocarcinoma pancreático em diferentes populações.

6 CONCLUSÕES

A frequência de mutações encontradas em K-ras foi 60%, assemelhando-se à estimada nos estudos coreanos, porém inferior à maioria das populações já descritas.

Não identificamos mutação em CDKN2A e apenas 8% dos pacientes apresentaram p53 mutado.

Identificamos uma mutação não descrita na literatura no gene PIK3CA (M983K).

Dentre todas as alterações, mutações em K-ras foram as mais prevalentes.

As mutações no códon 12 de K-ras foram as mais próximas de se correlacionarem com o componente ancestral africano dentre as mutações encontradas.

As alterações genéticas encontradas não indicam estarem relacionadas com sexo, idade e estadiamento do câncer de pâncreas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbunag C, Sagi DB. 2004. Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Research*. 64: 5659-5663.
- Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA. 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 17(24): 3112 – 3126.
- Ahmed SM, Salgia R. 2006. Epidermal growth factor receptor mutations and susceptibility to targeted therapy in lung cancer. *Respirology* 11(6):687-92.
- AJCC. American Joint Committee on Cancer. Disponível em : <<http://www.cancerstaging.org/>> Acesso: 2013.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, NY, USA.
- American Cancer Society . Disponível em: < <http://www.cancer.org/> > Acesso: 2013.
- Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T, Bakos L, Santos SE, Prolla PA, Berking C, Giugliani R. 2011. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Experimental Dermatology*. 20 (11): 890–893.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. 2006. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet*. 70(5):658-65.
- Beger H, Warshaw A, Büchler M, Kozarek R, Lerch M, Neoptolemos J, Shiratori K, Whitcomb D. 2008. *The pancreas: An integrated textbook of basic science, medicine and surgery*. 2th ed.

- Brázdová M, Navrátilová L, Tichý V, Neřmcová K, Lexa M, Hrstka R, Pečina P, Adámik M, Vojtesek B, Paleček E, Deppert W, Fojta M 2013. Preferential Binding of Hot Spot Mutant p53 Proteins to Supercoiled DNA In Vitro and in Cells. *PLoS ONE* 8(3): 59567.
- Bracci PM. 2012. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Carcinog.* 51: 53-63.
- Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. 2011. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. Review. *Mol Cancer Ther.* 10(3):385-94.
- Chen QM, Luo G, Li BQ, Samaranayake LP. 1999. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 28:158-64.
- Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, Gu S, Korkola JE, Heiser LM, Charles RP, Rabinovich BA, Hann B, Dankort D, Spellman PT, Phillips WA, Gray JW, Mahon MM. 2012. A central role for RAF-MEK-ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer discovery.* 2: 685-693.
- COSMIC. COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Disponível em <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/> Acesso:2013.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. 1999. Robbins Pathologic Basis of disease. W.B. Saunders, 8th ed. Philadelphia, PA, USA.
- Coupland VH, Kocher HM, Berry DP, Allum W, Linklater KM, Konfortion J, Møller H, Davies EA. 2012. Incidence and survival for hepatic, pancreatic and biliary cancers in England between 1998 and 2007. *Cancer Epidemiology.* 36: 207-214.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson

R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417(6892):949-54.

Downward J. 2003. Targeting Ras Signalling Pathways In Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer*. 3(1): 11-22.

Edlund H. 2002. Pancreatic organogenesis- developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature*. 3: 524-532.

Ensembl. Ensembl Nucleic Acids Research. Disponível em <<http://www.ensembl.org/index.html>> Acesso: 2013.

Fernandez MRF, Sot B. 2011. The relevance of protein-protein interactions for p53 function: the CPE contribution. *Protein Engineering, Design & Selection*. 24: 41-51.

Garnett M & Marais R. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 6(4):313-9.

Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. 2007. Biology and management of pancreatic cancer. *GUT*. 56:1134-1152

Hamoir C, Pepermans X, Piessevaux H, Jouret-Mourin A, Weynand B, Habyalimana JB, Leal T, Geubel A, Gigot JF, Deprez PH. 2013. Clinical and Morphological Characteristics of Sporadic Genetically Determined Pancreatitis as Compared to Idiopathic Pancreatitis: Higher Risk of Pancreatic Cancer in CFTR Variants. *Digestion*. 87(4):229-39.

