

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

CRISTINA DA SILVA SÁBATO

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E SUPRESSORES TUMORAIS EM PACIENTES COM
CÂNCER DE VESÍCULA BILIAR**

BELO HORIZONTE

NOVEMBRO, 2013

CRISTINA DA SILVA SÁBATO

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E SUPRESSORES TUMORAIS EM PACIENTES COM
CÂNCER DE VESÍCULA BILIAR**

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

NOVEMBRO, 2013

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Luiz Armando de Marco, pela oportunidade, confiança, disponibilidade e paciência.

À professora Luciana Bastos Rodrigues pelo apoio, amizade e compreensão.

À professora Vivian Resende pela disponibilidade, sugestões, ajuda e colaboração. Você foi muito importante para a realização desse trabalho.

À professora Paula Vidigal e ao Departamento de Anatomia Patológica, pelo auxílio.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar dessa pesquisa.

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

A todas as colegas do laboratório pela convivência agradável e descontraída, pelas conversas, risadas, ajudas, apoio e amizade. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Aos colegas do laboratório de Neurociências pela troca de conhecimentos e disponibilidade.

Aos meus familiares, avós, tios e primos, que sempre se interessaram e me apoiaram durante o mestrado. Especialmente à Deila e meus outros tios colegas de profissão, pelos conselhos e torcida, desde a graduação até hoje. Obrigada por não me deixarem desistir.

Aos amigos queridos que, mesmo com momentos de distância, fizeram parte dessa caminhada, nas dificuldades e conquistas: Lili, Flavinha, Ju, Luis, Nay, Lennon, Prima, Nati, Fredinho, Lamêgo, Johnny. Só tenho a agradecer por ter vocês na minha vida, pela torcida, apoio e momentos de descontração.

Aos meus pais, Cristina e Luiz Otávio, e à minha irmã, Luísa. Obrigada pela compreensão, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

RESUMO

O câncer de vesícula é a neoplasia mais comum do trato biliar e a quinta mais frequente no trato gastrointestinal. Esse câncer é considerado muito raro na maioria dos países ocidentais, mas apresenta alta incidência na Ásia e em alguns países da América do Sul. Seu principal fator de risco é a colelitíase, mas também está associado à da idade avançada, sexo feminino, alguns grupos étnicos, inflamação crônica na vesícula e junção pancreatobiliar anômala (JPBA). O carcinoma vesicular apresenta sinais e sintomas inespecíficos e por isso o diagnóstico na maioria dos casos é tardio, quando o tumor já se encontra irressuscável. O prognóstico é, em geral, ruim com sobrevivência de cinco anos em apenas 5 a 10% dos pacientes. A carcinogênese vesicular ainda não é bem compreendida, principalmente no que tange aos mecanismos genéticos. Com o objetivo de melhor elucidar esse mecanismo o presente trabalho avaliou o papel de oncogenes e genes supressores de tumor na tumorigênese vesicular. Sendo assim, a presença e frequência de mutações nos oncogenes *KRAS*, *PIK3CA* e *BRAF* e nos supressores tumorais *P53* e *CDKN2A* foi avaliada em 12 pacientes com diagnóstico de carcinoma de vesícula. Os dados clínicos foram avaliados e a ancestralidade genômica desses indivíduos investigada. Os pacientes apresentaram média de idade de 65 anos, 75% do sexo feminino e a grande maioria (92%) apresentava colelitíase. A maior parte deles (75%) recebeu o diagnóstico com o tumor em estágio avançado. A análise de ancestralidade genômica sugere relação do componente ancestral africano com a ocorrência da doença. As análises genéticas mostraram que 25% dos pacientes apresentaram mutação no oncogene *KRAS*, sendo que um deles apresentou duas alterações. Uma dessas alterações (I55T) encontradas é uma mutação ainda não descrita na literatura. *CDKN2A* foi o gene que apresentou maior frequência de mutação (41,7%). Deleções em *TP53* foram encontradas em 16,7% das amostras. Não foram encontradas mutações em *BRAF* e *PIK3CA*. De acordo com os resultados desse trabalho pode-se indicar uma importante associação do gene *CDKN2A* no desenvolvimento de tumores de vesícula. Os genes *TP53* e *KRAS*, apesar de apresentarem uma frequência menor de mutações, também estão associados à carcinogênese desses tumores. Apesar de os resultados não terem demonstrado alterações nos genes *BRAF* e *PIK3CA* mais estudos são necessários para avaliar sua participação na tumorigênese vesicular.

Palavras chave: Câncer de vesícula, *CDKN2A*, *P53*, *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS*, oncogene, supressor de tumor.

ABSTRACT

Gallbladder cancer is the most common malignancy of the biliary tract and the fifth most common tumor in the gastrointestinal tract. This tumor is rare in most Western countries but has high incidence in Asia and in some South American countries. Its main risk factor is cholelithiasis but it is also associated with advanced age, female sex, some ethnic groups, chronic inflammation in gallbladder and anomalous pancreaticobiliary junction (APBJ). Gallbladder carcinoma presents nonspecific signs and symptoms; in most cases the tumor is not easily diagnosed and not probe to resection. The prognosis is generally poor with a five-year survival in only 5-10 % of patients. The gallbladder carcinogenesis is not well understood, especially regarding genetic mechanisms. Aiming to further elucidate this mechanism the present study evaluated the role of oncogenes and tumor suppressor genes in vesicular tumorigenesis. Thus, the presence and frequency of mutations in the oncogenes *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA*, and the tumor suppressors *p53* and *CDKN2A* were determined in 12 patients with gallbladder carcinoma. Clinical data were assessed and genomic ancestry of these individuals performed. Patients had a mean age of 65 years old, 75% were female and the vast majority (92%) had cholelithiasis. Most of them (75%) had been diagnosed with advanced-stage tumor. The analysis of genomic ancestry suggests a relationship of African component ancestry with the occurrence of the disease. Genetic analysis showed that 25% of patients had mutations in *KRAS* oncogene, one of which presented two changes. One of these changes (I55T) is a novel mutation. The *CDKN2A* gene was the one with higher mutation frequency (41.7%). P53 deletions were found in 16.7% of samples. There were no mutations in *BRAF* and *PIK3CA*. According to the results of this study a significant association of the *CDKN2A* gene in the development of tumors of the gallbladder may be suggested. *KRAS* and *p53* genes, despite having a lower mutation frequency, are also associated with carcinogenesis of these tumors. Although the results have not shown alterations in *BRAF* and *PIK3CA* more studies are needed to establish their involvement in gallbladder tumorigenesis.

Key words: Gallbladder cancer, *CDKN2A*, *P53*, *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS*, oncogene, tumor suppressor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gene <i>CDKN2A</i> e seu papel na regulação do ciclo celular.....	24
Figura 2. Via de sinalização celular.....	26
Figura 3. Representação da deleção 345_373del no éxon 4 de TP53	42
Figura 4. Representação da deleção 1042_1233del no éxon 8 de TP53	43
Figura 5. Eletroferograma mostrando a alteração W15X encontrada em heterozigose no éxon um do gene <i>CDKN2A</i>	44
Figura 6. Eletroferograma mostrando a alteração A127S encontrada em heterozigose (esquerda) e em homozigose (direita) no éxon dois de <i>CDKN2A</i>	44
Figura 7. Eletroferograma mostrando a alteração A148T em heterozigose no éxon dois do gene <i>CDKN2A</i>	45
Figura 8. Eletroferograma mostrando a alteração G12V em heterozigose no éxon dois do gene <i>KRAS</i>	46
Figura 9. Eletroferograma mostrando a alteração G12R em heterozigose no éxon dois do gene <i>KRAS</i>	46
Figura 10. Gel de acrilamida para confirmação da presença de mutações no éxon 12 de <i>KRAS</i> através da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima MVAI.	47
Figura 11. Eletroferograma mostrando a alteração G13D em heterozigose no éxon dois do gene <i>KRAS</i>	47
Figura 12. Eletroferograma mostrando a alteração I55T em heterozigose no éxon três do gene <i>KRAS</i>	48
Figura 13. Resultado do software PROVEAN para a alteração I55T.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de câncer de vesícula biliar	15
Tabela 2. Alterações genéticas envolvidas com adenocarcinoma de vesícula biliar	21
Tabela 3. Características da amplificação por PCR dos genes selecionados.....	35
Tabela 4. Características clínicas dos pacientes com câncer de vesícula biliar.....	40
Tabela 5. Avaliação do dano proteico causado pelas mutações encontradas em <i>CDKN2A</i>	45
Tabela 6. Avaliação do dano proteico causado pelas mutações encontradas em <i>KRAS</i>	49
Tabela 7. Frequência de alterações encontradas em cada gene	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise da ancestralidade genômica dos pacientes com câncer de vesícula biliar.... 51

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	microlitro
μ M	micromolar
AJCC	"American Joint Commission on Cancer"
ARF	"Alternate Reading Frame"
BRAF	"V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1"
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
COSMIC	"Catalogue of somatic mutations in cancer"
CTNNB1	"Catenin beta-1"
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	"Deoxyribonucleotide triphosphate"; termo genérico que define os quatro deoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
EDTA	Ácido etileno di-amino tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	"Epidermal Growth Factor Receptor"
GAPs	"GTPase activating proteins"
GDP	Guanosina-difosfato
GEFs	"Guanine nucleotide exchange factors"
GTP	Guanosina-trifosfato
HRAS	"V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog"
INCA	Instituto Nacional do Cancer
Indels	"Short insertion/deletion polymorphisms"
JPBA	Junção Pancreatobiliar Anômala
KRAS	"V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
LOH	Perda de heterozigose
M	Molar
MDM2	"Mouse double minute 2 homolog"
mg	miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	mililitro
mM	miliMolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NRAS	"Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog"
OMS	Organização Mundial da Saúde
P14	Proteína 14
P16	Proteína 16
P53	Proteína 53
PBS	Tampão salino fosfatado ("phosphate buffered saline")
PCR	Reação em cadeia da polimerase (" <i>Polymerase chain reaction</i> ")
PCR-RLFP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
PI3K	"Phosphatidylinositol 3 kinase"
PIK3CA	"Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha"
PTEN	"Phosphatase and tensin homolog"
Rb	Proteína do retinoblastoma

ROS	Espécies reativas do oxigênio
SCC	Carcinoma Escamo Celular
SCLC	Câncer de Pequenas Células de Pulmão
SDS	"Sodium dodecyl sulfate"
SMAD4	"SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)"
SNP	"Single-Nucleotide Polymorphism"
TBE	Tris Base EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TK	Tirosina quinase
TP53	Gene da proteína p53
TNM	Tumor-Nódulo-Metastase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UICC	"Union Internationale Contre le Cancer"

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Vesícula biliar	13
1.2 Carcinoma de vesícula biliar.....	13
1.2.1 Tratamento.....	15
1.2.2 Fatores de risco	16
1.2.3 Aspectos genéticos.....	20
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 SUJEITOS.....	31
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS	31
3.3 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS.....	32
3.4 ANÁLISES MOLECULARES	32
3.4.1 Extração de DNA.....	32
3.4.2. Amplificação e sequenciamento das amostras.....	34
3.4.3 Análise de mutação do códon 12 de <i>KRAS</i> por PCR – RFLP	36
3.4.4 Análises de Ancestralidade	37
3.5 ANÁLISE DE PREDIÇÃO DE DANO À PROTEÍNA	37
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4 RESULTADOS	39
4.1 AMOSTRAGEM E DADOS CLÍNICOS.....	39
4.2 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO	40
4.2.1 <i>TP53</i>	40
4.2.2 <i>CDKN2A</i>	44
4.2.3 <i>PIK3CA</i>	46
4.2.4 <i>KRAS</i>	46

4.2.5 <i>BRAF</i>	50
4.3 ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE GENÔMICA	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO 1	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vesícula biliar

A vesícula biliar, situada abaixo do lobo direito do fígado, é um importante componente do sistema biliar. Suas principais funções são a de armazenar e concentrar, por meio da absorção de água e eletrólitos, a bile produzida pelo fígado (WISTUBA & GAZDAR, 2004). A vesícula biliar possui uma parede fina (< 3 mm) composta por uma única camada de revestimento colunar, lâmina própria fina, camada muscular delgada e serosa. A camada muscular é descontínua, não possui muscular da mucosa e nem submucosa. Na região de contato direto com o fígado não possui serosa (DUTTA, 2012).

1.2 Carcinoma de vesícula biliar

O carcinoma da vesícula biliar é o tipo mais comum de câncer do trato biliar, contando com 60% dos casos, e a quinta forma mais comum do trato digestivo (WISTUBA & GAZDAR, 2004; MILLER *et al.*, 2009). É considerado muito raro na maioria dos países ocidentais, mas mais comum em outras partes do mundo. As maiores incidências são encontradas em mulheres da Índia (21.5/100.000), Chile (18.1/100.000), Paquistão (13.8/100.000) e Equador (12.9/100.000) (GOLDIN & ROA, 2009). Altas incidências também podem ser encontradas na Coreia e no Japão, e em alguns países europeus das regiões central e leste, como Polônia, República Tcheca e Eslováquia (RANDI *et al.*, 2006). Em Belo Horizonte, no período de 2000 a 2003, foram registrados, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 138 novos casos de câncer de vesícula biliar (INCA). A grande variação

geográfica e étnica na incidência do câncer de vesícula sugere uma importante influência genética e ambiental no desenvolvimento da doença (PAI *et al.*, 2011) que pode ser correlacionada com a prevalência de colelitíase no mundo (WISTUBA & GAZDAR, 2004).