Holen KD, Klimstra DS, Hummer A, Gonen M, Conlon K, Brennan M, Saltz LB. 2002. Clinical Characteristics and Outcomes from an Institutional Series of Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas and Related Tumors. *J Clin Oncol* 20:4673-4678.

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers 253(5015):49-53.
- Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, Molven A. 2006. Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. *Virchows Arch.* 448: 788-796.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em:
< <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>>. Acesso: 2013.
- Irmer D, Funk JO, Blaukat A. 2007. EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene.* 26(39): 5693-701.
- Ishimura N, Yamasawa K, Rumi MAK, Kadowaki Y, Ishihara S, Amano Y, Nio Y, Higami T, Kinoshita Y. 2003. BRAF and K-ras gene mutations in human pancreatic cancers. *Cancer Letters.* 2(199)169-173.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Laguna IG, Kurzrock R. 2011. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *Plos One.* 6(7):e22769.
- Jesnowski R, Zubakov D, Zubakov R, Ringel J, Hoheisel J, Loßel R, Schnoßler M, Loßhr M. 2007. Genes and Proteins Differentially Expressed during In Vitro Malignant Transformation of Bovine Pancreatic Duct Cells. *Neoplasia.* 9: 136-146.
- Kennedy AL, Morton JP, Manoharan I, Nelson DM, Jamieson NB, Pawlikowski JS, Bryan TM, Doyle B, Oien KA, Enders GH, Zhang R, Sansom OJ, Adams PD. 2011. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell.* 42(1): 36-49.

- Kim ST, Lim DO H, Jang KT, Lim T, Lee J, Choi YL, Jang HL, Yi JH, Baek KK, Park SH, Park YS, Lim HY, Kang WK, Park JO. 2011. Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 10(10):1993-9.
- Klimstra DS. 2007. Noductal neoplasms of the pâncreas. *Modern Pathology.*20: 94-112.
- Kurtz GS, Vargens DD, Struchiner CJ, Rodrigues LB, Pena SDJ. 2007. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics.* 17(9):765-71.
- Lee J, Jang KT, Ki CS, Lim T, Park YS, Lim HY, Choi DW, Kang WK, Park K, Park J. 2007. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Kinases mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *American Cancer Society.* 109(8):1561-9.
- Li D. 2012. Diabetes and Pancreatic Cancer. *Mol Carcinog.* 51(1): 64–74
- Li J, Wientjes MJ, Au J L-S. 2010. Pancreatic Cancer: Pathobiology, Treatment Options, and Drug Delivery. *The AAPS Journal.* 12: 223- 232.
- Liao X, Morikawa T, Lochhead P, et. al. Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clin Cancer Research.* 18:2257-2268.
- Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, Mountzios G, Papadimitriou C, Papadopoulos S, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. 2011. All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 37: 221-233

- Lowery MA, Klimstra DS, Shia J, Yu KH, Allen PJ, Brennan MF, Reilly EM. 2011. Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: New Genetic and Treatment Insights into a Rare Malignancy. *The Oncologist*. 16:1714–1720
- Lowery MA, Reilly EM. 2011. Genomics and pharmacogenomics of pancreatic adenocarcinoma. *Nature*. 12:1-9.
- Lozano-Leon A, Perez-Quintela BV, Iglesias-García J, Urisarri-Ruiz A, Lariño-Noia J, Abdulkader I, Varo E, Forteza J, Domínguez-Muñoz JE. 2011. Clinical relevance of epidermal growth factor receptor (EGFR) alterations in human pancreatic tumors. *Oncology Reports*. 26(2):315-20.
- Maitra A, Adsay NV, Argani P, Donahue CI, Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. 2003. Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray. *Mod Pathol*. 16(9):902–912.
- Meek DW. 2009. Tumor suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature*. 9:714-723.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16(3):1215.
- Murray S, Timotheadou E, Linardou H, Vrettou AV, Kostopoulos I, Skrickova J, Papakostantinou C, Christodoulou C, Pectasides D, Samantas E, Papakostas P, Skarlos DV, Kosmidis P, Fountzilias G. 2006. Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 52:225-33.
- Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Smerhovsky Z, Vodickova L, Soucek P, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Vodicka P. 2010. Genotype and haplotype analysis of TP53 gene and the

risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic. *Carcinogenesis*. 31(4):666-70.

Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. 2002. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 62:7001-7003.

Navas C, Porras IH, Schuhmacher AJ, Sibilía M, Guerra C, Barbacid M. 2012. EGFR receptor signaling is essential for K-Ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 22:318-330.

Neuzillet C, Hammel P, Raballand AT, Couvelard A, Raymond E. Targeting the RAS-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma. 2012. *Cancer Metastasis Rev*. 32(1-2):147-62.

Nucera C, Lawler J, Parangi S. 2011. BRAFV600E and microenvironment in thyroid cancer: a functional link to drive cancer progression. *Cancer Res*. 71(7): 2417-22.

Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, Yachida S. 2013. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Annals of Surgery*. 258(2):336-46.

Perera RM, Bardeesy N. 2012. Ready, set, go: The EGFR receptor at the pancreatic cancer starting line. *Cancer Cell*. 3(22):281-282.

Pernick NL, Sarkar FH, Philip PA, Arlauskas P, Shields AF, Vaitkevicius VK, Dugan MC, Adsay NV. 2003. Clinicopathologic analysis of pancreatic adenocarcinoma in african americans and caucasians. *Pancreas*. 26: 28-32.

Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R, Vuorinen AJ. 2013. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Research*. 1(15) 2-10.

Preis M, Korc M. 2010. Kinase signaling pathways as targets for intervention in pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy* 9:10, 754-763

PROTEIN DATA BANKING. Human K-Ras in complex with a GTP analogue. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3GFT>> Acesso: 2012.

Qian J, Niu J, Li M, et. al. 2005. In vitro Modeling of Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Transformation Defines Gene Expression Changes Induced by K-ras Oncogenic Activation in Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Research*. 65(12):5045-53.

Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Carracedo DG, Wang WM, Kuo CY, Chen D, Arking DE, Lowy AM, Hruban RH, Remotti HE, Su GH. Disruption of p16 and Activation of Kras in Pancreas Increase Ductal Adenocarcinoma Formation and Metastasis in vivo. *Oncotarget*.2: 862-873

Rachagani S, Senapati S, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Kumar S, Smith LM, Jain M, Batra SK. Activated Kras G12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. *British Journal of Cancer*. 104:1038-1048.

Rachakonda PS, Bauer AS, Xie H, Campa D, Rizzato C, Canzian F, Beghelli S, Greenhalf W, Costello E, Schanne M, Heller A, Scarpa A, Neoptolemos JP, Werner J, Buchler M, Hoheisel JD, Hemminki k, Giese N, Kumar R. 2013. Somatic Mutations in Exocrine Pancreatic Tumors: Association with Patient Survival. *Plos One*. 8(4): e60870.

Rajagopalan S, Andreeva A, Rutherford TJ, Fersht AR. 2010. Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. *PNAS*.19: 8587–8592.

Richter, A., M. Niedergethmann, J.W. Sturm, D. Lorenz, S. Post and M. Trede. 2003. Long term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25 yeas experience. *World J Surg* . 27:(3) 324-9.

- Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W. 2006. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 12(24):7232-41.
- Robbins. 2010. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6th ed. Ed. Guanabara.
- Sagne C, Marcel V, Amadou A, Hainaut P, Olivier M, Hall J. 2013. A meta-analysis of cancer risk associated with the TP53 intron 3 duplication polymorphism (rs17878362): geographic and tumor-specific effects. *Nature.* 4: 492.
- Saif MW. 2011. Pancreatic Neoplasm in 2011: An Update. *JOP J Pancreas (Online)*. 12(4):316-321.
- Shimamura T, Lowell AM, Engelman JA, Shapiro GI. 2005. Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Research.* 65(14):6401-8.
- Sholl AB, Aisner DL, Behbakht K, Post MD. 2013. Novel TP53 gene mutation and correlation with p53 immunohistochemistry in a mixed epithelial carcinoma of the endometrium. *Gynecologic Oncology Reports* 3: 11-13.
- Singal V, Singal AK, Kuo YF. J. 2012. Racial disparities in treatment for pancreatic cancer and impact on survival: a population-based analysis. *Cancer Res. Clin Oncol* 138: 715-722.
- Singh P, Srinivasan R, Wig JD, FRCS. 2011. Major molecular markers in pancreatic ductal adenocarcinoma and their roles in screening diagnosis, prognosis, and treatment. *Pancreas Journal.* 40(5):644-52.
- Stoita A, Penman ID, Williams DB. 2011. Review of screening for pancreatic cancer in high risk individuals. *World Journal of Gastroenterol.* 19: 2365-2371.
- Strosberg J, Gardner N, Kvols L. 2009. Survival and prognostic factor analysis in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Pancreas.* 38:255-8.