O câncer de vesícula apresenta sinais e sintomas inespecíficos como dor abdominal, cólica biliar, anorexia, perda de peso e icterícia que, frequentemente, aparecem tardiamente no curso clínico da doença (RANDI *et al.*, 2006; MILLER & JARNAGIN, 2008; DUTTA, 2012). Por essa razão, o diagnóstico geralmente é feito quando o câncer já se encontra em estágio avançado, e apenas cerca de 30% dos pacientes têm indicação cirúrgica, que representa a única opção possivelmente curativa (MARSH *et al.*, 2012). Aproximadamente 5 a 10% dos pacientes apresentam taxa de sobrevida de cinco anos (McNAMARA *et al.*, 2013). Sobrevidas em longo prazo são vistas principalmente em pacientes que descobrem o tumor incidentalmente, durante colecistectomia, devido a cálculos na vesícula; mas esses representam apenas 2% dos casos (DUTTA, 2012).

As características histológicas da vesícula favorecem a invasão tumoral precoce no fígado e, além disso, a drenagem linfática, extensa e em várias direções, facilita a disseminação linfonodal (DUTTA, 2012). Metástases à distância também podem ser observadas no peritônio e ocasionalmente nos pulmões e na pleura (MILLER & JARNAGIN, 2008).

O sistema de estadiamento TNM (do inglês, *tumor-node-metastasis*) mais recomendado e utilizado para classificação dos tumores de vesícula é o desenvolvido pela *International Union Against Cancer* (UICC) e pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (BOUTROS *et al.*, 2012). O estadiamento do câncer de vesícula biliar é baseado na profundidade de invasão do tumor (T), presença de metástase em linfonodos (N) e de

metástase à distância (M). O componente T é o fator mais importante para determinar a conduta cirúrgica em tumores possivelmente ressecáveis (JAYARAMAN & JARNAGIN, 2010).

A maioria dos tumores (60%) se desenvolve na região do fundo da vesícula; 30% no corpo; e 10% no colo. Macroscopicamente, o carcinoma de vesícula pode ser categorizado em papilar, tubular ou nodular, sendo que os tipos nodulares podem apresentar rápida invasão e maior incidência de metástase linfonodal (GOURGIOTIS *et al.*, 2008).

O tipo histológico mais comum é o adenocarcinoma, em mais de 80% dos casos; mas os tumores podem ser ainda indiferenciados, carcinoma de células escamosas ou de células adenoescamosas (Tabela 1) (GOURGIOTIS *et al.*, 2008).

Tabela 1 Tipos de câncer de vesícula biliar

Tipo de tumor	Incidência
Adenocarcinoma	80-95 %
Indiferenciado ou carcinoma anaplásico	2-7 %
Carcinoma de células escamosas	1-6 %
Carcinoma adenoescamoso	1-4 %

Fonte: GOURGIOTIS *et al.*, 2008 (Adaptado).

1.2.1 Tratamento

O único tratamento potencialmente curativo para o adenocarcinoma primário de vesícula biliar continua sendo a ressecção cirúrgica completa do tumor e, para tanto, o estadiamento do tumor é um importante critério para a definição da conduta clínica, seja cirúrgica ou paliativa (ZHU *et al.*, 2010). Opções cirúrgicas para ressecção curativa do câncer de vesícula incluem colecistectomia simples, colecistectomia estendida ou até excisão

radical da vesícula com ressecção de lobo hepático e/ou ressecção de outros órgãos adjacentes (BOUTROS *et al.*, 2012). Porém, mesmo sendo possível a intervenção cirúrgica, o risco de recorrência é alto, com índices de sobrevida em cinco anos em apenas 20 a 40% dos pacientes (ZHU *et al.*, 2010; MARINO *et al.*, 2013).

Pacientes com estágio mais avançado da doença, que apresentam sintomas e não possuem indicação cirúrgica, além de pacientes que apresentam recidiva local ou à distância após ressecção, são submetidos apenas a tratamento paliativo (MILLER & JARNAGIN, 2008; McNAMARA *et al.*, 2013). A sobrevida média dos pacientes com câncer de vesícula avançado e daqueles considerados inoperáveis é de apenas dois a quatro meses (JAYARAMAN & JARNAGIN, 2010). Sintomas e condições associadas com o câncer de vesícula incurável incluem icterícia, prurido, colangite, dor e obstrução biliar e gastrointestinal (MILLER & JARNAGIN, 2008), e procedimentos como drenagem biliar, quimioterapia e radioterapia podem ser realizados visando aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (JAYARAMAN & JARNAGIN, 2010). Porém, os pacientes normalmente apresentam pouca e curta resposta aos tratamentos quimioterápico e radioterápico (MILLER & JARNAGIN, 2008).

1.2.2 Fatores de risco

É bem estabelecido na literatura, por estudos epidemiológicos e clínicos, que o trato biliar é um bom exemplo de câncer associado à inflamação (ADSAY, 2007), e, por isso, os principais fatores de risco são relacionados a essa condição inflamatória crônica da vesícula. A presença de cálculos e pólipos, infecção crônica bacteriana e a Junção Pancreatobiliar Anômala (JPBA) são alguns exemplos, além da idade avançada, sexo

feminino, alguns grupos étnicos e populações geográficas (McNAMARA *et al.*, 2013; DUTTA, 2012).

1.2.2.1 Idade e gênero

A incidência de câncer de vesícula cresce progressivamente com a idade, com a maior ocorrência entre os sessenta e setenta anos. As mulheres são mais afetadas, apresentando uma incidência duas a seis vezes maior do que os homens (DUFFY *et al.*, 2008; KONSTANTINIDIS *et al.*, 2009; RUSTAGI & DASANU, 2012).

1.2.2.2 Etnia e variação geográfica

Observa-se que a incidência de câncer de vesícula varia entre grupos étnicos dentro de um mesmo país, como, por exemplo, nos Estados Unidos, em que mulheres hispânicas na Califórnia e no Novo México apresentam taxas de incidência maiores do que qualquer outro grupo étnico no país (GOURGIOTIS *et al.*, 2008). Algumas populações como hispânicos, índios norte americanos e índios mexicanos são identificadas como grupos de alto risco para desenvolvimento do câncer de vesícula biliar (DUTTA, 2012). As maiores incidências são encontradas em populações que habitam regiões a oeste dos Andes, em populações de índios norte-americanos, índios mexicanos e habitantes do norte da Índia (WISTUBA & GAZDAR, 2004).

1.2.2.3 Colelitíase

A colelitíase é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de vesícula biliar, estando presente em 70 a 90% dos casos (RUSTAGI & DASANU, 2012; HSING *et al.*, 2007). A relação entre cálculos na vesícula e o desenvolvimento do carcinoma no órgão foi demonstrada, pela primeira vez, em 1931 (GRAHAM, 1931), e desde então os estudos têm considerado a presença desses cálculos em suas análises. Shrikhande e colaboradores (2010) fizeram um levantamento de estudos que tratavam dessa relação e mostraram que, além da simples presença dos cálculos, os trabalhos também apontavam outros indícios que influenciariam nesse desenvolvimento. Características como tamanho, volume, número de cálculos, tempo em que estão no órgão, presença de infecção e o tipo de cálculo também seriam relevantes (SHRIKHANDE *et al.*, 2010). Apesar de grande parte dos pacientes diagnosticados com carcinoma de vesícula apresentar colelitíase, apenas uma pequena parte dos indivíduos que possuem cálculos na vesícula desenvolve tumores no órgão (0,5 a 3%) (RUSTAGI & DASANU, 2012).

Obesidade, estrogênio endógeno e exógeno e gravidez também são considerados fatores de risco para a carcinogênese vesicular, uma vez que aumentam o risco de colelitíase, mas são considerados menos significativos (GOURGIOTIS *et al.*, 2008).

1.2.2.4 Lesões precursoras

Lesões precursoras de tumores de vesícula, como adenomas e displasias, são relativamente incomuns e menos estudadas que as de outros tumores gastrointestinais, e,

por isso, características clínicas, morfológicas e critérios diagnósticos dessas lesões ainda são pouco definidas (ADSAY, 2007).

Adenomas e displasia são duas lesões patológicas distintas da mucosa epitelial encontradas em associação com carcinomas (HEZEL *et al.*, 2010). Os adenomas são lesões polipoides benignas que exibem neoplasia intraepitelial e são divididas em três tipos: tubular, papilar e túbulo-papilar (FLOOD *et al.*, 2010). Porém, a transformação de adenoma para adenocarcinoma de vesícula apresenta uma baixa incidência (0.14-1.1%), e, frequentemente, não são encontradas evidências de tecido adenomatoso em amostras de carcinoma; além disso, também são encontradas lesões adenomatosas que não progridem para o carcinoma (ADSAY, 2007; GOLDIN & ROA, 2009). A transformação de displasia para adenocarcinoma é mais comum e pelo menos dois importantes tipos de lesões precursoras displásicas já foram descritas para o câncer de vesícula biliar: a displasia biliar plana (neoplasia intraepitelial) e a displasia papilar, sendo a última muito menos comum que a primeira (FLOOD *et al.*, 2010).

O carcinoma de vesícula apresenta uma progressão de displasia ao carcinoma *in situ* e posteriormente para o carcinoma invasivo com duração de cerca de 15 anos (GOURGIOTIS *et al.*, 2008). Porém ainda não é descrita uma sequência genética bem definida para a carcinogênese vesicular (ADSAY, 2007).

1.2.2.5 Infecção bacteriana

Nath e colaboradores (2010) delinearam duas principais vias pelas quais bactérias estariam envolvidas na carcinogênese. A primeira seriam inflamações crônicas causadas por infecção bacteriana persistente; e a outra seriam toxinas e metabólitos

bacterianos, que, suficientemente carcinogênicos, resultariam em malignidade (NATH *et al.*, 2010). A combinação dos efeitos da irritação mecânica crônica, causada pelos cálculos, e alteração inflamatória crônica associada com a colonização pode ser suficientemente carcinogênica para levar ao câncer de vesícula biliar. Isso pode explicar por que os índices de câncer de vesícula não correspondem exatamente às taxas de colelitíase; isso significa que um fator carcinogênico adicional, além dos cálculos, como a infecção bacteriana, por exemplo, deve ser necessário (VENNIYOOR, 2008).

1.2.2.6 *Junção ductal pancreatobiliar anômala (JDPB)*

A junção ductal pancreatobiliar anômala (JDPB) é uma rara má formação congênita do trato biliar mais prevalente em populações asiáticas, principalmente japoneses (WISTUBA & GAZDAR, 2004; MARSH *et al.*, 2012). Os pacientes que possuem tal má formação apresentam os ductos biliares e pancreáticos se unindo fora da parede do duodeno, fazendo com que o esfíncter de Oddi não consiga impedir o refluxo de suco pancreático para os ductos biliares. Esse vazamento de suco pancreático pode levar a dano do epitélio biliar e inflamação, aumentando o risco de transformação maligna nas vias biliares e vesícula biliar (RUSTAGI & DASANU, 2012; KAMISAWA *et al.*, 2013). Cânceres associados à JDPB ocorrem em uma faixa etária menor e com menor incidência associada com colelitíase (WISTUBA & GAZDAR, 2004). Essa condição pode ser observada em aproximadamente 17% dos pacientes com câncer de vesícula (GOURGIOTIS *et al.*, 2008).

1.2.3 Aspectos genéticos

O desenvolvimento de malignidades, em geral, é resultado do acúmulo progressivo de mutações, principalmente em oncogenes e genes supressores de tumor, além de alterações como instabilidade de microssatélites e metilação de regiões promotoras de genes (DUTTA, 2012). Os tumores de vesícula e do trato biliar ainda são pouco estudados no que tange aos fatores genéticos devido à sua baixa incidência e por serem tumores muitas vezes irressecáveis ao momento do diagnóstico (TREVOR *et al.*, 2010). As mutações mais comuns identificadas em amostras de adenocarcinoma de vesícula, de acordo com o banco de dados do COSMIC (Catálogo de mutações somáticas em câncer), estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 Alterações genéticas envolvidas com adenocarcinoma de vesícula biliar

Gene	Número de amostras analisadas	Número de amostras mutadas	Porcentagem de amostras mutadas (%)
<i>TP53</i>	264	119	45
<i>CDKN2A</i>	114	34	30
<i>SMAD4</i>	4	1	25
<i>KRAS</i>	468	99	21
<i>PTEN</i>	14	2	14
<i>CTNNB1</i>	92	10	11
<i>PIK3CA</i>	64	5	8
<i>BRAF</i>	101	7	7
<i>NRAS</i>	80	3	4
<i>EGFR</i>	88	1	1

Fonte: COSMIC (disponível em: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=biliary_tract&ss=gallbladder&hn=carcinoma&sh=adenocarcinoma&in=t&src=tissue)

Apesar de já ter sido identificada em tumores do trato biliar uma gama de mutações em oncogenes e supressores de tumor já estabelecidos, a real frequência dessas mutações e a relação entre elas têm sido difíceis de definir (DESHPANDE *et al.*, 2011).

1.2.3.1 TP53

O supressor tumoral *TP53*, localizado no cromossomo 17p13.1, possui onze éxons, sendo que o primeiro não é transcrito, e codifica proteína nuclear de mesmo nome. O gene *TP53* é um dos supressores tumorais mais mutados nos cânceres humanos e sua proteína desempenha importante papel na manutenção da 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, em geral, baixos e controlados por diversas proteínas. 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 de 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 sofre degradação (MEEK, 2009).

Em condições de estresse, como dano no DNA e aumento da proliferação celular, *TP53* torna-se ativo e os níveis de sua proteína são aumentados no núcleo com a finalidade de impedir a progressão do ciclo celular, 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 (MEEK, 2009; RAJAGOPALAN *et al.*, 2010).

Mutações no gene *TP53* são frequentemente encontradas em amostras de câncer de vesícula (31-70%), especialmente mutações pontuais na região codificada pelos éxons 5 a 8 (WISTUBA & GAZDAR, 2004).

1.2.3.2 CDKN2A

O gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*) está localizado no cromossomo 9p21, possui três éxons e codifica dois supressores de tumor, p14^{ARF} e p16^{INK4 α} , por meio de splicing alternativo no éxon 2 do gene (figura 1) (UEKI *et al.*, 2004). Ambos atuam como reguladores negativos na progressão do ciclo celular (PÉREZ-SAYÁNS *et al.*, 2011). A perturbação do ciclo celular é um evento universal em tumores humanos e as alterações mais comuns desse tipo envolvem a via RB-CDK-INK4A (WISTUBA & GAZDAR, 2004). Durante o ciclo celular, as quinases dependentes de ciclina (CDKs 4/6) são ativadas quando ligadas a ciclinas e o complexo CiclinaD-CDK4/6 fosforila a proteína do retinoblastoma (Rb), que libera fatores de transcrição que irão permitir o avanço do ciclo celular (PEURALA *et al.*, 2013). A proteína p16^{INK4 α} inibe a formação do complexo ciclinaD-CDK4/6, impedindo a fosforilação de Rb e, conseqüentemente, evitando o avanço da fase G1 para S do ciclo celular (PÉREZ-SAYÁNS *et al.*, 2011). Portanto, ausência de p16^{INK4 α} funcional leva a progressão sem controle do ciclo celular.

Alguns estudos indicam que o *CDKN2A* pode ter um importante papel no desenvolvimento do câncer de vesícula associado à presença de cálculos na vesícula (WISTUBA & GAZDAR, 2004). Apesar dos achados variarem bastante, o gene encontra-se inativado em quase metade dos casos de câncer de vesícula por uma combinação de mutação e hipermetilação, e essa condição parece estar associada a um pior prognóstico (UEKI *et al.*, 2004; WISTUBA & GAZDAR, 2004; GOLDIN & ROA, 2009; FLOOD *et al.*, 2010).

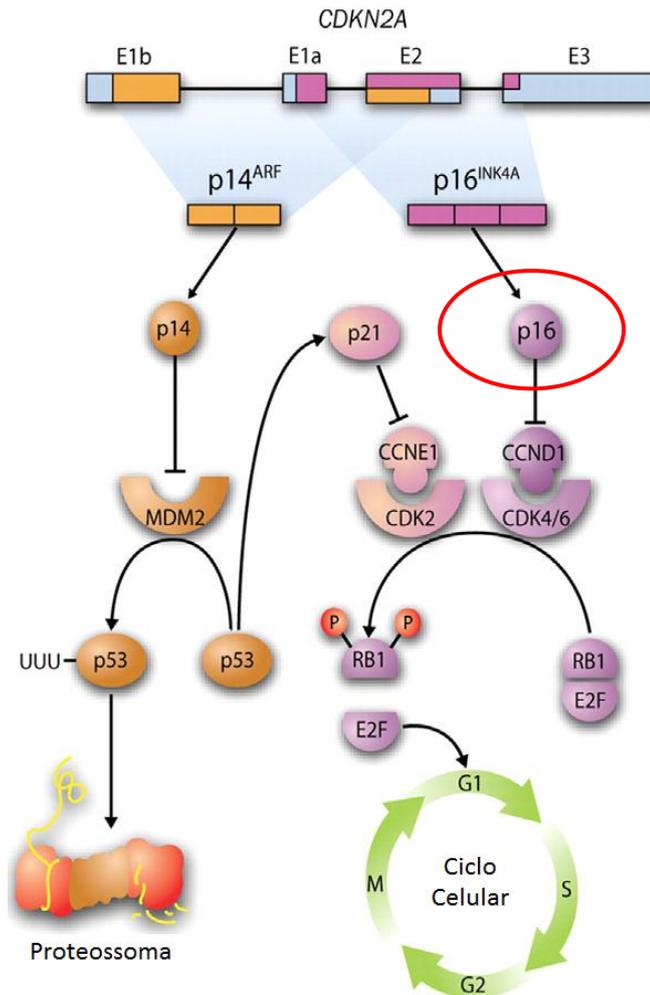


Figura 1 Gene *CDKN2A* e seu papel na regulação do ciclo celular. É possível observar o splicing alternativo que ocorre no éxon 2 do gene que leva à produção das proteínas p14 e p16. Fonte: (Adaptado de Pérez-Sayáns *et al.*, 2011).

1.2.3.3 *KRAS*

O gene *KRAS* é composto por seis éxons, está localizado no braço curto do cromossomo 12 e codifica proteína de mesmo nome. A superfamília das proteínas RAS desempenha importante papel no ciclo celular. Existem três proteínas dessa família: HRAS, KRAS e NRAS, sendo que KRAS está expressa em quase todos os tipos celulares (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 (COTRAN *et al.*, 1999; ALBERTS *et al.*, 2002).

Como outras proteínas GTP, RAS alterna entre a forma ativada, que transmite sinais, e um estado inativo e quiescente (DOWNWARD, 2003; ROBBINS, 2010). A forma inativa da proteína RAS está ligada à guanosina-difosfato (GDP) e a forma ativa está ligada à guanosina-trifosfato (GTP). As células, quando estimuladas por fatores de crescimento ou por outras interações com receptores, tornam-se ativas (DOWNWARD, 2003).

Nas células normais, o estágio ativado de transmissão de sinais da proteína RAS é transitório, visto que a atividade de GTPase (GAPs - *GTPase activating proteins*) hidrolisa o GTP a GDP, com consequente retorno a seu estado basal quiescente (ALBERTS *et al.*, 2002; DOWNWARD, 2003; ROBBINS, 2010). GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), por outro lado, catalisam a dissociação de GDP e RAS, o substituindo por GTP, para ativação da proteína (ROBBINS, 2010).

RAS ativado promove a fosforilação em cascata de resíduos de serina e treonina em proteínas sinalizadoras que alteram o padrão de expressão gênica. 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-kinase, também ativa a via PI-3-Kinase (*phosphatidylinositol 3 kinase*), outra via de sinalização importante que promove crescimento celular (ALBERTS *et al.*, 2002; DOWNWARD, 2003) (Figura 2).

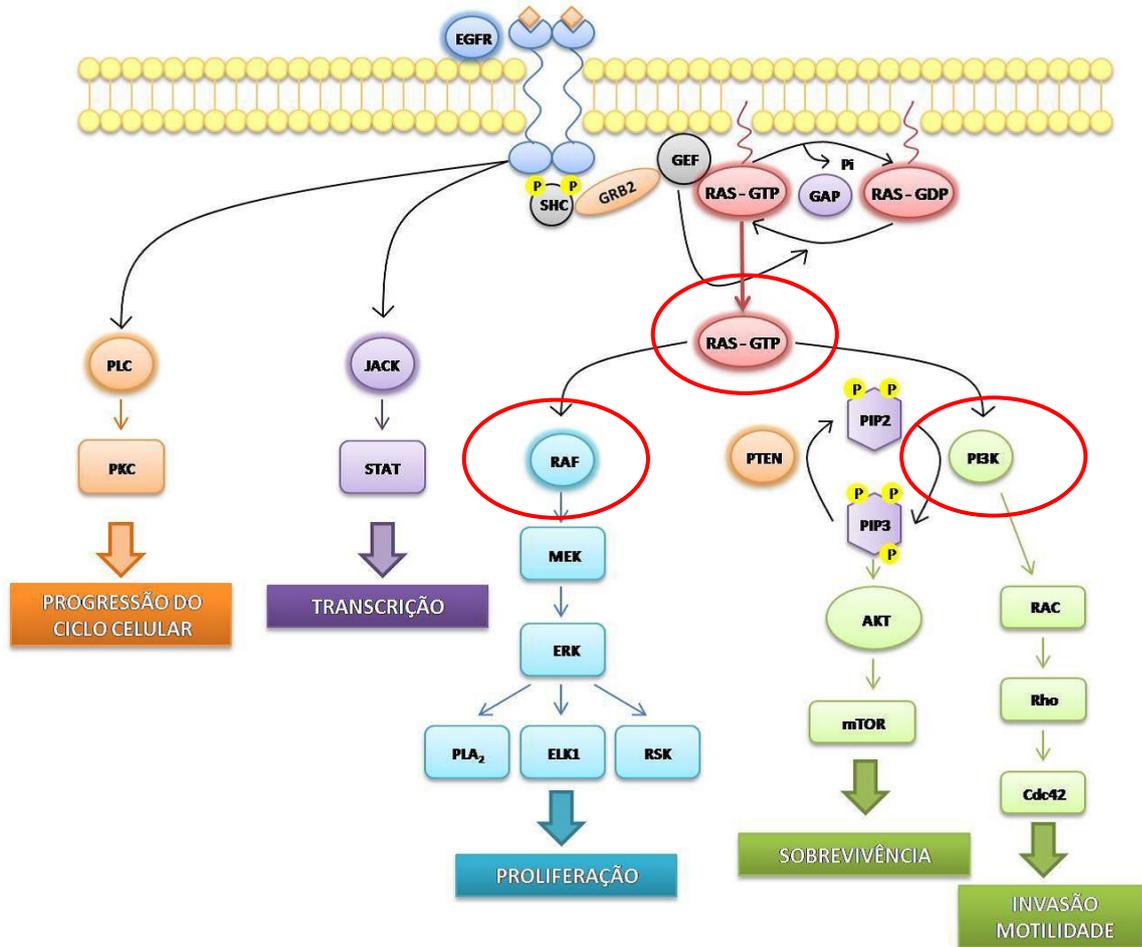


Figura 2 Via de sinalização celular. Vias de sinalização celular em que estão envolvidos os genes *KRAS*, *PIK3CA* e *BRAF*, e que levam a proliferação, sobrevivência, invasão e motilidade.

Mutações pontuais ativadoras em *KRAS* afetam principalmente os códons 12, 13 e 61, e resultam em contínua e inadequada sinalização de crescimento celular, um dos marcadores do câncer (WISTUBA & GAZDAR, 2004). A incidência de mutações encontradas nesse gene no carcinoma de vesícula varia muito nos estudos (PAI *et al.*, 2011). Países ocidentais apresentam baixa incidência de mutações no gene (0 a 10%), enquanto no Japão, onde é comum a associação do câncer com a JPBA, a frequência de mutação em *KRAS* é bem maior (50 a 80%), indicando que o refluxo de suco pancreático é um importante evento para ocorrência de tais mutações (WISTUBA & GAZDAR, 2004; MARSH *et al.*, 2012).

1.2.3.4 BRAF

A proteína BRAF pertence à família de quinases de serina-treonina RAF, tendo sido descritas três isoformas funcionais nas células de mamíferos: ARAF, BRAF e CRAF. Entre essas, o BRAF, cujo gene codificante está localizado no cromossoma 7q34, é o mais potente ativador da via de MAPK (TROVISCO *et al.*, 2006; CANTWELL-DORRIS *et al.*, 2011).

BRAF exerce a função de regular a via MAPK/ERK que é conservada em todos os eucariotos (ROBINSON *et al.*, 1997). Como já citado, a via de RAS/RAF/MEK/ERK age como transdutor entre o meio extracelular e o núcleo. Sinais extracelulares como hormônios, citocinas e vários outros fatores de crescimento interagem com seu receptor e ativam a família RAS. RAS ativo induz alterações conformacionais em RAF que permitem seu recrutamento para a membrana celular, promovendo mudanças no estado de fosforilação, e provocando sua atividade quinase (GARNETT & MARAIS, 2004) (Figura 2). BRAF envia sinais através de MEK para ativar ERK, que, por sua vez, ativa fatores de transcrição a jusante para induzir uma série de processos bioquímicos, incluindo diferenciação, proliferação, crescimento celular e apoptose. Tem sido demonstrado que a hiperativação de BRAF pode dar início a tumorigênese (DAVIES *et al.*, 2002).

Dezenas de mutações já foram descritas no gene *BRAF* em cânceres humanos; porém, 90% das alterações encontradas correspondem à mutação somática no éxon 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).

A frequência de mutações em *BRAF* em amostras de câncer de vesícula ainda é pouco estudada. Goldenberg e colaboradores (2004) e Pai e colaboradores (2011) não encontraram a alteração V600E em um grupo de 37 e 29 pacientes, respectivamente. Esses estudos avaliaram a presença da alteração em pacientes americanos e chilenos. Já Saetta e colaboradores (2004) encontraram mutação em *BRAF* em 7 de 21 (33%) amostras de câncer de vesícula na população grega.

1.2.3.5 *PIK3CA*

Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é uma quinase lipídica componente da via PTEN/PI3K/AKT que regula vários processos celulares ligados à tumorigênese, como proliferação celular, sobrevivência, adesão, motilidade e angiogênese (figura 2) (CULLY, 2006). PI3K é composto por uma subunidade regulatória (p85) e uma subunidade catalítica (p110). O gene *PIK3CA*, localizado no cromossomo 3q26, codifica a subunidade catalítica p110 α de PI3K (RIENER *et al.*, 2008). A grande maioria das mutações encontradas nesse gene (mais de 80%) se localiza em *hotspots* nos éxons 9 e 20, regiões que codificam os domínios helicoidal e quinase de p110 α , e levam à ativação à jusante da via AKT (crescimento e sobrevivência celular) (SAMUELS *et al.*, 2005). Amplificações, deleções e mutações de troca de sentido já foram descritas em câncer de cólon, mama, ovário, cérebro, estômago, pulmão e fígado (RIENER *et al.*, 2008). Poucos estudos na literatura avaliaram mutações em *PIK3CA* em amostras de câncer de vesícula. Deshpande e colaboradores (2011) encontraram mutações em *PIK3CA* em quatro de 32 (12,5%) pacientes com câncer de vesícula e Riener e colaboradores (2008) encontraram apenas um de 23 (4%) amostras analisadas com mutação no gene.

A tumorigênese vesicular é um processo complexo e ainda pouco elucidado. A grande variação geográfica e étnica indica uma importante participação genética e ambiental no desenvolvimento da doença. Os estudos publicados na literatura ainda possuem dados conflitantes e, no Brasil, existem poucos estudos clínicos e nenhum estudo avaliando o perfil genético dos pacientes. Estudos moleculares são importantes para expandir o conhecimento sobre a carcinogênese vesicular e auxiliar no desenvolvimento de ferramentas genéticas para análise de predisposição e prognóstico dos pacientes, e também ajudar no diagnóstico precoce e tratamento desses tumores. Neste trabalho foram avaliadas alterações nos oncogenes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, e nos supressores de tumor *TP53* e *CDKN2A* em pacientes com diagnóstico de câncer de vesícula biliar.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é analisar o perfil de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor em carcinomas vesiculares com ancestralidade genética definida.

Dessa maneira, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Avaliar a presença e frequência de mutações em *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *CDKN2A* e *TP53* em pacientes com câncer de vesícula biliar.
- Analisar a correlação genótipo-fenótipo.
- Determinar o componente de ancestralidade genômica dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Pacientes com diagnóstico de câncer de vesícula biliar, elegíveis para cirurgia ou que retiraram material para biópsia foram selecionados no Hospital das Clínicas de Minas Gerais, com a colaboração da Profa. Dra. Vivian Resende (Grupo de fígado, vias biliares, pâncreas e baço do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC). Foram coletadas doze amostras teciduais de câncer de vesícula biliar. 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).

Noventa e oito indivíduos idosos e sem histórico de neoplasia, de Belo Horizonte, foram selecionados aleatoriamente e utilizados como controle para o sequenciamento do éxon três do gene *KRAS*. Oitenta e oito amostras do mesmo grupo também foram usadas como controles para o sequenciamento do éxon quatro do gene *P53*.

Um grupo de cinquenta indivíduos saudáveis, residentes da região sudeste do Brasil, foi utilizado como controle para a análise de ancestralidade genômica dos pacientes.

3.2 Coleta das amostras

As amostras de tecido tumoral dos pacientes foram coletadas no momento da cirurgia, e posteriormente divididas em dois fragmentos. Um fragmento foi colocado em tubo de 1.5 mL contendo a solução *RNAlater*[®], e armazenado a 80 °C negativos; o outro

fragmento foi fixado em formol 10% e encaminhado para o Departamento de Anatomia Patológica para confirmação do diagnóstico.

3.3 Coleta dos dados clínicos

Foi realizada a análise dos prontuários, na qual foram coletados dados como sexo, idade, histórico de tabagismo e etilismo, presença de cálculos, história familiar, tipo histológico e estadiamento dos tumores.

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos controles foi isolado das amostras de sangue total utilizando-se o método de Lahiri e Nurnberger (1991), com algumas modificações. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50 mL, ao qual a solução TKM1 (TrisHCl 10 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 4 mM) foi adicionada. Em seguida, 500 µL de Triton X-100 foram acrescentados à solução, com a finalidade de promover a hemólise. Após agitação vigorosa da mistura contida no tubo de 50 mL, esta foi centrifugada a 1.255 x g por 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante, repleto de restos de hemácias, foi removido; e o precipitado, contendo leucócitos, foi lavado com a solução TKM1. Neste passo, foi realizada uma centrifugação a 475 x g por 10 minutos, a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo leucócitos, mantido no tubo. Nesta etapa, 1600 µL de TKM2 (TrisHCl 10 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 4

mM; NaCl 400 mM) foram adicionados ao precipitado, juntamente com 100 µL SDS 10% – tendo sido este utilizado para promover a lise de leucócitos. Em seguida, o tubo foi mantido a 55 °C, em banho-maria, por 20 minutos. Após o período de incubação, 900 µL de NaCl (6 M) foram adicionados, com a função de promover a precipitação de proteínas. Foi realizada uma última centrifugação de 15 minutos, a 21.800 x g, a 4 °C. Desta vez, o sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para um novo tubo, com 5 mL de álcool a 100%. Neste momento, houve a visualização do DNA, e este foi lavado em álcool 70%, secado e transferido para tubo contendo o tampão de eluição TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 7.0-8.0). As amostras permaneceram armazenadas a 4 °C negativos durante todo o período da pesquisa.

A extração de DNA dos pacientes foi realizada a partir de amostras de tecido e seguiu o protocolo de proteinase K (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Brevemente, a amostra foi macerada e posicionada em um tubo de 1.5 mL juntamente a 200 µL de tampão de lise (Tris HCl 50 mM, pH 8; EDTA 10 mM; pH 8; SDS 0.5%; q.s.p 200 mL H₂O) e proteinase K (20 mg/mL). Em seguida, o tubo foi mantido em banho-maria, a 65 °C, por 1 hora. Após esse período, 200 µL de tampão de lise foram adicionados à mistura. A amostra foi mantida em temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, centrifugada por 20 minutos, a 11.000 x g. O sobrenadante resultante foi coletado, e a ele foram adicionados dois volumes de etanol 100%, e 10% do volume de sobrenadante 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 4 °C.

3.4.2. Amplificação e sequenciamento das amostras

Um conjunto de iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação dos diferentes éxons de *BRAF*, *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* e *PIK3CA* foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), e estão listados na Tabela 3, com as respectivas temperaturas de anelamento (T_m). Todos foram conferidos manualmente, por meio da análise da sequência disponível no banco de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria. Para as reações em cadeia da polimerase (PCR), foram realizadas diluições de 50 ng/ μ L das amostras extraídas.

A reação padrão de PCR utilizada seguiu os parâmetros do protocolo da *AmpliTaq Gold® PCR Master Mix*, fornecidos pelo fabricante (Applied Biosystems). 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 52 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, e depois foram armazenadas a 4 °C.

Tabela 3 Características da amplificação por PCR dos genes selecionados

GENE	ÉXON	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Tm °C	Tamanho do fragmento (pb)
<i>BRAF</i>	15	TCATAATGCTTGCTGTGATAGGA	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA	55	179
<i>KRAS</i>	2	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA	GAATGGTCCTGCACCAGTAA	55	170
	2 (MVAI)	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAC <u>CT</u>	TCAAAGAATGGTCCTGG <u>ACC</u>	52	157
	3	CCAGACTGTGTTTCTCCCTTC	TGCATGGCATTAGCAAAGAC	55	245
<i>TP53</i>	4	TGCTCTTTTCACCCATCTAC	ATACGGCCAGGCATTGAAGT	60	343
	5 6	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	TTAACCCTCCTCCCAGAGA	56	467
	7	CTTGCCACAGGTCTCCCAA	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	60	237
	8 9	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	AGTGTTAGACTGGAACTTT	58	445
<i>CDKN2A</i>	1	CGGAGGAAGAAAGAGGAG	AAACTTCGTCCTCCAGAGTC	56	319
	2	GGAAATTGGAACTGGAAGC	GCTGAACTTTCTGTGCTGGAAAATG	58	539
<i>PIK3CA</i>	9.1	AGGGATACCACCACAAACCT	CACAAAAGGAAAATGCAAAT	52	4317
	9.2	CTGTGAATCCAGAGGGGAAA	ACATGCTGAGATCAGCCAAA	52	269
	20	TGACATTTGAGCAAAGACCTG	TTCCTATGCAATCGGTCTTTG	52	434

*Tm: Temperatura de anelamento

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

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o *BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit*, seguindo-se as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA), e analisadas utilizando-se o programa *Sequencher v.5.0*.

3.4.3 Análise de mutação do códon 12 de *KRAS* por PCR – RFLP

Para a confirmação dos resultados da frequência da mutação no códon 12 de *KRAS*, 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 ditiotretitol, 100 mM KCl), de acordo com as especificações do fabricante (Amersham), em um período de incubação de sete horas, a 37 °C. Um controle negativo foi empregado em cada ensaio. O *primer mismatch* cria o sítio de restrição para a enzima; entretanto, as amostras com

qualquer mutação no códon 12 de *KRAS* deixam de ser clivadas, permitindo a visualização de fragmentos de tamanhos diferentes para alelos mutados e não mutados em 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 Análises de Ancestralidade

Todas as amostras foram submetidas à análise de ancestralidade genômica. Cada amostra foi genotipada de modo independente, através de 40 indels bialélicos, já descritos anteriormente (BASTOS-RODRIGUES *et al.*, 2006). Os amplicons foram analisados em *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Applied Biosystems), usando-se o *software* GeneMapper Version 4.0 (Applied Biosystems). Para estimar a proporção de ancestralidades europeia, africana e ameríndia de cada indivíduo, foi utilizado o programa Structure, versão 2.3, disponível em <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

3.5 Análise de predição de dano à proteína

O *software* PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) prediz o possível impacto da substituição de aminoácidos na estrutura das proteínas. Esse programa foi utilizado para avaliar o possível efeito das mutações encontradas na conformação proteica. O *software* gera um escore de 0 a 1, no qual o “zero” significa uma troca que não levaria a nenhum dano estrutural à proteína, e o “um” indica que a alteração acarreta importante dano à estrutura proteica.

O software PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) é capaz de prever se variações na sequência de aminoácidos afetam a função proteica. O software indica se a alteração é deletéria ou neutra, sendo que valores de escore iguais ou menores que -2.5 indicam variação deletéria.

3.6 Análises estatísticas

As análises dos componentes ancestrais de pacientes e controles foram realizadas por meio do teste MANN-WITHNEY no *software* GraphPad Prism 6 Demo disponível em <http://www.graphpad.com>.

4 RESULTADOS

4.1 Amostragem e dados clínicos

Entre agosto de 2011 e fevereiro de 2013 foram coletadas, no Hospital das Clínicas de Minas Gerais, 12 amostras de tecido tumoral de carcinoma de vesícula biliar para análise molecular no presente estudo. As características clínicas dos pacientes foram coletadas por meio da análise dos prontuários (tabela 4).

Todas as amostras analisadas em nosso estudo foram de adenocarcinoma de vesícula biliar provenientes de nove mulheres (75%) e três homens (25%), sendo que um dos pacientes – um homem – não teve os dados clínicos analisados devido à falta de acesso ao prontuário deste. As únicas informações obtidas desse paciente foram o tipo histológico (adenocarcinoma) e o estadiamento (IV-B). Os onze pacientes com prontuários analisados possuíam idade entre 48 e 75 anos, com idade média de 65 anos. Nove pacientes (82%) não eram fumantes; um (9%) afirmou ser ex-fumante; e um (9%) afirmou ser fumante há 43 anos. Apenas um paciente (9%) declarou ser ex-etilista, e os outros dez (91%) negaram etilismo. Nove dos onze pacientes (82%) apresentavam colelitíase, e apenas dois não possuíam tal condição (18%). Quatro pacientes (37%) apresentavam história familiar positiva para câncer; dois (18%) não apresentavam; e cinco (45%) não possuíam tal informação no prontuário. A maioria dos pacientes (75%) foi diagnosticada já em estágio avançado da doença (estádio III e IV), e apenas 3 (25%) se encontravam em estadiamento inicial (estádio I e II) no momento do diagnóstico.

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes com câncer de vesícula biliar

Variantes		N	%
Idade	Média	65	
	Variação	48-75	
Sexo	Masculino	3	25
	Feminino	9	75
Tipo Histológico	Adenocarcinoma	12	100
Tabagista	Sim	1	9
	Não	9	82
	Ex	1	9
Etilista	Sim	-	-
	Não	10	91
	Ex	1	9
Colelitíase	Sim	9	82
	Não	2	18
História familiar positiva de câncer	Sim	4	37
	Não	2	18
	Não Informado	5	45
Estágio do tumor (AJCC)	I	1	8
	II	2	17
	III	2	17
	IV	7	58

4.2 Análise de sequenciamento

Todas as amostras foram sequenciadas nas regiões de interesse dos genes *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *KRAS* e *BRAF*.

4.2.1 *TP53*

As amostras foram avaliadas na região que compreende do éxon quatro ao nove do gene *TP53*, através dos pares de iniciadores (tabela 3). Nenhuma alteração foi encontrada nos éxons 5, 6 e 7. Em todos os 12 pacientes foi encontrada a rs1042522, no éxon 4; desses,

foram nove em homozigose e três em heterozigose. Oitenta e oito amostras de idosos sem histórico de neoplasia foram sequenciadas para essa região para avaliar se este polimorfismo tem relação com o desenvolvimento do tumor. Os resultados mostraram que 86,3% das amostras também apresentavam o polimorfismo, sendo trinta e cinco (39,8%) homozigotas mutadas e quarenta e uma (46,5%) heterozigotas. Apenas doze amostras (13,7%) não apresentaram a rs1042522.

Também no éxon 4, em uma amostra, encontramos uma deleção de 29pb (345_373del) em heterozigose (Figura 3). Também encontramos outra deleção, de 191pb, em homozigose, em um paciente. Essa deleção leva a perda do final do éxon 8 e de todo o éxon 9 do gene TP53 (Figura 4).

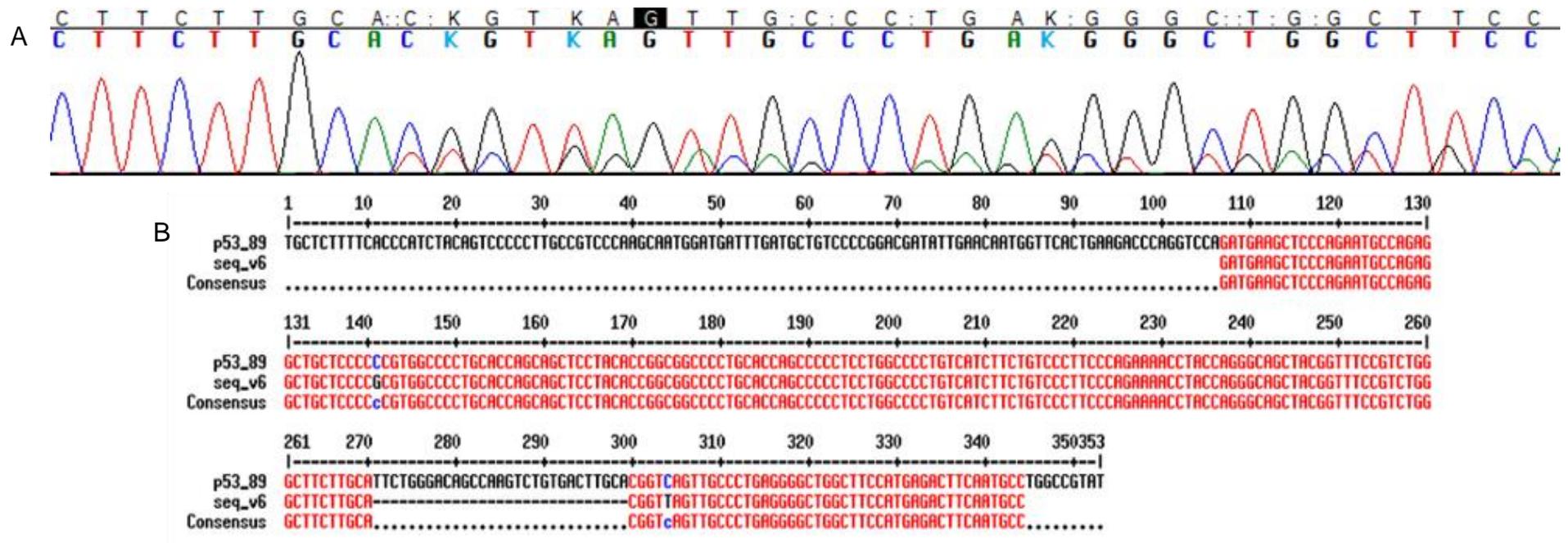


Figura 3. Representação da deleção 345_373del no éxon 4 de *TP53* A) O eletroferograma mostra a sobreposição das fitas selvagem e deletada no paciente que apresenta a alteração 345_373del no éxon 4 do gene *TP53*. B) Alinhamento da sequência referência com a sequência obtida do paciente. Pode-se observar a rs1042522 e a deleção dos 29pb.

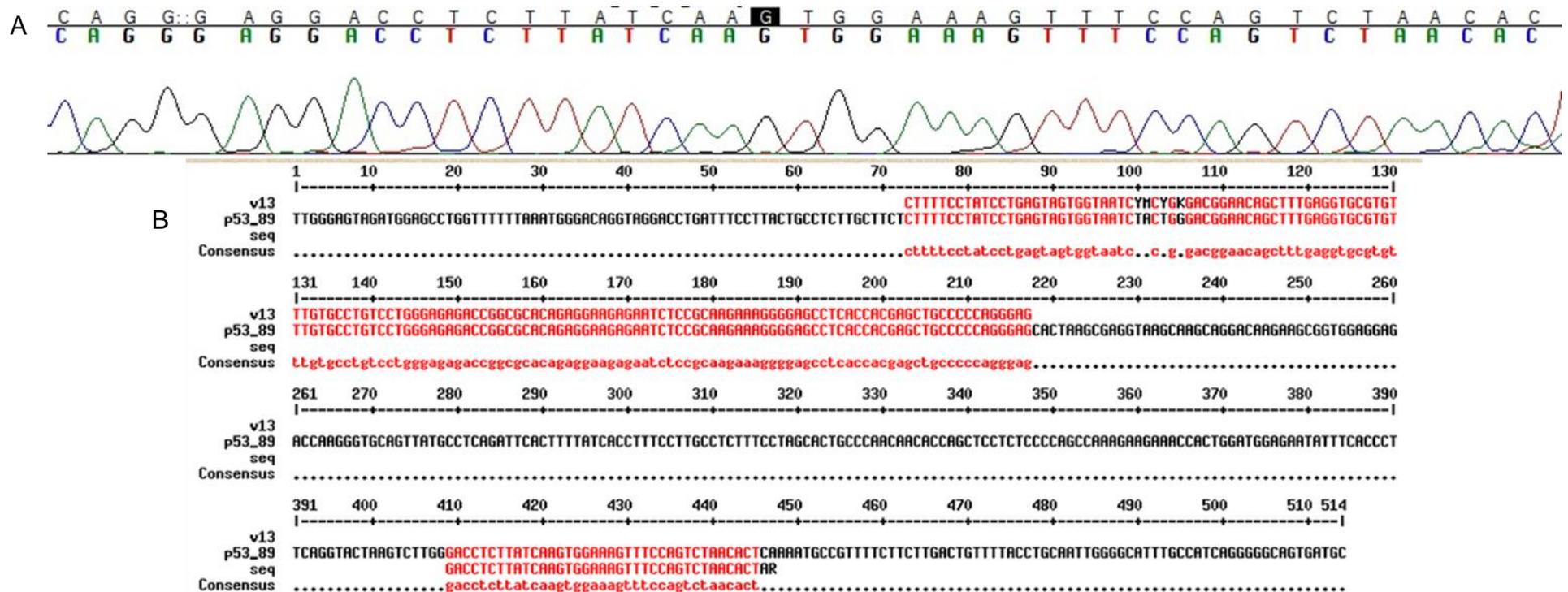


Figura 4. Representação da deleção 1042_1233del no éxon 8 de *TP53* A) O eletroferograma mostra uma região do sequenciamento do paciente que apresenta a alteração 1042_1233del no éxon 8 do gene *TP53*. B) Alinhamento da sequência referência com a sequência obtida do paciente. Pode-se observar os 191pb deletados.

4.2.2 *CDKN2A*

Foram analisados os éxons um e dois do gene *CDKN2A*. A primeira alteração, encontrada no éxon um, em apenas um paciente (c.45G>A), gera um códon de parada na posição 15 da proteína, onde antes era codificado o aminoácido triptofano (p.Trp15X ou W15X) (figura 5).

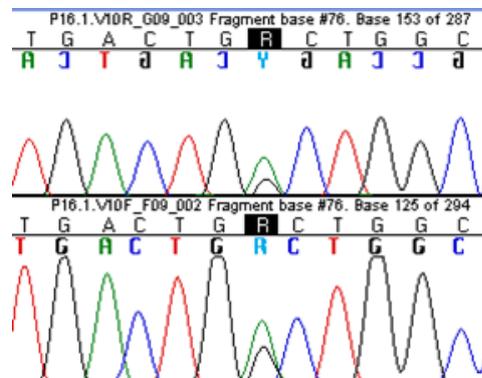


Figura 5. Eletroferograma mostrando a alteração W15X encontrada em heterozigose no éxon um do gene *CDKN2A*.

Já no éxon dois, foram encontradas duas variantes. A primeira (c.379G>T) leva à troca de uma alanina por uma serina na posição 127 da proteína (p.Ala127Ser ou A127S). Foi identificada em dois pacientes; um, em homozigose, e o outro, em heterozigose (figura 6).

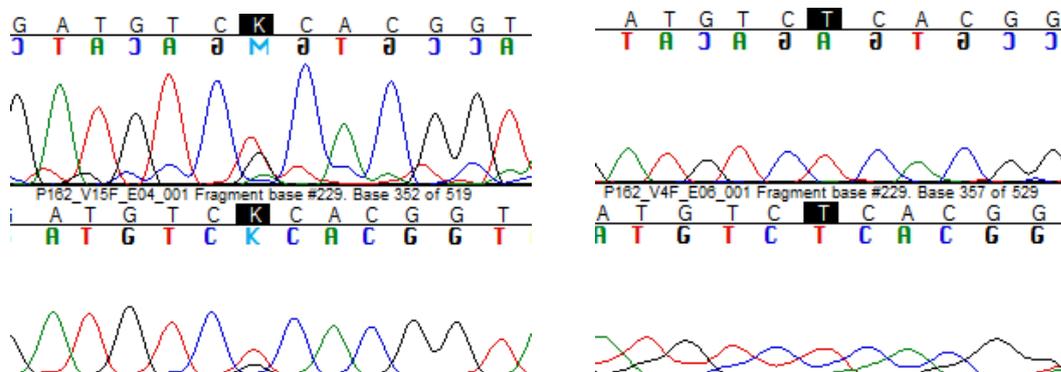


Figura 6. Eletroferograma mostrando a alteração A127S encontrada em heterozigose (esquerda) e em homozigose (direita) no éxon dois de *CDKN2A*.

A segunda (c.442G>A) leva à troca de uma alanina por uma treonina na posição 148 da proteína (p.Ala148Thr ou A148T). Também foi encontrada em dois pacientes, sempre em heterozigose (figura 7).

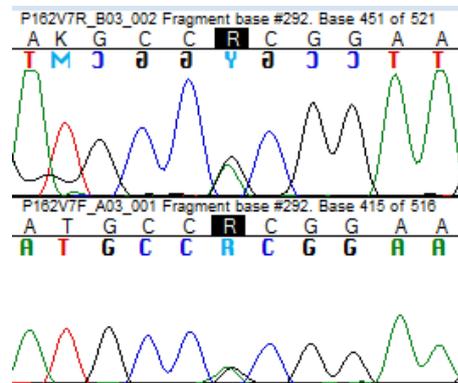


Figura 7. Eletroferograma mostrando a alteração A148T em heterozigose no éxon dois do gene *CDKN2A*.

Os resultados dos testes no *software PolyPhen-2* para as alterações encontradas no gene *CDKN2A* estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5. Avaliação do dano proteico causado pelas mutações encontradas em *CDKN2A*

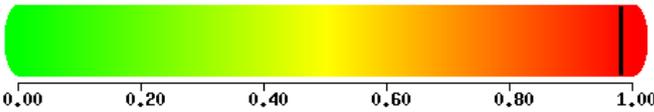
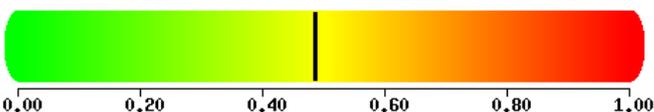
Códon	Alteração	% de mutados	Diagrama	Escore
127	A127S	16,70		0.982
148	A148T	16,70		0.487

Tabela 5 Resultados do software polyphen de predição do dano à estrutura proteica acarretado pelas mutações encontradas no gene *CDKN2A*. Os diagramas mostram que a mutação A127S leva a um importante dano à estrutura da proteína enquanto a mutação A148T apresenta um escore inferior.

4.2.3 *PIK3CA*

Os éxons 9 e 20 do gene *PIK3CA* foram analisados e nenhuma alteração foi encontrada.

4.2.4 *KRAS*

Foram sequenciados os éxons dois e três do gene *KRAS*, e encontradas quatro variantes. Esses dois éxons compreendem as regiões onde se encontram os três códons mais frequentemente alterados e, conseqüentemente, os mais estudados em *KRAS*: 12, 13 e 61. No códon 12 de *KRAS*, foram encontradas duas alterações: p.Gly12Val (G12V) e p.Gly12Arg (G12R). A primeira, encontrada em dois pacientes em heterozigose, altera o códon 12 de GGT para GTT. E a segunda, encontrada em um paciente também em heterozigose, altera o códon de GGT para CGT. Os eletroferogramas estão representados nas figuras 8 e 9.

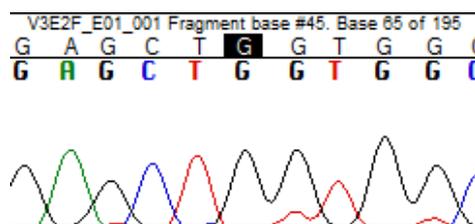


Figura 8. Eletroferograma mostrando a alteração G12V em heterozigose no éxon dois do gene *KRAS*.

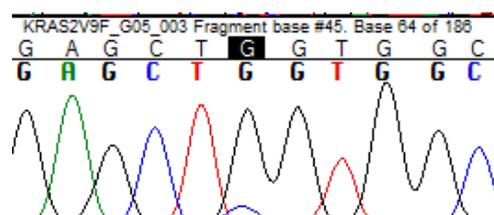


Figura 9. Eletroferograma mostrando a alteração G12R em heterozigose no éxon dois do gene *KRAS*.

A técnica de enzima de restrição foi utilizada para confirmação dos resultados do códon 12 de *KRAS*. Através de gel de acrilamida 6,5% (figura 10) é possível observar as amostras que possuem dois fragmentos (heterozigotas), e as amostras que possuem apenas um fragmento (homozigotas selvagens).

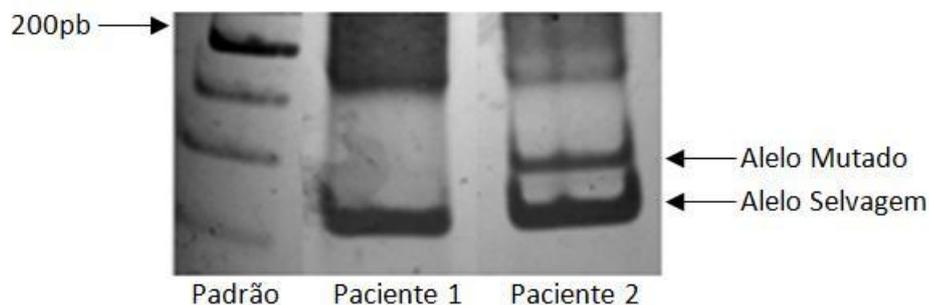


Figura 10. Gel de acrilamida para confirmação da presença de mutações no éxon 12 de *KRAS* através da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima MVAI.

No códon 13 de *KRAS* foi encontrada a variação p.Gly13Asp (G13D), na qual há a troca de glicina por um ácido aspártico (figura 11). Essa alteração foi encontrada em apenas um paciente em heterozigose. A avaliação de predição de dano à proteína feita pelo *PolyPhen-2* gerou um score de 0.803, indicando que a alteração é possivelmente danosa à estrutura proteica.

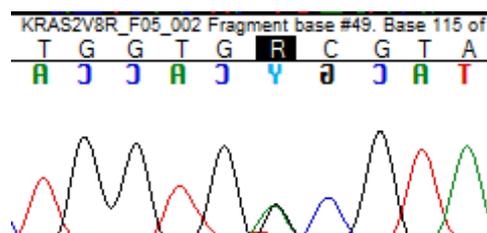


Figura 11. Eletroferograma mostrando a alteração G13D em heterozigose no éxon dois do gene *KRAS*.

No éxon três de *KRAS* foi identificada uma alteração não descrita em um paciente. Essa variante – uma troca de uma timina por uma citosina –, leva à mudança do aminoácido isoleucina por treonina no códon 55 (p.Ile55Thr ou I55T) da proteína (figura 12). Foi realizado o teste com o software *PolyPhen-2*, que gerou um valor de predição de dano de 1.0, indicando que a mutação possivelmente causa grande impacto à estrutura proteica (tabela 6). A análise com o software PROVEAN gerou um escore de -4.557, indicando que a alteração é deletéria (figura 13).

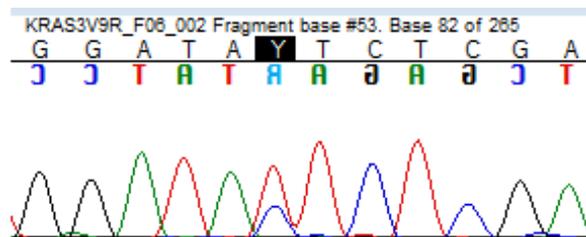


Figura 12. Eletroferograma mostrando a alteração I55T em heterozigose no éxon três do gene *KRAS*.

PROVEAN Prediction - Job ID: 256363546933889

- Query sequence (fasta)
- Supporting sequence set used for prediction
Number of sequences: 366 (fasta, E-values)
Number of clusters: 30
- Score thresholds for prediction
(1) Default threshold is -2.5, that is:
-Variants with a score equal to or below -2.5 are considered "deleterious,"
-Variants with a score above -2.5 are considered "neutral."
(2) How to use a more stringent threshold.

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
I55T	-4.557	Deleterious

Figura 13. Resultado do software PROVEAN para a alteração I55T. A análise indicou que a alteração I55T é deletéria.

Foram feitas análises em 88 amostras controles (idosos sem histórico de câncer), para avaliar a frequência dessa alteração na população. Nenhum dos controles apresentou a

variação. Também avaliamos, pelo NCBI, a conservação do aminoácido isoleucina entre outras espécies, e observamos que esta é uma região conservada da proteína (Figura 14).

↓

Homo sapiens: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Mus musculus: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Rattus norvegicus: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Pan troglodytes: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Canis lupus familiaris: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Bos taurus: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG
 Xenopus tropicalis: ALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG

Figura 14. Sequências de aminoácidos na região mutada de *KRAS* entre várias espécies. A avaliação dessa região em diferentes espécies mostrou ser uma região conservada da proteína.

Todas as variações encontradas e os resultados do *software PolyPhen-2* para as alterações encontradas no gene *KRAS* estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 Avaliação do dano proteico causado pelas mutações encontradas em *KRAS*

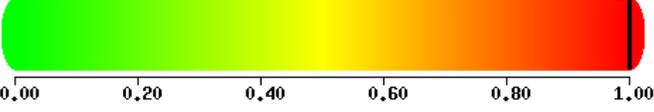
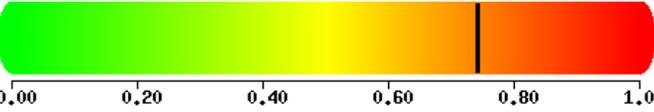
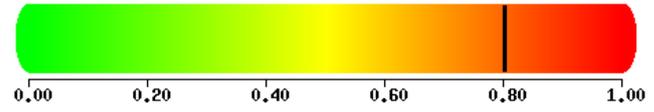
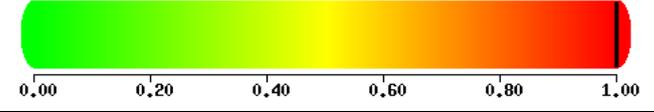
Códon	Alteração	% de mutados	Diagrama	Escore
12	G12V	8,30		0,999
	G12R	8,30		0,741
13	G13D	8,30		0,803
55	I55T	8,30		1,000

Tabela 6 Resultados do software polyphen de predição do dano à estrutura proteica acarretado pelas mutações encontradas no gene *KRAS*. Os diagramas mostram que as quatro mutações encontradas em *KRAS* geram importante dano a proteína.

4.2.5 BRAF

O éxon 15 do gene *BRAF* foi sequenciado, e a alteração V600E não foi encontrada em nenhum paciente.

Os resultados das frequências das alterações (exceto polimorfismos) encontradas em cada gene foram resumidos na tabela 7, em que “N” representa o número de pacientes com alteração:

Tabela 7. Frequência de alterações encontradas em cada gene

Gene	N	Frequência
TP53	2	16,70%
CDKN2A	5	41,70%
<i>PIK3CA</i>	0	0%
KRAS	3	25%
BRAF	0	0%

4.3 Análise de ancestralidade genômica

As diferenças nas proporções de ancestralidade genômica ameríndia entre os dois grupos – caso e controle – não foram significativas. Porém, quando analisados os componentes ancestrais europeus e africanos, a diferença foi significativa (Europeu $p=0,0077$ e Africano $p=0,0127$). Portanto, nossos pacientes com câncer de vesícula biliar

apresentam proporção de componente ancestral europeu significativamente menor e, inversamente, proporção de componente ancestral africano significativamente maior que grupo controle (gráfico 1).

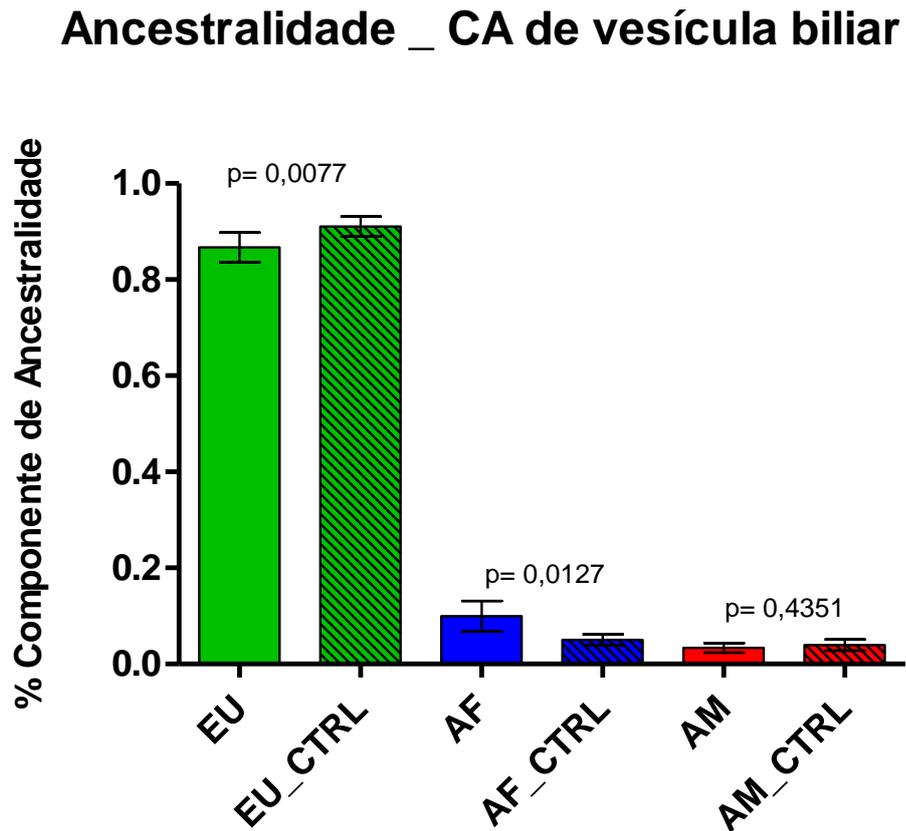


Gráfico 1. Análise da ancestralidade genômica dos pacientes com câncer de vesícula biliar. EU: Europeus; AF: Africanos; AM: Ameríndios, CTRL: controles. Os componentes europeu e africano apresentaram diferença significativa em relação aos controles ($p=0,0077$ e $0,0127$ respectivamente).

5 DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes com câncer de vesícula biliar é diagnosticada em estágio localmente avançado e/ou com metástases à distância, impossibilitando se submeterem à cirurgia de ressecção, que ainda é considerada a única modalidade de tratamento curativo (WISTUBA & GAZDAR, 2004). Dessa forma, é necessária a identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos capazes de diagnosticar a doença em estágio inicial, além de novos alvos terapêuticos, com a finalidade de aprimorar o diagnóstico e o tratamento desses pacientes.

A literatura mostra que o câncer de vesícula biliar acomete principalmente mulheres, podendo apresentar uma frequência até seis vezes maior nesse grupo (RUSTAGI & DASANU, 2012). Em nossas amostras observamos uma frequência três vezes maior em indivíduos do sexo feminino em relação ao masculino (9:3). A colelitíase é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor e pode estar presente em 70 a 90% dos indivíduos com câncer de vesícula (RUSTAGI & DASANU, 2012). Encontramos frequência similar em nosso estudo, sendo que 82% dos nossos pacientes apresentavam cálculos vesiculares. Devido aos sinais e sintomas inespecíficos, a maioria dos indivíduos é diagnosticada já em estágio avançado (MARSH *et al.*, 2012), o que também foi observado em nossos casos, em que 75% das amostras se apresentavam em estágio III ou IV.

Já foi demonstrada uma relação da etnia asiática e de índios nativos norte americanos e mexicanos com maiores incidências de câncer de vesícula biliar, entretanto esses componentes ancestrais são pouco significativos na população brasileira. Nossa população é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de miscigenação, principalmente proveniente de três etnias: ameríndios, europeus e africanos

(PENA *et al.*, 2009). A análise de ancestralidade genômica de nossos pacientes mostrou que eles apresentam um componente ancestral europeu significativamente menor que os controles e o componente ancestral africano significativamente aumentado em relação aos controles. Não existem estudos avaliando a ancestralidade de pacientes com câncer de vesícula biliar, sendo assim nossos resultados podem indicar uma possível relação do componente ancestral africano com o câncer de vesícula na população. Entretanto novos estudos com uma amostra maior da população devem ser realizados.

As informações existentes sobre alterações genéticas e moleculares no câncer de vesícula biliar continuam limitadas. Assim como em outras neoplasias, o adenocarcinoma de vesícula é o resultado do acúmulo de múltiplas alterações genéticas, com a participação de oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA, além da instabilidade de microssatélites e importantes alterações epigenéticas, principalmente metilação de regiões promotoras de genes (GOLDIN & ROA, 2009). Porém, apesar dos avanços nos estudos, ainda não foi possível estabelecer com clareza a sequência de eventos responsável pela carcinogênese na vesícula biliar. Visando aumentar o conhecimento a respeito da influência genética na tumorigênese vesicular, nosso estudo avaliou a presença de mutações em oncogenes (*KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*) e supressores tumorais (*TP53* e *CDKN2A*) em pacientes brasileiros com adenocarcinoma de vesícula biliar.

A proteína p53 desempenha importante papel na manutenção da integridade do genoma e a perda de função de p53 permite a inadequada sobrevivência de células geneticamente danificadas, levando à evolução de células cancerígenas (WISTUBA & GAZDAR, 2004). Mutações em *TP53* são as alteração genéticas mais comuns em cânceres humanos, portanto, muitos trabalhos avaliam anormalidades nesse gene, sendo que em tumores de vesícula biliar, a maioria dos estudos avalia sua expressão (SAETTA, 2006). A

proteína p53 mutante é mais estável, apresentando meia vida de horas enquanto a proteína p53 selvagem possui meia vida de apenas 20 minutos, o que leva ao seu acúmulo no núcleo de células neoplásicas (NIGAM *et al.*, 2010), sendo assim, é possível relacionar a super expressão da proteína com a presença de mutações no gene. Moreno e colaboradores (2005) analisaram a inativação de TP53 em amostras de câncer de vesícula invasivo, epitélio com colecistite crônica, mas sem presença de câncer, e epitélio normal, sem colecistite e sem cálculos. Com seus resultados, concluíram que a inativação de *TP53* através de mutações ou perda de heterozigossidade é um evento importante e precoce na tumorigênese vesicular (MORENO *et al.*, 2005). Em nosso estudo, encontramos duas deleções no gene *TP53*. Os pacientes que apresentaram tais alterações possuíam estadiamento tumoral I e II, o que condiz com o achado de Moreno e colaboradores (2005). Esses pacientes também apresentavam um segundo tumor em outras localizações (ducto intrahepático segmentar e melanoma em seio maxilar). A frequência de mutações encontrada em *TP53* em amostras de câncer de vesícula varia de 27 a 70% na literatura (GOLDIN & ROA, 2009), porém em nosso estudo encontramos uma frequência inferior (16,7%). Essa diferença pode ser devido ao pequeno número amostral ou por diferenças metodológicas (análise de fragmentos por enzima de restrição, nested PCR, sequenciamento).

O polimorfismo rs1042522, que leva à troca de uma arginina por uma prolina na posição 72 de *TP53*, foi encontrado em 100% de nossas amostras, sendo nove (75%) em homozigose e três (25%) em heterozigose. Este polimorfismo é comumente encontrado na população europeia (72%) (ENSEMBL, 2013) e já foi associado com o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer (SAGNE *et al.*, 2013). Liu e colaboradores (2011), através de meta análise, avaliaram os trabalhos publicados que relacionam a rs1042522 aos cânceres do trato digestivo e mostraram que a alteração é significativamente associada com risco

aumentado para câncer gástrico, coloretal, vesícula biliar e pâncreas. Mas chamam atenção de que os resultados para vesícula e pâncreas devem ser interpretados com cautela devido ao limitado número de amostras dos estudos (LIU *et al.*, 2011). O fato de termos encontrado em 100% de nossas amostras poderia contribuir para a associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento de tumor vesicular, porém, ao analisarmos amostras de idosos sem histórico de neoplasias observamos que o polimorfismo rs1042522 também foi encontrado em grande frequência (86,3%), o que mostra que essa associação é pouco provável.

KRAS, comumente mutado em neoplasias gastrointestinais como pâncreas e cólon, é o oncogene mais estudado na carcinogênese vesicular (SAETTA, 2006). Mutações pontuais ativadoras em *KRAS* afetam principalmente os códons 12, 13 e 61 (WISTUBA & GAZDAR, 2004) e por isso são as principais regiões investigadas. A frequência de mutações reportada na literatura, em amostras de câncer de vesícula biliar, nesses códons varia de 0 a 100% (HEZEL *et al.*, 2010; MARSH *et al.*, 2012). Em países ocidentais, mutações em *KRAS* não são frequentemente encontradas (0 a 10%), porém no Japão, onde o câncer de vesícula pode, muitas vezes, estar associado à Junção Pancreatobiliar anômala (JPBA), a frequência de mutação encontrada em *KRAS* é acentuadamente maior, podendo chegar a 100% (MARSH *et al.*, 2012; HANADA *et al.*, 1999). Essa discrepância pode ser atribuída a variações étnicas e geográficas entre as populações estudadas e/ou por diferença nas técnicas e sensibilidades dos métodos utilizados, mas também, em alguns casos, devido a séries com número limitado de amostras (SAETTA, 2006). Em nosso estudo encontramos 25% das amostras (3/12) apresentando mutação no gene *KRAS*, sendo que uma delas possuía duas alterações, uma no códon 12 (G12R) e outra, não descrita, no códon 55 (I55T). O fato de termos identificado uma mutação não descrita no gene *KRAS*, fora dos códons *hotspots* 12, 13 e 61, chama atenção para a necessidade de se avaliar não somente esses códons

específicos. A alteração, encontrada em heterozigose apenas nesse paciente e ausente nos 98 controles avaliados, leva à troca do aminoácido isoleucina pelo aminoácido treonina no códon 55, região conservada da proteína. Através de análises com o software Polyphen e PROVEAN observamos que tal alteração causa danos na estrutura e na função proteica. Sendo assim, podemos sugerir que essa alteração tem relação com o desenvolvimento de tumores na vesícula. Novos estudos, avaliando grupos maiores de pacientes, e também avaliando os danos funcionais à proteína, são importantes para caracterizar o papel de I55T na carcinogênese vesicular.

Pouco se sabe do papel da mutação V600E, no gene *BRAF*, no desenvolvimento do câncer de vesícula, já que a literatura ainda é limitada e controversa. Três estudos avaliaram a presença desta mutação no gene *BRAF* em amostras de câncer de vesícula (GOLDENBERG *et al.*, 2004; SAETTA *et al.*, 2004; PAI *et al.*, 2011). A alteração V600E foi encontrada em 33% das amostras analisadas em pacientes gregos, entretanto ela não foi identificada nos outros dois estudos, em amostras de pacientes americanos e chilenos. Em nosso estudo também não encontramos tal variante em nenhuma das 12 amostras, o que pode contribuir para hipótese de que existe uma potencial influência geográfica na presença desta alteração em pacientes com câncer de vesícula. Estudos futuros em grandes amostragens de diversas populações são importantes para determinar a influência de V600E no câncer de vesícula.

Alterações, principalmente nos exons 9 e 20, no gene *PIK3CA* já foram identificadas em tumores gástricos, de mama, ovário, cólon, entre outros (RIENER *et al.*, 2008; DESHPANDE *et al.*, 2011), mas ainda são pouco estudadas em tumores de vesícula. Em 2008, Riener e colaboradores, da Universidade de Zurique, identificaram pela primeira vez uma alteração nesse gene em tumores do trato biliar. Nesta série, nas amostras de câncer

de vesícula, foi encontrada apenas uma alteração em um paciente (4%). Mais recentemente, um grupo americano identificou outra alteração em quatro de 33 amostras (12,5%) de câncer de vesícula (DESHPANDE *et al.*, 2011). Em nosso estudo não encontramos nenhuma alteração nos exons 9 e 20 do gene *PIK3CA*, porém, para descartarmos a participação de tais alterações em nossa população, é necessário que esse estudo seja replicado em uma amostragem maior.

A perda de função de *CDKN2A* está presente em aproximadamente 50% dos casos de câncer de vesícula. Nossos resultados mostraram três alterações nesse gene. O polimorfismo A148T é encontrado em 3% na população europeia (ENSEMBL, 2013) e, recentemente, um estudo brasileiro demonstrou que ele está relacionado ao aumento da susceptibilidade ao melanoma e também uma relação com pacientes que apresentam história familiar positiva para outros tipos de câncer (BAKOS *et al.*, 2011). Nosso estudo encontrou essa alteração em dois pacientes (16,7%), porém não se tem informações sobre o papel de A148T no câncer de vesícula e para avaliar essa relação um estudo com uma população maior deve ser realizado. A segunda variação, A127S, encontrada em dois pacientes (16,7%) e ainda não descrita em amostras de câncer de vesícula, já foi reportada em outros tipos de tumores, como de esôfago, melanoma e pulmão (SOUFIR *et al.*, 2002) e também já foi reportada como uma mutação germinativa presente em pacientes que desenvolvem diferentes tipos de tumores, inclusive melanoma (PUIG *et al.*, 2005). A predição de dano realizada pelo *Polyphen* indica que tal alteração seria muito prejudicial para a estrutura proteica, o que também pode indicar um importante dano à função proteica. Porém, apesar de já ter sido encontrada em diferentes tipos de tumores, a literatura disponível em relação a essa alteração é controversa e ainda não se chegou a uma conclusão a respeito do papel de A127S no desenvolvimento de tumores humanos. A última

alteração encontrada em *CDKN2A*, W15X, também já foi descrita em melanomas cutâneos (HOLLAND *et al.*, 1999; PASTORINO *et al.*, 2008), mas não em tumores de vesícula biliar. A alteração leva a um códon de parada no lugar do aminoácido 15, gerando uma proteína truncada e provavelmente inativa (HOLLAND *et al.*, 1999). Em nosso estudo identificamos W15X em apenas um paciente (8,4%) em heterozigose, não podendo chegar a nenhuma conclusão a respeito do efeito de tal mutação no desenvolvimento do câncer de vesícula. Estudos avaliando a expressão, deleção e metilação do gene *CDKN2A* são os mais comuns em amostras de câncer de vesícula biliar, porém poucos estudos até o momento buscaram identificar mutações pontuais nesse gene em tais tumores, o que demonstra a importância de novos estudos desse tipo para o entendimento da participação desse gene na carcinogênese vesicular.

O conhecimento sobre fatores de risco, oncogenes e genes supressores de tumor que contribuem para o desenvolvimento de tumores de vesícula e outros tumores do trato biliar vem aumentando nos últimos anos. Porém os mecanismos moleculares da carcinogênese ainda não estão completamente elucidados (RIENER *et al.*, 2008). Nosso estudo é o primeiro a analisar alterações moleculares em *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *KRAS* e *BRAF* em amostras de adenocarcinoma de vesícula biliar no Brasil. Devido à divergência de resultados no mundo e a indicação de que existe uma importante heterogeneidade genética, ligada à etnia, nos tumores de vesícula é de extrema importância a realização de mais estudos com grandes amostragens de pacientes brasileiros na tentativa de caracterizar o perfil genético de nossos pacientes e assim poder identificar possíveis marcadores precoces ou prognósticos específicos de nossa população.

6 CONCLUSÃO

Os pacientes avaliados nesse trabalho possuem características clínicas semelhantes ao perfil dos pacientes descritos na literatura. Adicionalmente, o presente trabalho demonstra uma possível relação do componente de ancestralidade genômica africano com a ocorrência da doença.

Ao avaliar o perfil de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais em pacientes com câncer de vesícula biliar brasileiros, esse é o primeiro estudo a registrar alterações nos genes *KRAS*, *TP53* e *CDKN2A* em tais pacientes.

O gene *CDKN2A* possui alta frequência de mutação na amostragem, o que indica sua importante participação na carcinogênese vesicular. Além disso, mesmo em menor frequência, mutações em *KRAS* e *TP53* também indicam sua participação no desenvolvimento da doença.

A descoberta da mutação I55T encontrada em *KRAS*, e ainda não descrita na literatura, chama atenção para a importância desse gene para a tumorigênese vesicular e para a necessidade de análise completa de sua sequência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsay NV. 2007. **Neoplastic precursors of the gallbladder and extrahepatic biliary system.** Gastroenterol Clin North Am. Dec;36(4):889-900, vii.
- Alberts B., *et al.* 2002. **Molecular Biology of the Cell.** 4th ed. Garland Science, NY, USA.
- 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.
- Boutros C, Gary M, Baldwin K, Somasundar P. 2012. **Gallbladder cancer: past, present and an uncertain future.** Surg Oncol. Dec;21(4):e183-91. doi: 10.1016/j.suronc.2012.08.002. Epub 2012 Sep 29.
- Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. 2011. **BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy.** Review. Mol Cancer Ther. 10(3):385-94.
- Cotran R.S., Kumar V., Collins T. 1999. Robbins **Pathologic Basis of disease.** W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. 2006. **Beyond PTEN mutations: The PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis.** Nat Rev Cancer 6:184–192.
- 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.
- Deshpande V, Nduaguba A, Zimmerman SM, Kehoe SM, Macconail LE, Lauwers GY, Ferrone C, Bardeesy N, Zhu AX, Hezel AF. 2011. **Mutational profiling reveals PIK3CA mutations in gallbladder carcinoma.** *BMC Cancer*. Feb 8;11:60. doi: 10.1186/1471-2407-11-60.
- Downward J. 2003. **Targeting Ras Signalling Pathways In Cancer Therapy.** *Nat Rev Cancer*. 3(1): 11-22.
- Duffy A, Capanu M, Abou-Alfa GK, Huitzil D, Jarnagin W, Fong Y, D'Angelica M, Dematteo RP, Blumgart LH, O'Reilly EM. 2008. **Gallbladder cancer (GBC): 10-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC).** *J Surg Oncol*. Dec 1;98(7):485-9. doi: 10.1002/jso.21141.
- Dutta U. 2012. **Gallbladder cancer: can newer insights improve the outcome?** *J Gastroenterol Hepatol*. Apr;27(4):642-53. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07048.x.
- Flood TA, Jain, DE, Marginean C. 2010. **Malignant tumours of gallbladder and extrahepatic bile ducts.** *Diagnostic Histopathology*. Volume 16, Issue 8, August, Pages 360–370
- Garnett M. & Marais R. 2004. **Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.** *Cancer Cell*.6(4):313-9.
- Goldenberg D, Rosenbaum E, Argani P, Wistuba II, Sidransky D, Thuluvath PJ, Hidalgo M, Califano J, Maitra A. 2004. **The V599E BRAF mutation is uncommon in biliary tract cancers.** *Mod Pathol*. Nov;17(11):1386-91.

- Goldin RD, Roa JC. 2009. **Gallbladder cancer: a morphological and molecular update.** *Histopathology*. Aug;55(2):218-29. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03192.x. Epub 2009 Mar 12.
- Gourgiotis S, Kocher HM, Solaini L, Yarollahi A, Tsiambas E, Salemis NS. 2008. **Gallbladder cancer.** *Am J Surg*. Aug;196(2):252-64. doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.11.011. Epub 2008 May 7.
- Graham EA. 1931 **The Prevention of Carcinoma of the Gall-bladder.** *Ann Surg*. January; 93(1): 317–322.PMCID: PMC1398750
- Hanada K, Tsuchida A, Iwao T, Eguchi N, Sasaki T, Morinaka K, Matsubara K, Kawasaki Y, Yamamoto S, Kajiyama G. 1999. **Gene mutations of K-ras in gallbladder mucosae and gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct.** *Am J Gastroenterol*. Jun;94(6):1638-42.
- Hezel AF, Deshpande V, Zhu AX. 2010. **Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies.** *J Clin Oncol*. Jul 20;28(21):3531-40. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4787. Epub 2010 Jun 14.
- Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. 1999. **CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas.** *Genes Chromosomes Cancer*. Aug;25(4):339-48.
- Hsing AW, Gao YT, Han TQ, Rashid A, Sakoda LC, Wang BS, Shen MC, Zhang BH, Niwa S, Chen J, Fraumeni JF Jr. 2007. **Gallstones and the risk of biliary tract cancer: a population-based study in China.** *Br J Cancer*. Dec 3;97(11):1577-82. Epub 2007 Nov 13.
- Jayaraman S, Jarnagin WR. 2010. **Management of gallbladder cancer.** *Gastroenterol Clin North Am*. Jun;39(2):331-42, x. doi: 10.1016/j.gtc.2010.02.006.

- Kamisawa T, Ando H, Shimada M, Hamada Y, Itoi T, Takayashiki T, Miyazaki M. 2013. **Recent advances and problems in the management of pancreaticobiliary maljunction: feedback from the guidelines committee.** J Hepatobiliary Pancreat Sci. Jun 20. doi: 10.1002/jhbp.8. [Epub ahead of print]
- Konstantinidis IT, Deshpande V, Genevay M, Berger D, Fernandez-del Castillo C, Tanabe KK, Zheng H, Lauwers GY, Ferrone CR. 2009. **Trends in presentation and survival for gallbladder cancer during a period of more than 4 decades: a single-institution experience.** Arch Surg. May;144(5):441-7; discussion 447. doi: 10.1001/archsurg.2009.46.
- Lahiri D.K. & Nurnberger J.I.Jr. 1991 **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acids Res 11: 5444.
- Liu L, Wang K, Zhu ZM, Shao JH. 2011. **Associations between P53 Arg72Pro and development of digestive tract cancers: a meta-analysis.** Arch Med Res. Jan;42(1):60-9. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.01.008.
- Marino D, Leone F, Cavalloni G, Cagnazzo C, Aglietta M. 2013. **Biliary tract carcinomas: from chemotherapy to targeted therapy.** Crit Rev Oncol Hematol. Feb;85(2):136-48. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.06.006. Epub 2012 Jul 17.
- Marsh Rde W, Alonzo M, Bajaj S, Baker M, Elton E, Farrell TA, Gore RM, Hall C, Nowak J, Roy H, Shaikh A, Talamonti MS. 2012. **Comprehensive review of the diagnosis and treatment of biliary tract cancer 2012. Part I: diagnosis-clinical staging and pathology.** J Surg Oncol. Sep 1;106(3):332-8. doi: 10.1002/jso.23028. Epub 2012 Apr 4.
- McNamara MG, Metran-Nascente C, Knox JJ. 2013. **State-of-the-art in the management of locally advanced and metastatic gallbladder cancer.** Curr Opin Oncol. Jul;25(4):425-31. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283620fd8.

- Meek DW. 2009. **Tumor suppression by p53: a role for the DNA damage response?** Nature. 9:714-723.
- Miller G, Jarnagin WR. 2008. **Gallbladder carcinoma.** Eur J Surg Oncol. Mar;34(3):306-12. Epub 2007 Oct 26.
- Miller G, Socci ND, Dhall D, D'Angelica M, DeMatteo RP, Allen PJ, Singh B, Fong Y, Blumgart LH, Klimstra DS, Jarnagin WR. 2009. **Genome wide analysis and clinical correlation of chromosomal and transcriptional mutations in cancers of the biliary tract.** J Exp Clin Cancer Res. May 12;28:62. doi: 10.1186/1756-9966-28-62.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Res. 16(3):1215.
- Moreno M, Pimentel F, Gazdar AF, Wistuba II, Miquel JF. 2005. **TP53 abnormalities are frequent and early events in the sequential pathogenesis of gallbladder carcinoma.** Ann Hepatol. Jul-Sep;4(3):192-9.
- Nath G, Gulati AK, Shukla VK. 2010. **Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder.** World J Gastroenterol. Nov 21;16(43):5395-404.
- Nigam P, Misra U, Negi TS, Mittal B, Choudhuri G. 2010. **Alterations of p53 gene in gallbladder cancer patients of North India.** Trop Gastroenterol. Apr-Jun;31(2):96-100.
- Pai RK, Mojtahed K, Pai RK. 2011. **Mutations in the RAS/RAF/MAP kinase pathway commonly occur in gallbladder adenomas but are uncommon in gallbladder adenocarcinomas.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. Mar;19(2):133-40. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181f09179.
- Pastorino L, Bonelli L, Ghiorzo P, Queirolo P, Battistuzzi L, Balleari E, Nasti S, Gargiulo S, Gliori S, Savoia P, Abate Osella S, Bernengo MG, Bianchi Scarrà G. 2008. **CDKN2A mutations**

and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma
Pigment Cell Melanoma Res. Dec;21(6):700-9. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00512.x.
Epub 2008 Oct 22.

Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. 2009. **DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians.** Braz J Med Biol Res. Oct;42(10):870-6. Epub 2009 Sep 11.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. 2011. **p16 (INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough?** Cancer Lett. Jul 28;306(2):134-41. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.039. Epub 2011 Mar 15.

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.

Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, Azon A, González U, Castel T, Campoy A, Herrero J, Martí R, Brunet-Vidal J, Milà M. 2005. **Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas.** J Clin Oncol. May 1;23(13):3043-51.

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.

Randi G, Franceschi S, La Vecchia C. 2006. **Gallbladder cancer worldwide: geographical distribution and risk factors.** Int J Cancer. Apr 1;118(7):1591-602.

Riener MO, Bawohl M, Clavien PA, Jochum W. 2008. **Rare PIK3CA hotspot mutations in carcinomas of the biliary tract.** Genes Chromosomes Cancer. May;47(5):363-7. doi: 10.1002/gcc.20540.

Robbins. 2010. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6a edição. Ed. Guanabara.

- Robinson M.J. & Cobb M.H. 1997. **Mitogen-activated protein kinase pathways.** *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):180-6.
- Rustagi T, Dasanu CA. 2012. **Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates.** *J Gastrointest Cancer.* Jun;43(2):137-47. doi: 10.1007/s12029-011-9284-y.
- Saetta AA, Papanastasiou P, Michalopoulos NV, Gigelou F, Korkolopoulou P, Bei T, Patsouris E. 2004. **Mutational analysis of BRAF in gallbladder carcinomas in association with K-ras and p53 mutations and microsatellite instability.** *Virchows Arch.* Aug;445(2):179-82. Epub 2004 Jun 19.
- Saetta AA. 2006. **K-ras, p53 Mutations, and Microsatellite Instability (MSI) in Gallbladder Cancer.** *Journal of Surgical Oncology;*93:644–649.
- 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.
- Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2005. **Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells.** *Cancer Cell.* Jun;7(6):561-73.
- hrikhande SV, Barreto SG, Singh S, Udwardia TE, Agarwal AK. 2010. **Cholelithiasis in gallbladder cancer: coincidence, cofactor, or cause!** *Eur J Surg Oncol.* Jun;36(6):514-9. doi: 10.1016/j.ejso.2010.05.002. Epub 2010 May 26.
- Soufir N, Ribojad M, Magnaldo T, Thibaudeau O, Delestaing G, Daya-Grosjean L, Rivet J, Sarasin A, Basset-Seguin N. 2002. **Germline and somatic mutations of the INK4a-ARF gene in a xeroderma pigmentosum group C patient.** *J Invest Dermatol.* Dec;119(6):1355-60.

- 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.
- Ueki T, Hsing AW, Gao YT, Wang BS, Shen MC, Cheng J, Deng J, Fraumeni JF Jr, Rashid A. 2004. **Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China.** Clin Cancer Res. Mar 1;10(5):1717-25.
- Venniyoor A. 2008. **Cholesterol gallstones and cancer of gallbladder (CAGB): molecular links.** Med Hypotheses.;70(3):646-53. Epub 2007 Sep 12.
- 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.
- Wistuba II, Gazdar AF. 2004 **Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour** Nat Rev Cancer. Sep;4(9):695-706.
- Zhu AX, Hong TS, Hezel AF, Kooby DA. 2010. **Current management of gallbladder carcinoma.** Oncologist.;15(2):168-81. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0302. Epub 2010 Feb 10.

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), Cristina da Silva Sábato, 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 do trato gastrointestinal.

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 Cristina da Silva Sábato 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA CRISTINA DA SILVA SABATO

Realizou-se, no dia 01 de novembro de 2013, às 14:00 horas, Sala 029, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E SUPRESSORES TUMORAIS EM PACIENTES COM CÂNCER DE VESÍCULA BILIAR*, apresentada por CRISTINA DA SILVA SABATO, número de registro 2011713522, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco - Orientador (UFMG), Prof(a). Vivian Resende (UFMG), Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho (UFMG), Prof(a). Debora Marques de Miranda (UFMG).

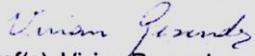
A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

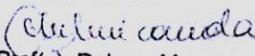
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 01 de novembro de 2013.


 Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco
 Doutor - Universidade de Londres

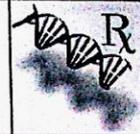

 Prof(a). Vivian Resende
 Doutora - UFMG


 Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho
 Doutora - UFMG


 Prof(a). Debora Marques de Miranda
 Doutora - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



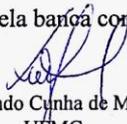
FOLHA DE APROVAÇÃO

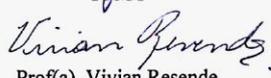
**ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E SUPRESSORES TUMORAIS EM
PACIENTES COM CÂNCER DE VESÍCULA BILIAR**

CRISTINA DA SILVA SABATO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 01 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco - Orientador
UFMG


Prof(a). Vivian Resende
UFMG


Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho
UFMG


Prof(a). Debora Marques de Miranda
UFMG

Belo Horizonte, 1 de novembro de 2013.