- Tahira AC, Kubrusly MS, Faria MF, Dazzani B, Fonseca RS, Coutinho VM, Almeida SV, Machado MCC, Reis E. 2011. Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer. *Molecular Câncer*. 10:141
- Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simões M. 2006. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol*. 37(7):781-6.
- Truty MJ, Thomas RM, Katz MH, Vauthey JN, Crane C, Varadhachary GR, Wolff RA, Abbruzzese JL, Lee JE, Fleming JB. 2012. Multimodality Therapy Offers a Chance for Cure in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma Deemed Unresectable at First Operative Exploration. *J Am Coll Surg*. 215:41–52.
- UICC. União Internacional contra o cancer. Disponível em: < <http://www.uicc.org/> > Acesso: 2013
- Villanueva MH, Gironella M, Castells A, Bujanda L. 2013. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta*.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 116(6):855-67.
- Weiss GA, Rossi MR, Khushalani NI, Gibbs JF, Bharthuar A, Cowell JK, Iyer R. 2013. Evaluation of phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit (PIK3CA) and epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations in pancreaticobiliary adenocarcinoma. *J. Gastrointestinal Oncology*. 4(1): 20-29.
- Wiencke JK. Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. 2004. *Nature Reviews*. 4: 79-84.

- Williams RRM, Wieben ED, Rabe KG, Pedersen KS, Wu Y, Sicotte H, Petersen GM. 2011. Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling. *European Journal of Human Genetics*. 19: 472–478.
- Wittel UA, Momi N, Seifert G, Wiech T, Hopt UT, BATRA SK. 2012. The pathobiological impact of cigarette smoke on pancreatic cancer development. *Int J Oncol*. 41: 5-14.
- Wolfgang CL, Herman JH, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, HrubanH R. 2013. Recent Progress in Pancreatic Cancer. *A Cancer Journal for Clinicians* (no prelo).
- Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, et al. 1993. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Research*. 53:953–6.
- Yeo TP, Lowenfels AB. 2012. Demographics and Epidemiology of Pancreatic Cancer. *Cancer J*. 18: 477-484.
- Zuo Z, Chen SS, Chandra PK, Galbincea JM, Soape M, Doan S, Barkoh BA, Koeppen H, Medeiros LJ, Luthra R. 2009. Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples. *Modern Pathology*. 22: 1023-1031.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº Registro COEP: 09135912.6.0000.5149

**Título do Projeto: Caracterização molecular e clínica de pacientes com
Câncer do Trato Gastrointestinal**

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa de título: "Caracterização molecular e clínica de pacientes com Câncer do Trato Gastrointestinal". O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia com cuidado as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado (a).

Objetivo do estudo

Este projeto está sendo proposto porque há poucos estudos no Brasil sobre as bases moleculares dos cânceres do trato gastrointestinal e sua relação com fatores presentes no dia a dia, ao longo da vida. O objetivo desse trabalho é o de estudar, em uma população brasileira, o papel de alguns genes e proteínas relacionados aos cânceres do trato gastrointestinal e assim propiciar um melhor controle da doença.

Procedimentos

Todos os indivíduos que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido têm algum tipo de câncer do trato gastrointestinal já diagnosticado. Não serão administrados aos pacientes quaisquer medicamentos ou testes diagnósticos. O único inconveniente aos quais os pacientes serão submetidos será a coleta de sangue total (10 ml). O desconforto associado à coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina. A coleta será realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para o paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamento de qualquer espécie.

Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Luiz Armando De Marco (coordenador da pesquisa), Nayra Soares do Amaral, Dra. Vivian Resende e Dra. Luciana Bastos Rodrigues.

Confidencialidade

Todos os dados dessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante receberá um código garantindo confidencialidade de sua identidade. Caso o (a) senhor (a) queira, terá acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco adicional ao participante, exceto aqueles inerentes à própria coleta de sangue. Esta pesquisa é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de pâncreas e de fígado.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou dano, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dr. Luiz Armando De Marco, Dra. Luciana Bastos Rodrigues e Nayra Soares do Amaral no telefax 3409-9134 (UFMG) ou Dra. Vivian Resende (31)92637000

Eu, _____, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante