

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

ADRIANO RAMINHO LUZ

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO PIN3 NO GENE TP53 EM PACIENTES COM
CÂNCER GÁSTRICO ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO
DE BARROS BARRETO**

Belém

2011

ADRIANO RAMINHO LUZ

Trabalho de Conclusão de Curso
para obtenção do grau em Medicina
pela Universidade Federal do Pará.

Orientador: Paulo Pimentel de
Assumpção.

Co-orientador: Ney Pereira
Carneiro dos Santos.

Belém

2011

ADRIANO RAMINHO LUZ

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO PIN3 NO GENE TP53 EM PACIENTES
COM CÂNCER GÁSTRICO ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
JOÃO DE BARROS BARRETO**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina
pela Universidade Federal do Pará.**

Banca examinadora:

Paulo Pimentel de Assumpção

Geraldo Ishak/UFPA

Rommel Burbano/UFPA

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Conceito: _____

Belém

2011

À Deus, causa primária de todas as coisas, pois sem efeito não há causa.

Aos meus pais, José e Jussara, por todo o apoio e amor incondicional. “Teu TTT já tá pronto??”

À minha irmã Amanda, por me amar do seu jeito.

A todos que poderão se beneficiar futuramente de pesquisas como esta.

Adriano Raminho Luz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu chegasse até aqui.

A todos os familiares, por me acompanharem desde o início desta jornada e acreditarem no meu potencial.

Aos amigos, que são como família, e estão sempre ao meu lado, apoiando e torcendo para que tudo dê certo.

Aos meu co-orientador, Msc. Ney Santos, por ter sido a minha dupla nesse trabalho, auxiliando em cada dúvida, me recebendo no laboratório a qualquer hora, mesmo atarefado.

Ao Prof. Dr. Paulo Assumpção, pela orientação e incentivo.

Ao mestrando Saulo Costa, por ter cedido informações de sua tese.

Aos demais mestrandos do Laboratório de Genética.

À enfermagem do HUIBB, em especial a funcionária Eliana, pela boa vontade em coletar o sangue dos pacientes.

Ao Sr. George Santos Ferreira, agente administrativo do Laboratório de Patologia, que parava o seu serviço para me ajudar a procurar os laudos histopatológicos.

À Patrícia Barros, secretária da Coordenadoria do TCC, pela simpatia e tranquilização em momentos de apuros.

À Profa. Dra. Rita Medeiros, pela amizade e apoio durante todo o curso, inclusive no TCC.

A todos os Professores da Faculdade de Medicina da UFPA, que contribuíram na minha formação, em especial: Profa. Dra. Ana Cláudia Damasceno, pelo esforço em ensinar e pelo vasto conhecimento compartilhado; Profa. Dra. Maria Rita Monteiro, que me ensinou a fazer anamnese e a pensar como médico; Profa. Dra. Simone Conde, pela dedicação; Aos Professores Max Luz e Adenard Cunha, por promoverem o melhor módulo de todo o internato e pelo prazer em ensinar.

E aqueles que são fundamentais para todo esse processo e são a causa de toda a dedicação: os pacientes. Estes que permitiram o nosso aprendizado e serão a razão do nosso dia-a-dia como profissionais. Espero nunca esquecer disso...

Ma vie est mon message

Mahatma Ghandi

...

O câncer não precisa ser o estágio terminal...

RESUMO

O câncer de estômago é a segunda principal causa de morte por câncer em ambos os sexos em todo o mundo e é considerado um problema de saúde pública no Estado do Pará devido à sua alta incidência e mortalidade. Belém apresenta uma das maiores taxas de incidência de câncer gástrico do mundo. Além da infecção pelo *Helicobacter pylori* e fatores relacionados ao estilo de vida, a susceptibilidade genética tem sido associada à variação individual no risco do desenvolvimento deste tipo de câncer. Apesar do avanço nas técnicas cirúrgicas e na terapia adjuvante, as taxas de sobrevida em cinco anos de pacientes cujos tumores são ressecados permanecem extremamente insatisfatórias, pois a doença é, geralmente, assintomática no seu estágio inicial, o que impede o diagnóstico precoce. Os polimorfismos genéticos são associados ao aparecimento de câncer quando combinados com fatores ambientais e têm sido considerados biomarcadores para estudos envolvendo o risco do desenvolvimento da doença, permitindo rastreamento e diagnóstico precoce. O presente trabalho investigou o polimorfismo PIN3 no gene TP53, que consiste em INS/DEL em 16 pb no íntron 3, em pacientes com neoplasia gástrica no Hospital Universitário João de Barros Barreto e em indivíduos controles da população miscigenada de Belém entre 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011. Foram coletadas 99 amostras de sangue de pacientes com câncer gástrico e 225 de indivíduos controles. O DNA foi extraído segundo o método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase para a genotipagem das amostras. Os resultados obtidos indicam associação do câncer gástrico com o sexo masculino (67,7%) e idade (média de $59,3 \pm 1,2$ anos); predominância do subtipo difuso de Laurén e doença em estágio avançado (70,7% apresentaram TNM III/IV). Ficou evidenciada uma associação significativa de susceptibilidade ao câncer gástrico para os genótipos INS/DEL ($p=0,007$, OR=3,990) e INS/INS + INS/DEL ($p=0,007$, OR=3,554), além de antecipação aproximada de 15% no tempo de aparecimento da doença nos portadores do genótipo INS ($p=0,002$, OR= 1,15). O genótipo DEL/DEL apresentou-se relacionado à proteção ao desenvolvimento do tumor gástrico ($p=0,020$, OR=0,343). Esses resultados sugerem que o polimorfismo PIN3 pode estar associado ao desenvolvimento do câncer gástrico, bem como contribuir para a formação de um painel de marcadores para auxílio diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Câncer gástrico; polimorfismo genético; PIN3.

ABSTRACT

Stomach cancer is the second leading cause of cancer death in both sexes worldwide and is considered a public health problem in the Para state, due to its high incidence and mortality. Its capital, Belém, has one of the highest incidence rate of the world. In addition to the *Helicobacter pylori* infection and factors related to lifestyle, genetic susceptibility has been linked to individual variation in risk of developing this type of cancer. Despite advances in surgical techniques and adjuvant therapy, survival rates in five years in patients whose tumors are resected, remains extremely poor because the disease is usually asymptomatic in its early stages, preventing early diagnosis. Genetic polymorphisms are associated with the development of cancer when combined with environmental factors and can be considered biomarkers for studies involving the risk of developing the disease, allowing for screening and early diagnosis. The present study investigated the polymorphism PIN3 in the gene TP53, which consists of a INS/DEL 16 bp in intron 3, with patients with gastric cancer in the University Hospital Joao de Barros Barreto and with a control group from Belem's mixed population between July 1st, 2009 and March 1st, 2011. We collected blood samples from 99 patients with gastric cancer and 225 healthy controls. DNA was extracted by the method described by Sambrook et al. (1989). We used the technique of polymerase chain reaction for genotyping the samples. The results indicate an association of gastric cancer among males (67.7%) and age (mean 59.3 ± 1.2 years), predominance of Lauren's diffuse-type and advanced stage disease (70.7% had TNM III/IV). We found a significant association of susceptibility to gastric cancer for genotypes INS/DEL ($p = 0.007$, OR = 3.990) and INS/INS + INS/DEL ($p = 0.007$, OR = 3.554) as well as average acceleration of approximately 15% in time of onset of disease in patients with INS genotype ($p = 0.002$, OR = 1.15). Genotype DEL/DEL presented related to protecting the development of gastric tumor ($p = 0.020$, OR = 0.343). These results suggest that PIN3 may be associated with the development of gastric cancer, as well as contribute to the formation of a panel of markers for its diagnosis.

Keywords: Gastric cancer; genetic polymorphism; PIN3.

LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Variáveis estudadas sobre os casos de câncer gástrico atendidos no HUIBB no período 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011 e os controles.....Página 38

Tab. 2 - Distribuições alélicas e genotípicas na comparação Controle *versus* Câncer Gástrico de amostras obtidas de pacientes internados no HUIBB no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.....Página 39

Tab. 3 - Análise de regressão logística múltipla corrigida por diferentes fatores de confusão e como variante dependente a idade dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico antes dos 50 anos de idade em amostras obtidas de pacientes internados no HUIBB no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.Página 40

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAS – Basic local alignment search tool.

IARC – International Agency for Research on Cancer.

INCA – Instituto Nacional do Câncer.

HP – *Helicobacter pylori*.

HUJBB – Hospital Universitário João de Barros Barreto.

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. PROBLEMA	14
1.2. OBJETIVOS	14
1.2.1. OBJETIVO GERAL	14
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1.3. JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	16
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO	20
2.3 CÂNCER GÁSTRICO	23
2.3.1. FATORES DE RISCO	24
2.3.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	27
2.3.3. MARCADORES MOLECULARES DE SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER..	29
2.3.4. MARCADORES INDEL RELACIONADOS AO CÂNCER.....	29
2.3.5. INDEL NO GENE TP53 (16 PB ÍNTRON-3)	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
4. ASPECTOS ÉTICOS	37
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES	43
8.REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	54
APÊNDICE A.....	55
APÊNDICE B.....	57
ANEXOS	59
ANEXO A	60
ANEXO B.....	61
ANEXO C.....	63
ANEXO D	64

1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é a segunda causa de morte por neoplasia no mundo (FERLAY *et al.*, 2010).

O câncer de estômago permanece como uma das mais importantes localizações tumorais no Brasil, apresentando a estimativa para o ano de 2010 de 13.820 casos novos entre homens e de 7.680 nas mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (10/100.000) (INCA, 2009).

O Estado do Pará apresenta elevada incidência desta neoplasia e o câncer de estômago foi a principal causa de morte por neoplasia em 1999 e 2000 (BRASIL, 2006a). Entre os anos de 2008 e 2009, Belém registrou a maior taxa de incidência (25,89 por 100.000 habitantes) de câncer gástrico dentre todas as outras capitais brasileiras (BRASIL, 2010).

Os fatores de risco para desenvolver o câncer gástrico são uma combinação de susceptibilidade genética e fatores ambientais, tais como: ingestão prolongada de altas concentrações de nitratos em alimentos desidratados, defumados ou salgados, infecção pelo *Helicobacter pylori* e presença de lesões primárias, como gastrite crônica, gastrite atrófica, displasia e metaplasia intestinal (HUNTSMAN *et al.*, 2001).

Os tumores do câncer de estômago se apresentam, predominantemente, sob a forma de três tipos histológicos: o adenocarcinoma, responsável por 95% dos tumores gástricos, o linfoma, e o leiomiossarcoma (INCA, 2007). Segundo a classificação histopatológica de Laurén (1965), os adenocarcinomas gástricos são agrupados em dois tipos principais: difuso e intestinal. O tipo intestinal de adenocarcinoma gástrico também é chamado de tipo “epidêmico”, depende de fatores ambientais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas. O tipo difuso apresenta prognóstico ruim, geralmente não está associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo (HUNTSMAN *et al.*, 2001).

A prevalência do câncer gástrico sofre influência de fatores genéticos, étnicos e culturais (NEUGUT *et al.*, 1996). Dados estatísticos revelam um declínio da incidência deste tumor, especificamente nos Estados Unidos e na Europa Ocidental. Contudo, altos índices,

com importante taxa de mortalidade ainda são registrados na América Latina e no Japão. (INCA, 2007)

Em geral, o câncer de estômago não tem bom prognóstico, pois as manifestações clínicas mais evidentes, como dor epigástrica e perda ponderal, ocorrem tardiamente, atrasando o diagnóstico. A taxa mundial de mortalidade foi de, aproximadamente, 75% no ano de 2002 e a sobrevida média cumulativa após cinco anos do diagnóstico é estimada em aproximadamente 21% (INCA, 2006). Em Belém, a sobrevida estimada é de cerca de 9-10%, constituindo o câncer gástrico um grave problema de saúde pública. A cirurgia é o único tratamento com potencial curativo (NARDONE, 2003; LAYKE e LOPEZ, 2004; PARKIN *et al.*, 2005; INCA, 2007;).

Além da infecção pelo *Helicobacter pylori* e fatores relacionados ao estilo de vida, susceptibilidade genética tem sido sugerida como contribuição para a variação individual no risco do desenvolvimento de câncer gástrico (GAO *et al.*, 2009).

Embora o determinante genético para uma determinada patologia seja identificado através de uma mutação com herança mendeliana simples, os determinantes para a idade de início da doença e a variabilidade clínica existente entre indivíduos com a mesma mutação ainda são ignorados. Uma explicação possível seria que fatores ambientais, risco ou proteção, uma segunda mutação ou polimorfismo estariam interferindo na evolução da doença (ROCHA *et al.*, 2007).

Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo. Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*). Polimorfismos genéticos, em particular polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*), estão sendo avaliados no seu papel em doenças multifatoriais, como câncer e inflamação (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004).

O genoma humano é constantemente exposto a várias formas de estresse endógeno e exógeno, que podem causar transformação oncogênica da célula. Para manter a integridade genômica, sistemas complexos têm sido envolvidos na proteção celular. O supressor tumoral P53 desempenha um papel fundamental na resposta celular ao estresse oxidativo, através da modulação de genes de transcrição, que comandam defesas contra o crescimento tumoral, os quais incluem interrupção do ciclo celular, manutenção da integridade genética e inibição da angiogênese, além de interagir com várias proteínas celulares que controlam a morte celular programada (apoptose). Perturbações da função do P53 têm sido relacionadas ao início e progressão de malignidades, como o câncer gástrico e são esperadas se ocorrer uma variação da sequência genética (SNPs) do gene TP53 (GAO *et al.*, 2009; WHIBLEY *et al.*, 2009).

A inserção/deleção de 16 pares de bases, no íntron 3, de TP53 tem sido associada à altos índices de apoptose e à alteração da capacidade de reparo do DNA (GAUDET *et al.*, 2008). Segundo Marcel *et al.* (2009), o PIN3 TP53 é um polimorfismo com potencial efeito modificador do gene TP53 e pode estar associado com manifestações neoplásicas.

Polimorfismos genéticos poderiam ser utilizados como biomarcadores do risco de câncer gástrico (GAO *et al.*, 2009).

1.1. PROBLEMA

Há necessidade de desenvolvimento de novos estudos a nível local, que possam, através da identificação de características genéticas peculiares ao tumor gástrico, ampliar o conhecimento sobre o comportamento dessa neoplasia e permitir o estabelecimento de conduta mais precisa.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência do polimorfismo PIN3 no gene TP53 em uma amostra de pacientes com diagnóstico de câncer gástrico do Hospital Universitário João de Barros Barreto.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever dados de sexo e idade e características relacionadas ao tumor de pacientes com câncer gástrico atendidos no HUIBB;
- Determinar a distribuição de frequência do polimorfismo PIN3 no gene TP53 em pacientes portadores de câncer gástrico do HUIBB;
- Determinar a distribuição de frequência do polimorfismo PIN3 no gene TP53 em pacientes controles da população miscigenada de Belém;
- Comparar a distribuição de frequência do polimorfismo PIN3 na amostra de pacientes portadores de câncer gástrico com a distribuição de frequência em indivíduos controles;
- Comparar os resultados com aqueles já obtidos em outros estudos;
- Estimar risco e proteção associados à susceptibilidade ao câncer gástrico em relação ao polimorfismo estudado.

1.3. JUSTIFICATIVA

Resende; Mattos; Koifman (2006) afirmam:

O câncer gástrico vem apresentando uma diminuição da incidência e da mortalidade em vários países, inclusive no Brasil. Entretanto, ainda se constitui em importante problema de saúde pública, especialmente no Estado do Pará, onde as taxas de mortalidade apresentam valores acima da média brasileira.

No Brasil, na maioria das vezes, o câncer gástrico é uma doença diagnosticada em fases muito avançadas, sem qualquer possibilidade de cura e, portanto, de prognóstico sombrio. Manifestações como dor epigástrica e perda ponderal, que podem orientar o diagnóstico, são, geralmente, tardias (LAYKE e LOPEZ, 2004; LEMES *et al.*, 2003).

O prognóstico dos pacientes com câncer gástrico pode ser alterado a partir da

identificação de características genéticas do tumor (CALCAGNO *et al.*, 2008).

Entre as maiores promessas da medicina, está a descoberta da origem genética de várias doenças comuns, que permitirá uma prática médica individualizada, na qual as estratégias de prevenção e tratamento serão personalizadas com base em testes prévios. O diagnóstico molecular será o futuro do diagnóstico do câncer gástrico. Resultados de estudos genéticos têm o potencial de promover a compreensão do impacto de fatores de risco genéticos na etiologia da doença, especialmente quando explorada a associação com fatores ambientais. Entretanto, se comparado a outras neoplasias, como o câncer de mama, próstata e cólon, os mecanismos moleculares envolvidos na transformação e progressão do tumor gástrico são escassos (YASUI *et al.*, 2001; RICCIARDI e BOCCIA, 2007).

Santos *et al.* (2010) revelam a escassez de investigações sobre os polimorfismos genéticos em populações amazônicas, que possuem uma variabilidade genética diferente de outras populações. Tal quadro revela a necessidade de ampliar esse tipo de investigação científica.

Portanto, investigações locais que considerem o efeito de marcadores genéticos para o diagnóstico de câncer são de grande importância para elaboração e aplicação de políticas públicas voltadas ao controle desta doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

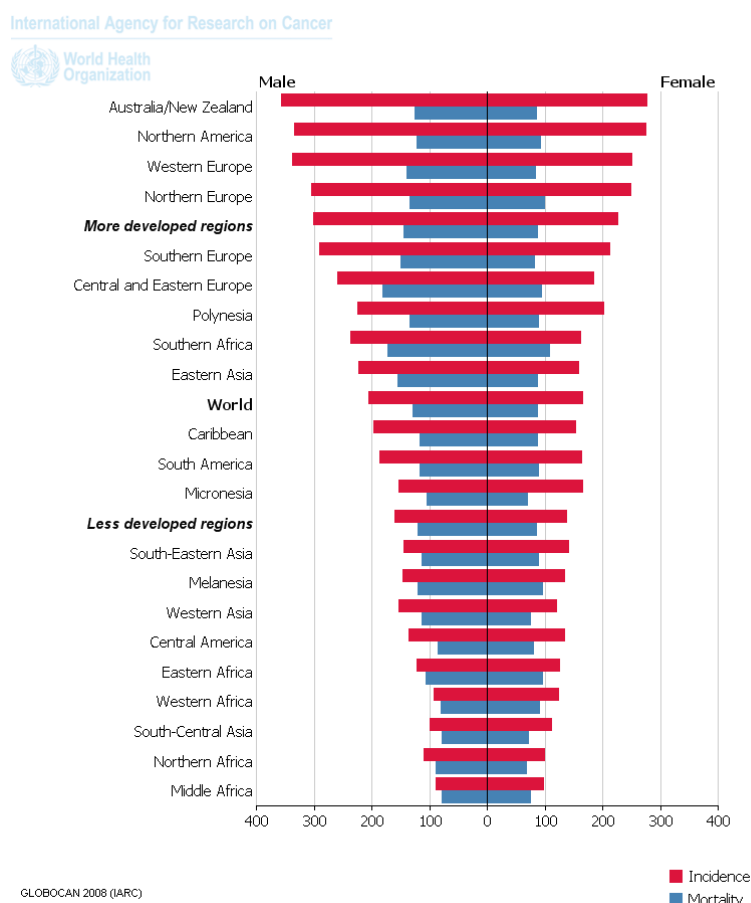
2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é uma doença multifatorial, com fatores de risco genéticos e ambientais, cujo desenvolvimento se dá em diversas etapas, envolvendo respostas celulares e moleculares. Cada uma dessas etapas inclui eventos genéticos (e/ou epigenéticos) que progressivamente transformam células normais em malignas. Diversas vias regulatórias também sofrem alterações de maneira sequencial ou simultânea durante a progressão tumoral, resultando em crescimento autônomo, insensibilidade à inibição do crescimento e apoptose, aumento da neoangiogênese, invasão e disseminação metastática (HANAHAAN e WEINBERG, 2000).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A cada ano, são registrados cerca de 10 milhões de novos casos. Embora as

maiores taxas de incidência de câncer sejam historicamente encontradas em países desenvolvidos, mais de 50% dos casos da doença são diagnosticados nos países em desenvolvimento (Figura 1). O crescimento proporcional de pessoas mais velhas devido ao aumento da expectativa de vida, a queda de mortes por doenças infectocontagiosas e cardiovasculares, são apontados como as principais causas para a incidência crescente de câncer nesses países (WHO, 2002).

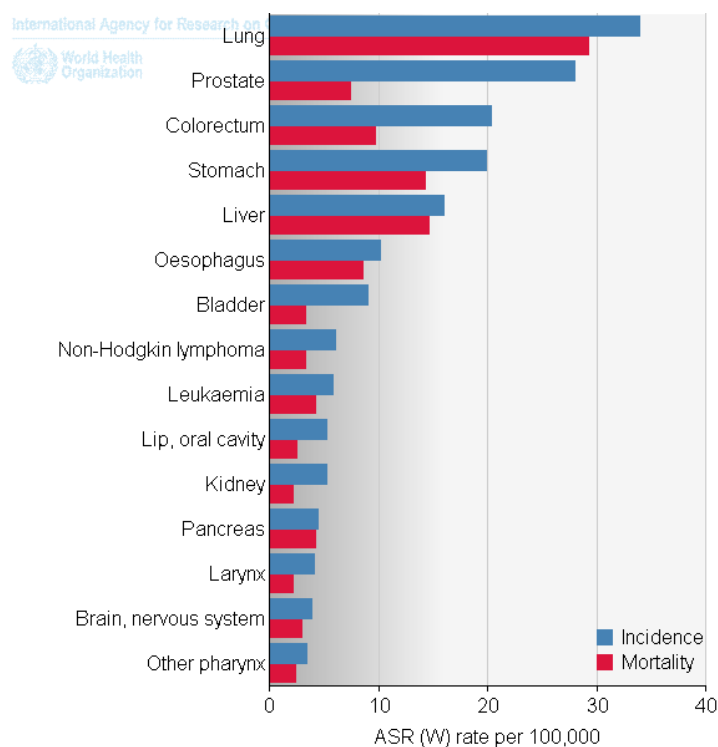
Os países desenvolvidos apresentam elevados índices de tumores com taxas de sobrevivência razoavelmente altas (próstata, mama e câncer colorretal), enquanto vários tipos de câncer com pior prognóstico (fígado, estômago e esôfago) são mais comuns em regiões menos desenvolvidas (FERLAY *et al.*, 2010).



Fonte: Ferlay *et al.*, 2010.

Fig.1 – Distribuição dos casos de câncer estimados em 2008 nas diferentes regiões do mundo entre homens e mulheres.

Aproximadamente 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por câncer foram previsto para ocorrer no mundo em 2008. Os tumores mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões), cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e de fígado (699 mil óbitos). Para as Américas do Sul, Central e Caribe, estimou-se ter ocorrido em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago, cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (ibid).



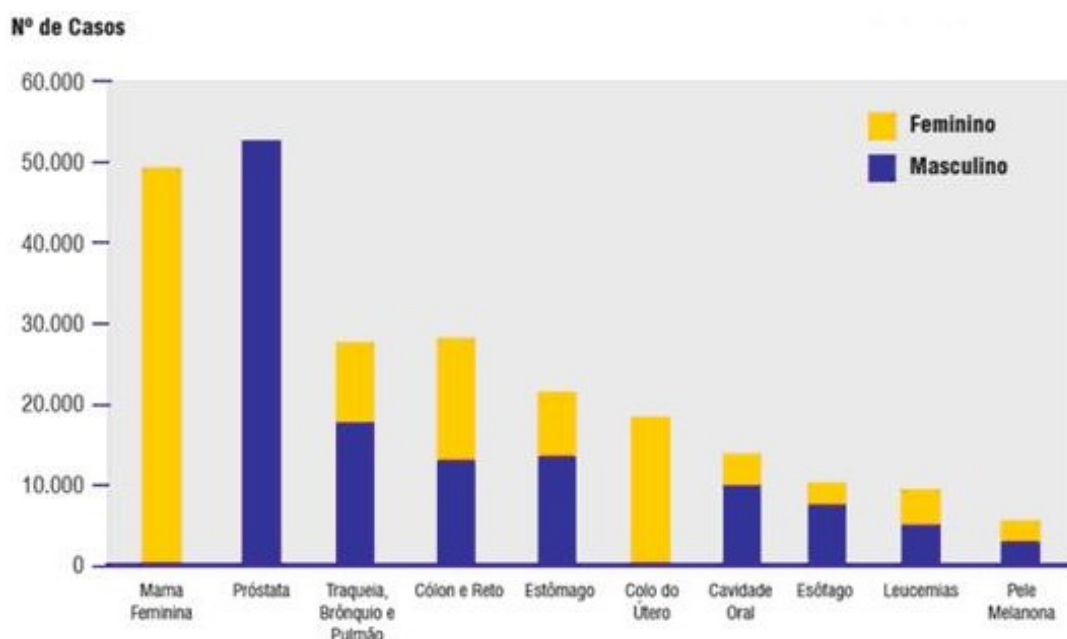
Fonte: Ferlay *et al.*, 2010.

Fig.2 - Incidência e mortalidade mundial dos diversos tipos de tumor estimadas para o ano de 2008 em homens e mulheres.

A distribuição epidemiológica do câncer no Brasil sugere uma transição em andamento, envolvendo um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados a alto status sócio-econômico, tais como câncer de mama, próstata, cólon e reto; e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza – câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade

oral. Esta distribuição, certamente, resulta de exposição a um grande número de diferentes fatores de risco ambientais relacionados ao processo de industrialização – agentes químicos, físicos e biológicos - e de exposição a outros fatores relacionados às disparidades sociais (KOIFMAN e KOIFMAN, 2003).

As estimativas publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2010 (2009) apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer no Brasil, sendo 236.240 para indivíduos do sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) foi previsto como o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil).



Fonte: INCA, 2009.

Fig. 3 – Tipos de câncer mais incidentes estimados para a população brasileira para o ano de 2010, exceto pele não melanoma.

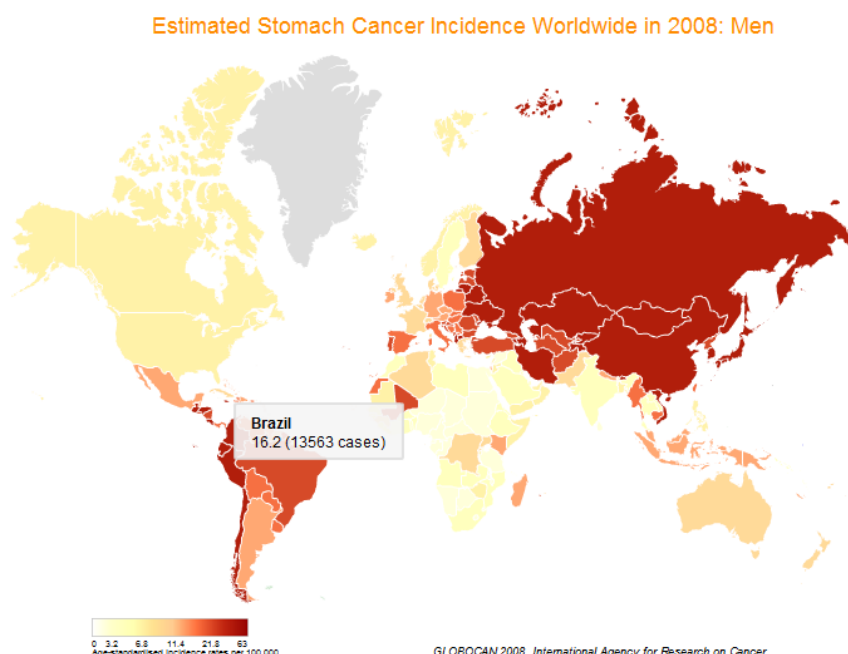
Os tumores mais incidentes para o sexo masculino foram o câncer de pele não melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão

(10 mil) (ibid).

Desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se a segunda causa de morte na população brasileira, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO

A distribuição geográfica do câncer de estômago caracteriza-se por sua ampla variação internacional. O país com a maior incidência é o Japão, mas taxas elevadas também são observadas na América Central, América do Sul e outros países do leste Asiático. Na China, é o câncer de maior incidência. As menores são encontradas no sul da Ásia, no norte e leste da África e na América do Norte. Cerca de dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (INCA, 2009).



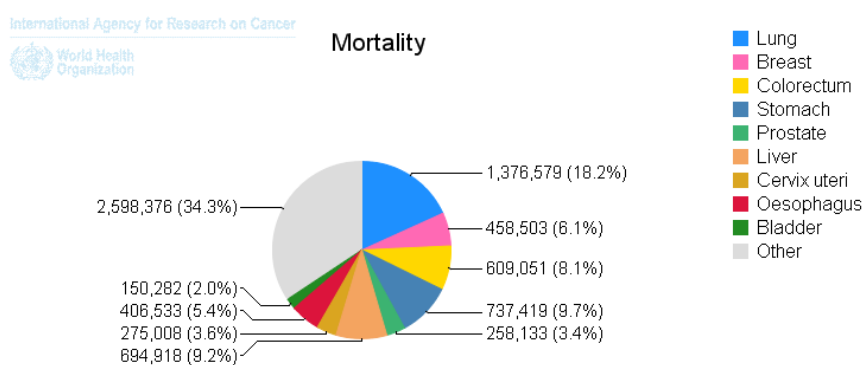
Fonte: Ferlay *et al.*, 2010.

Fig. 4 – Incidência mundial estimada de câncer gástrico para homens no ano de 2008.

Estima-se que em 2008 ocorreram 988.000 (7,8% do total de neoplasias) novos casos de câncer gástrico, tornando-se atualmente a quarta neoplasia maligna mais comum do mundo, atrás dos cânceres de pulmão, mama e colorretal. Mais de 70% dos casos (713.000

casos) ocorrem em países em desenvolvimento (467.000 homens, 246.000 mulheres), e metade do total mundial ocorre no Leste da Ásia (principalmente no Japão e China) (FERLAY *et al.*, 2010).

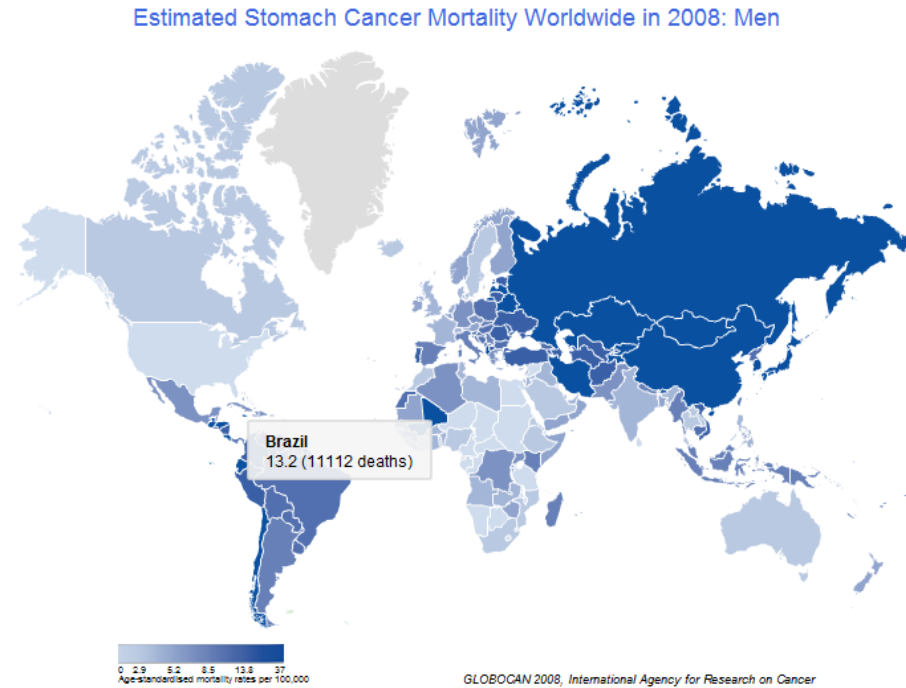
O câncer de estômago é a segunda principal causa de morte por câncer em ambos os sexos em todo o mundo (736.000 mortes, 9,7% do total), apesar dos avanços nos métodos diagnósticos, técnicas cirúrgicas, anestésicas e terapias adjuvantes, fazendo com que sua sobrevivência ainda permaneça abaixo da satisfatória (PINTO *et al.*, 2000; WHO, 2002; FERLAY *et al.*, 2010).



Fonte: Ferlay *et al.*, 2010.

Fig. 5 – Distribuição de mortalidade por câncer entre suas diferentes localizações estimada para o ano de 2008.

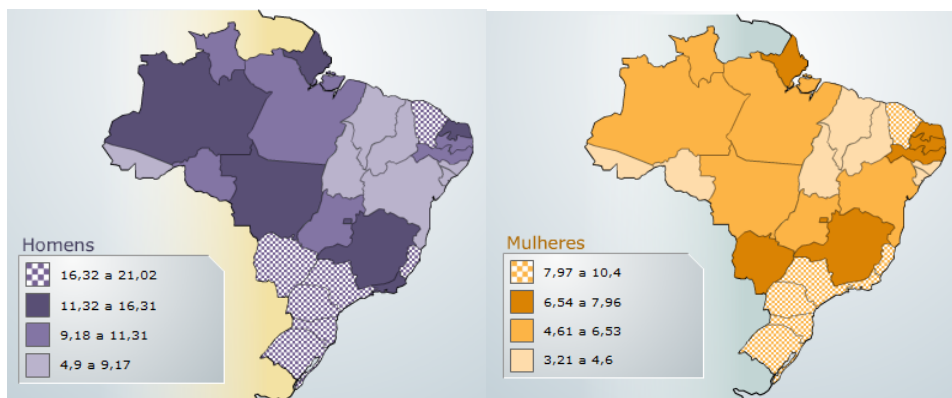
As maiores taxas de mortalidade são estimadas na Ásia Oriental (28,1 por 100.000 em homens, 13,0 por 100.000 em mulheres), a menor na América do Norte (2,8 e 1,5, respectivamente). Alta taxa de mortalidade também está presente em ambos os sexos na Europa Central e Oriental e na América Central e do Sul (FERLAY *et al.*, 2010).



Fonte: Ferlay *et al.*, 2010.

Fig. 6 – Estimativa de mortalidade por câncer gástrico para homens no ano de 2008.

No ano de 2010, foram estimados para o Brasil 13.820 casos novos de câncer de estômago para homens e 7.680 para as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (10/100.000). Na Região Centro-Oeste (12/100.000) é o terceiro e nas regiões Sul (19/100.000) e Sudeste (17/100.000), o quarto. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na Região Norte (6/100.000); o quarto na Região Nordeste (6/100.000) e nas demais regiões, Sul (10/100.000), Sudeste (9/100.000) e Centro-Oeste (6/100.000), é o quinto (INCA, 2009).



Fonte: INCA, 2009.

Fig. 7 – Estimativa da taxa de incidência de câncer gástrico por estado brasileiro em 2010.

O Estado do Pará apresenta elevada incidência desta neoplasia e o câncer de estômago foi a primeira causa de morte por neoplasia em 1999 e 2000, representando, respectivamente, 15,98% e 13,99% dos óbitos no estado (BRASIL, 2006b apud RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006). Belém, a capital do Estado do Pará, ficou na décima primeira posição em número de casos de câncer gástrico por habitante entre todas as cidades do mundo com registro de câncer (INCA, 2008).

2.3. CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico é mais freqüente no sexo masculino (2:1), com um pico de incidência entre 50 e 70 anos de idade para ambos os sexos, sendo raro antes dos 35. O adenocarcinoma gástrico é o tipo histológico mais comum (95%). Apesar de ser o sítio extranodal mais comum do linfoma não Hodgkin, este representa apenas 3% dos tumores de estômago. Sarcomas, incluindo leiomiossarcoma, lipossarcoma, sarcoma neurogênico e o fibrossarcoma são tumores raros (TOWNSEND, 2008, p. 1302-1314).

As manifestações clínicas mais comuns do câncer gástrico são a perda ponderal, dor epigástrica, náuseas, saciedade precoce, anorexia, disfagia, melena, saciedade precoce e dor semelhante à úlcera (ibid). Os sinais podem incluir massa abdominal palpável, hepatomegalia, Nódulo de Virchow (linfonodo palpável em fossa supraclavicular esquerda), Nódulo da Irmã Maria José (periumbilical) e Prateleira de Blummer (tumor metastático sentido ao exame retal devido ao crescimento do espaço retouterino/retovesical) (LAYKE e LOPEZ, 2004).

Segundo Laurén (1965), o adenocarcinoma é classificado em dois subtipos histológicos: intestinal e difuso. O subtipo intestinal é o mais frequente no Brasil e regiões geográficas de alta incidência, predomina em homens, negros, com idade entre 55-60 anos, é caracterizado por células neoplásicas coesas bem diferenciadas, que formam estruturas tubulares semelhantes a glândulas, sendo, geralmente, resultado de processo pré canceroso prolongado, como gastrite atrófica e metaplasia intestinal. Manifesta-se na endoscopia digestiva alta como lesões expansivas, polipóides e ulceradas, encontradas principalmente no estômago distal (antro e curvatura menor). A disseminação metastática é predominantemente hematogênica (CORREA, 1973; TOWNSEND, 2008, p. 1302-1314).

O subtipo difuso de Laurén é mais comum entre indivíduos mais jovens (40-48 anos), pessoas com o tipo sanguíneo A, história familiar positiva, tem uma taxa de incidência mais equilibrada entre homens e mulheres e entre as diferentes regiões geográficas. Geralmente, o tumor difuso é precedido por pangastrite sem atrofia, originando uma neoplasia infiltrativa, que desenvolve-se por todo o estômago, resultando em perda da distensibilidade da parede gástrica, conhecida como linite plástica (também denominado aspecto em “garrafa de couro”). O subtipo difuso também origina metástases precoces, principalmente por contigüidade e via linfática (LAURÉN, 1965; MUNOZ, 1968; TOWNSEND, 2008, p.1302-1314).

Particularmente nos países com incidência decrescente, está ocorrendo uma mudança do adenocarcinoma gástrico do estômago distal para proximal e tumores da junção gastroesofágica, principalmente entre os tumores do subtipo difuso. Esse tumores mais proximais tendem a se apresentar com maior agressão histológica e estão associados a um pior prognóstico (PERA, 2000).

Os carcinomas avançados do estômago podem ser macroscopicamente classificados em quatro tipos, como proposto por Borrmann (1926). Nesta classificação, o tipo I é circunscrito, isolado, polipóide e não-ulcerado; o tipo II é ulcerado, com bordas ulceradas, bem definidas; o tipo III é parcialmente ulcerado, com margens levadas e disseminação parcialmente difusa; e o tipo IV é difuso (TOWNSEND, 2008, p. 1302-1314))

2.3.1. FATORES DE RISCO

A exposição individual a agentes carcinogênicos, através do que se come, bebe, inala, ou através da exposição ocupacional, desempenham um papel relevante no surgimento de um tumor (WHO, 2002).

Vários fatores de risco têm sido implicados para o câncer gástrico (exceto tumores de cárdia): infecção pelo *Helicobacter pylori*, baixo nível socioeconômico, tabagismo, ingestão de alimentos salgados e defumados, baixo consumo de frutas e vegetais e história familiar de câncer gástrico (FUCCIO *et al.*, 2010).

Helicobacter pylori

O *H. pylori* é uma bactéria gram negativa, espiralada e flagelada. Representa uma das infecções humanas mais comuns, entretanto a sua prevalência varia entre os diferentes países. Regiões com alto nível socioeconômico têm registrado um decréscimo na taxa de infecção. Desde a sua descoberta em 1984, o *H. pylori* é reconhecido como uma das principais causas de várias doenças do trato gastrointestinal, como doença ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico primário de células B (FUCCIO *et al.*, 2010).

A colonização por *H. pylori* acomete igualmente homens e mulheres, e sua prevalência aumenta com a idade, baixo nível socioeconômico, más condições de moradia e baixo grau de instrução. A transmissão ocorre via pessoa-pessoa, gastro-oral ou fecal-oral, principalmente através de água contaminada (VERGUEIRO *et al.*, 2008).

Tal infecção é classificada como carcinógeno do grupo I, segundo a Agência internacional de pesquisa do Câncer (IARC). Diversas vias de patogênese têm sido descritas, mas o mecanismo inicial do dano ao DNA é desconhecido. Entretanto, o aparecimento do processo neoplásico é relacionado ao longo processo de inflamação crônica da mucosa gástrica, havendo recrutamento de neutrófilos, linfócitos B e T, macrófagos, células plasmáticas que causam estresse oxidativo, representado pela expressão de óxido nítrico sintase (CORREA *et al.*, 2007; FUCCIO *et al.*, 2010).

O dano à mucosa gástrica induzido pelo *H. pylori* também é devido aos fatores de virulência bacteriana codificados pela ilha de patogenicidade *cag*, como a citocina

vacuolizante A (VacA), uma toxina que entra na célula epitelial e induz a formação de vacúolos e afeta a mitocôndria, levando à apoptose. Também ocorre a produção da proteína CagA (CagA), que induz a proliferação e motilidade da célula epitelial, assim como a produção de citocinas e urease, que converte a uréia em bicarbonato e amônia, havendo a neutralização do ambiente ácido do estômago e maior adesão da bactéria à parede gástrica (FUCCIO *et al.*, 2010).

Os componentes do processo são: gastrite crônica ativa não atrófica → metaplasia intestinal (primeiramente completa, depois incompleta) → displasia → carcinoma invasor (CORREA *et al.*, 2007).

Essas mudanças são induzidas e sustentadas pela infecção persistente do *H.pylori*. A erradicação da bactéria interfere com a cascata pré-neoplásica se realizada prematuramente e pode prevenir o desenvolvimento do tumor. Devido ao mau prognóstico do carcinoma, a estratégia mais promissora para o seu controle é a prevenção (*ibid*).

Apesar de várias vias moleculares confirmarem o papel da bactéria na carcinogênese do câncer gástrico, a infecção pelo *H.pylori* não é considerada suficiente para o desenvolvimento do câncer (FUCCIO *et al.*, 2010).

Dieta

A dieta desempenha um importante papel na gênese do câncer gástrico. Várias linhas de evidências sugerem que a ingestão de altas concentrações de comida preservada no sal, sal e nitrosaminas presentes em alimentos defumados e vegetais em conserva, “provavelmente” aumentam o risco de câncer gástrico, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) e Organização de Alimentos e Agricultura (FAO) (WHO, 2003).

Numerosos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a dieta é o fator de risco exógeno mais relevante para o desenvolvimento do câncer gástrico (NOMURA *et al.* apud RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006). Segundo Hwang *et al.* (1994), a dieta parece estar envolvida nos estágios mais precoces da transformação das células normais em células cancerosas.

A alimentação básica da população paraense, no século passado, incluía um consumo elevado de sal, utilizado na conservação de carnes e frutos do mar, um consumo relativamente reduzido e irregular de legumes e verduras e uma importante ingestão de glicídios, a partir da farinha de mandioca, muitas vezes adicionada de corantes artificiais com anilina. Esse padrão de dieta, provavelmente, pode ser caracterizado como potencialmente favorecedor de certas condições associadas ao processo de desenvolvimento do câncer gástrico (RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006).

A variação mundial na mortalidade do câncer gástrico, particularmente no Japão, tem sido correlacionada com o nível de ingestão diário de sal. O alto consumo de amido também estaria envolvido nesse processo, ocasionando irritação da mucosa gástrica ou promovendo a nitrosação dos nutrientes ingeridos. Por outro lado, o declínio da incidência da neoplasia nos EUA e na Europa é associado com a melhora no padrão de refrigeração dos alimentos e aumento no consumo de frutas e vegetais frescos. (WASHINGTON, 1997; MAYNE *et al.*, 2001; JOOSENS *et al.*, 1996).

Entretanto, ainda não foram demonstrados quais os componentes ativos das frutas e vegetais são responsáveis por essa ação protetora. O estresse oxidativo pode induzir mutações gênicas, modular apoptose e promover a carcinogênese gástrica (THOMSON *et al.*, 1998). Por isso, agentes antioxidantes, como β -caroteno, α -tocoferol e vitamina C têm sido investigados. Contudo, houve falha em atestar qualquer efeito benéfico e o seu papel protetor na prevenção do câncer gástrico (BJELAKOVIC *et al.*, 2004).

É muito provável que a infecção pelo *H. pylori* e fatores dietéticos tenham ação sinérgica em promover o desenvolvimento do câncer gástrico. Vários experimentos em modelos animais têm sido desenvolvidos (FUCCIO *et al.*, 2010). As evidências mais recentes, baseadas em estudos em primatas, sugerem que a infecção pelo *H. pylori* a longo prazo ou a ingestão isolada de nitrosaminas podem causar inflamação da mucosa, mas não câncer. O câncer pode se desenvolver quando ambos os fatores estão presentes (LIU *et al.*, 2009).

2.3.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico precoce de carcinoma gástrico é prejudicado, pois até 80% dos

pacientes são assintomáticos durante os estágio iniciais. No Japão, a maior incidência de adenocarcinoma e adoção de políticas de investigação diagnóstica levaram a um maior número de casos de câncer gástrico sendo detectados numa fase precoce (isto é, quando limitada à mucosa e submucosa, com ou sem comprometimento dos linfonodos) (KOH e WANG, 2002 apud LAYKE e LOPEZ, 2004).

O estudo radiográfico com uso de duplo contraste baritado pode fornecer informações preliminares que auxiliam na determinação se a lesão gástrica está presente e se possui aspectos benignos ou malignos. Entretanto, a endoscopia digestiva alta (EDA) com realização de biópsia e estudo histopatológico representa a conduta de escolha para o diagnóstico de câncer gástrico (CAPPEL e FRIEDEL, 2002).

A aplicação de tratamento empírico para dispepsia pode implicar em atraso do diagnóstico de câncer. É necessário haver uma seleção acurada para os pacientes com maior risco de câncer gástrico, que devem ser submetidos imediatamente à EDA. Sinais e sintomas de alarme, como perda ponderal, disfagia, sangramento do trato gastrointestinal alto, anemia, vômitos persistentes, massa abdominal e adenopatia são mais frequentemente associados com malignidades do trato gastrointestinal superior e indicam a realização de EDA, assim como pacientes com idade superior a 45 anos que apresentam sintomas dispépticos, história familiar de câncer gástrico e gastrectomizados previamente (LAYKE e LOPEZ, 2004).

Tal como acontece com todos os tipos de câncer, o mais importante indicador de ressecabilidade e prognóstico é o estadiamento clinicopatológico. Existem algumas classificações de estadiamento, porém o mais utilizado é o sistema proposto pela *American Joint Committee on Cancer*, conhecido como TNM (tumor, nódulo, metástase) (ANEXO B) (SOBIN *et al.*, 2009).

Os fatores mais importantes que influenciam a sobrevida de pacientes com câncer gástrico são a profundidade da invasão tumoral através da parede gástrica, o número de linfonodos envolvidos e ocorrência de metástase. Infelizmente, esses fatores não podem ser rigorosamente avaliados pelas investigações pré operatórias (SIEWERT *et al.*, 1998).

A cirurgia é a terapia padrão para se obter a cura. Para tumores no terço proximal do

estômago, é necessária uma gastrectomia extendida, com ressecção do esôfago distal. Para pacientes com tumor no terço distal, pode ser realizada gastrectomia subtotal (se for do tipo intestinal de Laurén). A gastrectomia total é recomendada para tumores do terço médio e se a biópsia demonstrar tipo difuso de Laurén. Taxas de mortalidade operatória variam entre 1-3% (LAYKE e LOPEZ, 2004).

A quimioterapia vem sendo estudada, com o objetivo de aumentar a sobrevida dos pacientes (NISHIYAMA & EGUCHI, 2008). Atualmente, diversos quimioterápicos vêm sendo utilizados no tratamento do câncer gástrico, como: os taxanos; o irinotecano (CPT-11); a oxaliplatina; S-1; capecitabina; 5-fluorouracil (5-FU); cisplatina; antraciclina e, mais recentemente, agentes biológicos, como o cetuximab e o bevacizumab (SCARTOZZI *et al.*, 2009).

2.3.3. MARCADORES MOLECULARES DE SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER

Capelozzi (2001); Silveira (2005) apud Almeida *et al.* (2007) afirmam:

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Tais substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença do tumor.

Esses marcadores são proteínas ou pedaços de proteínas e se mostram úteis no manejo dos pacientes com câncer, podendo auxiliar nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico. Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imunoistoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas (ALMEIDA *et al.*, 2007).

2.3.4. MARCADORES INDEL RELACIONADOS AO CÂNCER

O câncer é considerado uma doença genética que ocorre por um acúmulo de mutações não esperadas por recombinação mendeliana, em virtude, principalmente, de exposição a agentes genotóxicos do meio ambiente (VOGELSTEIN e KINZLER, 1998). As neoplasias

caracterizam-se por longos períodos de latência. Experimentos com animais conduziram a um modelo que propõe a divisão da latência em: iniciação, no qual o agente cancerígeno induz mutações e altera a velocidade da divisão celular, e promoção, estágio sucessivo em que o processo evolui até constituir-se num tumor observável. Neste processo, a célula se modifica e, tornando-se cancerosa, expande-se com desenvolvimento anômalo, formando uma colônia de descendentes denominada clone (SQUIRE *et al.*, 1998).

Acúmulo de mudanças genéticas podem dar origem à carcinogênese em três tipos de genes: oncogenes, genes supressores de tumores e genes de estabilidade. Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor representam um fator crítico no desenvolvimento do câncer, levando à conversão de células normais para um estado maligno (YANG *et al.*, 2010).

INDEL é uma denominação comumente empregada para designar marcadores genéticos que apresentam variações dos tipos inserção e deleção de pequenos fragmentos de DNA, sendo, portanto, considerados como polimorfismos bialélicos (SANTOS *et al.*, 2010).

Polimorfismo constitui uma variação no DNA encontrada em uma frequência superior a 1% da população (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004). Polimorfismos que afetam a sequência codificante dos genes são muito comuns nas populações, e podem resultar em mudanças que alteram as funções das proteínas (LÓPEZ-CIMA *et al.*, 2007). Nos últimos anos, polimorfismos do tipo INDEL têm sido o foco de diferentes pesquisas de associações com doenças e vários já foram associados com a predisposição ao câncer, e ao risco elevado de desenvolver esta patologia (PAIVA *et al.*, 2010).

Mills *et al.* (2006) descreveram um mapa inicial em humanos que contém 415.436 polimorfismos únicos de INDEL.

Diferenças na frequência de polimorfismos têm sido detectadas entre diferentes grupos étnicos e populações, provavelmente como decorrência de exposições a carcinógenos específicos ou de características genéticas herdadas (GREENBLATT *et al.*, 1994).

Marcadores INDEL podem estar presentes em regiões promotoras ou codificadoras de genes relacionados ao sistema de defesa do organismo e podem levar à redução ou eliminação

da atividade gênica. Essa redução/eliminação de atividade gênica pode estar relacionada a processos de indução de diferentes tipos de câncer, dependendo do gene envolvido (DE VECCHI *et al.*, 2009; LOPEZ-CIMA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009).

2.3.5. INDEL NO GENE TP53 (16 pb-íntron 3)

O gene TP53 é composto por 11 éxons e está localizado no cromossomo 17, na região 17p13 (BOURDON *et al.*, 2005). Ele codifica a proteína p53, que é responsável pela suspensão do ciclo celular e pela indução de processos de apoptose, através de mecanismos dependentes de transcrição ou independentes da regulação transcricional (TOLEDO e WAHL, 2006; DAUGHERTY *et al.*, 2009). Ele também é responsável pela senescência celular e pelo reparo do DNA (BOURDON, 2007; VOUSDEN & LANE, 2007).

A proteína p53 modula a transcrição de genes que governam a defesa contra o crescimento tumoral, além de interagir com numerosas proteínas celulares, incluindo diversas que controlam a morte celular programada. Nas condições fisiológicas, os níveis e a atividade de p53 são firmemente regulados. Sob diversas formas de estresse celular, os níveis e a atividade transcricional de p53 são sensivelmente aumentados (DAUGHERTY *et al.*, 2009).

De um modo geral, o gene TP53 tem o papel de preservar a estabilidade genômica, respondendo a uma variedade de ameaças, como: danos ao DNA; hipóxia; estresse metabólico e ativação oncogênica (WHIBLEY *et al.*, 2009).

Mutações em TP53 resultam na abstenção ou disfunção em p53, danificando mecanismos da via desta proteína. Desta maneira, a perda direta na funcionabilidade correta de p53 está associada ao prognóstico desfavorável em vários tipos de câncer (*ibid*).

A inserção/deleção de 16 pares de bases, no íntron 3, de TP53 tem sido associada à altos índices de apoptose e à alteração da capacidade de reparo do DNA (GAUDET *et al.*, 2008). Buyru *et al.* (2007) descreveram uma associação existente entre a deleção de 16 pares de bases e o elevado risco de desenvolvimento do câncer de mama, em população da Turquia. Marcel *et al.* (2009) analisaram alguns polimorfismos relacionados à Síndrome Li-Fraumeni, caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos tumores em pacientes com idade precoce. Ficou demonstrada uma elevada associação do polimorfismo PIN3 com a síndrome e com o

fenômeno da antecipação gênica, com aceleração de até 19 anos no diagnóstico do primeiro tumor da referida patologia.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

- Tipo de Estudo:

Foi desenvolvido um estudo descritivo, analítico, comparativo, prospectivo para investigar a associação do polimorfismo PIN3 no gene TP53 e neoplasia gástrica em uma amostra de pacientes portadores de câncer gástrico e de indivíduos controles da população miscigenada de Belém.

- Local do Estudo:

Hospital Universitário João de Barros Barreto e Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará.

- População de Referência e de Estudo:

Todos os pacientes com diagnóstico de câncer gástrico e pacientes sem neoplasia atendidos no HUIBB constituem a população de referência. A população de estudo é constituída pelos pacientes da população de referência atendidos no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.

- Período ao qual o projeto destinou-se a pesquisar:

A pesquisa obteve informações dos pacientes atendidos no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.

- Critérios de inclusão:

- Ter sido atendido no HUIBB no período de 01 de julho 2009 a 01 de março de 2011;
- Aceitar participar da pesquisa ao ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- Critérios de exclusão:

- Não aceitar participar da pesquisa;
- Não apresentar comprovação histopatológica de câncer gástrico.

- Procedimentos:

No estudo, foram analisadas as seguintes variáveis (**APÊNDICE B**): sexo e idade dos pacientes, classificação histológica de Laurén e estadiamento.

A classificação histológica foi a de Laurén (1965); e o sistema de estadiamento utilizado foi o TNM (SOBIN *et al.*, 2009).

3.1. OBTENÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram obtidas através da coleta de 5 mL de sangue periférico, utilizando EDTA como substância anticoagulante (sistema de coleta à vácuo). Armazenadas em caixa de isopor com gelo, as amostras de sangue da população foram transportadas para o Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará. O sangue foi centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos para a separação total de hemácias e leucócitos. Em seguida, foi retirada uma alíquota de plasma e congelado a -20°C. O restante do sangue, com a fração celular, foi utilizado para a extração de DNA.

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

O material genético foi extraído a partir da fração celular pelo método convencional com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol descrito por Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989).

O sangue foi processado inicialmente com tampão salino PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 5,4 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 8,4) em uma proporção de duas partes de tampão para uma parte de camada celular, agitando a mistura suavemente. Após essa etapa, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante (solução + restos orgânicos indesejáveis) foi retirado e adicionado 5 mL de solução de lise celular (NaCl 0,3 M; EDTA 100 mM com pH 7,5 e uréia 7,0 M) que promoveu a ruptura dos leucócitos. A solução foi homogeneizada e adicionado 500 µL de SDS a 20% e, em seguida, a solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 16 horas.

Após o período de incubação, foram adicionados 5 mL de fenol-clorofórmio (1:1), agitando a mistura suavemente por 10 minutos e, posteriormente, centrifugada a 4.000 rpm por minuto. A primeira foi transferida para outro tubo, onde se repetiu a utilização do fenol-clorofórmio (1:1).

O sobrenadante obtido foi adicionado a uma solução de clorofórmio-isopropanol (24:1), homogeneizado por 10 minutos e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, o procedimento foi repetido. Em seguida, a primeira fase foi transferida para outro tubo e adicionada uma solução de acetato de sódio a 3,0 M (pH: 5,2) na proporção de 10% do valor obtido. Esta solução precipita o DNA juntamente com o Etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume da mistura), agitando-se suavemente até a observação do precipitado de DNA.

A hidratação do material extraído, DNA, foi realizada em água deionizada estéril, agitando-se até homogeneização total. O material extraído foi deixado à temperatura ambiente por 24 horas para a completa diluição.

Após a extração, foi processada a quantificação do DNA, que foi diluído para 10 ng/µL, a concentração de uso.

3.3. SELEÇÃO DO MARCADOR

O marcador foi previamente selecionado a partir da análise de resultados de trabalhos publicados na literatura, o qual demonstrou significativa associação do polimorfismo com a susceptibilidade ao câncer (ZHANG *et al.*, 2003; SHEN *et al.*, 2004; MARCEL *et al.*, 2009).

Posteriormente, o código rs da mutação foi informado ao sítio da rede Internet, de domínio público, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> e, desta maneira, foram obtidas

informações como: variabilidade, localização ao longo do cromossomo; tamanho e sequência.

Foi utilizado como critério de escolha deste marcador: I) o tipo de polimorfismo (do tipo INDEL); II) variabilidade (heterozigosidade $\geq 0,10$); III) tamanho (variando entre 3 e 96 pares de bases) e IV) variação de frequência entre populações mundiais.

3.4. SELEÇÃO DOS PRIMERS

Após a seleção do INDEL, foram desenhados os “primers” utilizados nas análises subsequentes. A escolha dos iniciadores foi realizada empregando-se o Programa Primer 3, utilizando sempre os mesmos critérios de exigência, de forma a permitir a amplificação simultânea (sempre com o mesmo programa de PCR) de todos os sistemas investigados. Os iniciadores foram escolhidos, ainda, em função do tamanho desejado do “amplicon”.

A estratégia utilizada para testar a especificidade dos iniciadores inclui a comparação da sequência alvo com o genoma humano inteiro, utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Este programa admite que se identifique alinhamento de seqüências múltiplas, o que permite identificar local de pareamento inespecífico com seqüências de outros cromossomos.

Posteriormente, foi utilizado o Programa Auto Dimer v.1 para testar se os iniciadores formavam grampos ou dímeros entre eles em quantidade suficiente para atrapalhar a amplificação. Nos casos positivos (especificados pelos critérios do programa), os iniciadores foram eliminados e novos iniciadores foram desenhados usando-se novamente o programa Primer 3.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A mensuração da concentração do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific).

3.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para a análise do INDEL do cromossomo estudado foi empregada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction*), onde o marcador foi amplificado. Os iniciadores específicos (*primers*) foram marcados com substâncias fluorescentes (fluorocromos) na extremidade 5'. O **anexo C** mostra o marcador que foi estudado, a localização no cromossomo, os primers, o tamanho dos amplicons e o marcador fluorocromo.

Todo o protocolo utilizado para a amplificação do DNA alvo (volume da reação, concentração de DNA em ng, concentração de magnésio, concentração da enzima, concentração de primer em picomoles, aditivos da PCR, temperatura de extensão e anelamento (*melting*)) foi otimizado. O termociclador utilizado para a reação de amplificação foi o *Veriti™ 96 Well Thermal Cyclers* (*Applied Biosystem*).

3.7. ELETROFORESE CAPILAR

Antes da eletroforese capilar, 1µL do produto da PCR foi adicionado a 8,5µL de formamida deionizada HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5µL de GeneScan 500 LIZ tamanho padrão (Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA foram separados utilizando-se o analisador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) e analisados com o programa GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems). **ANEXO D.**

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas individuais dos *loci* foram estimadas por simples contagem. O teste exato de Hardy-Weinberg e as estimativas de Desequilíbrio de Ligação foram aplicados utilizando-se o pacote estatístico Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Todas as demais análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico SPSS v. 12.0 (SPSS, Chicago, IL. EUA).

As comparações entre os grupos com variáveis categóricas foram feitas por meio do teste X^2 (qui-quadrado), enquanto que o teste t de Student foi utilizado para análise de variáveis contínuas. A utilização da regressão logística considerou como variável dependente a presença de neoplasias, e como variáveis independentes foram empregadas idade e sexo.

Todos os testes estatísticos foram baseados em uma probabilidade bicaudal e um p valor $\leq 0,05$ foi considerado significativo.

4. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto intitulado “Genética do câncer gástrico”, vinculado ao Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto (ANEXO A) conforme as normas preconizadas pela Resolução 196/96. Só haverá participação dos pacientes após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias.

- Riscos:

Existe risco ao paciente em decorrência da punção venosa periférica para a obtenção de 5 mL de sangue, podendo haver a ocorrência de dor e hematoma no local.

- Benefícios:

Espera-se com o projeto o melhor conhecimento sobre os aspectos genéticos do tumor gástrico nas populações amazônicas, o que poderá representar importante contribuição para o diagnóstico desse tipo de câncer.

- Encaminhamento ao Comitê de Ética em Pesquisa:

O presente trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com seres humanos do HUIBB para avaliação, recebendo aprovação no dia 14 de maio de 2004 (ANEXO A).

5. RESULTADOS

5.1. FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER

Foram analisadas amostras de sangue e dados de 99 pacientes atendidos no HUIBB com diagnóstico de câncer gástrico e 225 indivíduos não portadores de câncer, utilizados como controle.

A **tabela 1** apresenta as variáveis estudadas nos casos e controles. No grupo de pacientes, houve predominância do sexo masculino (67,7% dos pacientes) e a média de idade foi de $59,3 \pm 1,2$ anos. É importante destacar que a incidência de câncer gástrico está associada ao sexo masculino, com proporção aproximada de 2:1. No grupo controle, 135 indivíduos (60%) eram do sexo feminino e a média de idade foi de $36,4 \pm 1,2$ anos.

Diferenças estatisticamente relevantes foram observadas com relação às variáveis sexo ($p = 0,001$) e idade ($p = 0,001$) entre o grupo de pacientes e os controles. Fica evidenciado, portanto, que os fatores sexo e idade são significativos para o desenvolvimento do câncer gástrico, considerando $p \leq 0,05$. Desta forma, há necessidade de se considerar tais fatores de interferência nas análises de associação entre os polimorfismos genéticos investigados e o risco de desenvolvimento da neoplasia gástrica.

Em relação ao diagnóstico histopatológico do subtipo de Laurén, observou-se que 41 pacientes (41,4%) apresentavam o subtipo intestinal e 42 (42,4%) o difuso. Entre os 99 pacientes analisados, 16 tiveram seus tumores classificados segundo a OMS.

Os pacientes foram estadiados segundo o padrão TNM e divididos em estádios precoces (I e II) e avançados (III e IV). A maioria dos pacientes (70,7%) apresentou diagnóstico de tumor avançado e 20,2% foram classificados em estádios I/II. Os demais pacientes não puderam ser estadiados devido à: impossibilidade de investigação invasiva em pacientes com estado geral comprometido, não realização de estudo linfonodal ou indisponibilidade do laudo histopatológico da peça cirúrgica.

TABELA 1 – Variáveis estudadas sobre os casos de câncer gástrico atendidos no HUIBB no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011 e os controles.

	Câncer gástrico N=99	Controle N=225	P
Sexo (F/M)^a	32/67	135/90	0,001
Idade^b	59,3±1,2	36,4±1,2	0,001
Classificação de Laurén			
Intestinal	41 (41,4%)		
Difuso	42 (42,4%)		

Estadiamento**TNM**

I/II	20 (20,2%)
III/IV	70 (70,7%)

^aTeste exato de Fisher. ^bTeste t de Student

Fonte: Protocolo de pesquisa.

5.2. ANÁLISE DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS

A **tabela 2** apresenta as frequências alélicas e genotípicas para o INDEL investigado e seu respectivo risco relativo estimado. As proporções genotípicas observadas estão de acordo com as esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, em todos os grupos analisados.

Os resultados obtidos não apresentaram padrões de Desequilíbrio de Ligação que fossem comuns aos grupos de indivíduos com câncer gástrico e o grupo controle.

O risco relativo estimado no grupo Câncer Gástrico foi calculado em relação ao grupo controle.

O INDEL (rs17878362) no gene TP53 apresentou associação significativa para susceptibilidade ao câncer gástrico. No gene TP53, os genótipos que apresentaram risco foram: INS/DEL ($p=0,007$, OR=3,990, IC95%=1,467-10,852) e genótipos combinados INS/INS + INS/DEL ($p=0,007$, OR=3,554, IC95%=1,414-8,935); e o genótipo DEL/DEL ficou evidenciado como de proteção ($p=0,020$, OR=0,343, IC95%=0,139-0,846).

TABELA 2 - Distribuições alélicas e genotípicas na comparação Controle *versus* Câncer Gástrico de amostras obtidas de pacientes internados no HUIBB no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.

Genótipos	Controle	C. Gástrico		
	N=225 (%)	N=99 (%)	p^a	OR (IC 95%)
TP53				
INS/INS	6 (2,7)	4 (4,0)	0,647	1,549 (0,238-10,102)
INS/DEL	33 (14,7)	17 (17,2)	0,007	3,990 (1,467-10,852)
DEL/DEL	185 (82,6)	78 (78,8)	0,020	0,343 (0,139-0,846)
I/I + I/D ^b	39 (17,4)	21 (21,2)	0,007	3,554 (1,414-8,935)
Alelo INS	0,1	0,11		
Alelo DEL	0,9	0,89		
Alelo DEL	0,56	0,53		

^aAnálise de Regressão Logística Múltipla controlada por sexo e idade; ^bAnálise combinada dos genótipos portadores do alelo associado à susceptibilidade ao câncer; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

Fonte: Protocolo de pesquisa.

A **tabela 3** apresenta uma Análise de Regressão Logística Múltipla corrigida por presença de câncer, subtipo de Laurén e ocorrência do genótipo INS, utilizando como variante dependente a idade de diagnóstico da doença antes dos 50 anos. Ficou evidenciado que os portadores do alelo INS para o PIN3 apresentam antecipação de 15% no tempo de aparecimento da doença ($p=0,002$, OR= 1,15, IC95%=1,05-1,26).

TABELA 3 – Análise de regressão logística múltipla corrigida por diferentes fatores de confusão e como variante dependente a idade dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico antes dos 50 anos de idade em amostras obtidas de pacientes internados no HUIBB no período de 01 de julho de 2009 a 01 de março de 2011.

	Idade < 50 anos	
	p^a	OR (IC 95%)
Câncer	0,000	45,827 (8,99-233,44)
Laurén	0,343	1,088 (0,91-1,29)
PIN3 (INS)	0,002	1,15 (1,05-1,26)

^aAnálise de Regressão Logística Múltipla controlada por idade < 50 anos; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança.

Fonte: Protocolo de pesquisa.

6. DISCUSSÃO

O câncer gástrico é o quarto tumor maligno mais freqüente no mundo, e a maior parte dos casos concentra-se em países em desenvolvimento, como o Brasil. No Estado do Pará, essa neoplasia representa um grave problema de saúde pública devido à alta incidência e mortalidade acima da média brasileira (RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009). Em Belém, a sobrevida estimada é de cerca de 9-10% (INCA, 2009).

Para o câncer gástrico, não obstante a alta incidência, morbidade e mortalidade relacionadas a essa neoplasia, não existem programas governamentais voltados para a identificação de populações de risco ou ao diagnóstico precoce, o qual requer exames invasivos de alto custo e disponibilidade limitada (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009).

As variáveis epidemiológicas investigadas, gênero e idade, foram estatisticamente significativas relacionadas ao surgimento do tumor ($p \leq 0,05$). A incidência do câncer gástrico foi maior nos pacientes do sexo masculino e a média de idade do diagnóstico foi de $59,3 \pm 1,2$ anos. Segundo Townsend (2008), o câncer gástrico é mais freqüente no sexo masculino (2:1), com um pico de incidência entre 50 e 70 anos de idade para ambos os sexos.

Segundo Nomura (1996 apud RESENDE *et al.*, 2006), a razão de taxas de incidência de câncer de estômago entre os sexos se situa, comumente, entre 1,5 e 2,5, sendo que as populações de mais alto risco tendem a apresentar razões maiores, em comparação com aquelas de risco mais baixo.

Acredita-se que a diferença de incidência entre os sexos, observada em diferentes populações do mundo, possa estar associada a algum fator endógeno de proteção presente em indivíduos do sexo feminino, como por exemplo, o estrogênio (CHANDANOS & LAGERGREN, 2008).

Todos os pacientes estudados apresentaram o adenocarcinoma. Em relação ao diagnóstico histopatológico do subtipo de Laurén, observou-se maior prevalência (42,4%) do subtipo difuso, diferentemente do descrito na literatura para áreas de alto risco como o Pará. Um trabalho desenvolvido por Khayat *et al.* (2009) analisou 20 amostras de tumor gástrico de pacientes do HUJBB e foi constatado que 70% era do subtipo intestinal.

Mais de 95% das malignidades gástricas representam adenocarcinomas. São classificados histopatologicamente em tipo intestinal, que é bem diferenciado e predomina em áreas geográficas de alto risco; e difuso, que é pouco diferenciado e mais comum em áreas de baixo risco. Contudo, estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento da frequência de tumores do subtipo difuso com células em anel de sinete entre homens e afroamericanos (SMITH *et al.*, 2006; VOGIATZI *et al.*, 2007).

A maioria dos pacientes (70,7%) apresentou diagnóstico de tumor avançado com estádios TNM entre III e IV. O câncer gástrico é comumente diagnosticado em estágios avançados (NARDONE, 2003 apud CALCAGNO *et al.*, 2008). Em um análise sistemática de 289 gastrectomias, Lemes *et al.* (2003) afirmam que o câncer gástrico é uma doença

diagnosticada em fases muito avançadas, sem qualquer possibilidade de cura, com prognóstico muito sombrio.

A maioria dos tumores de estômago são esporádicos e se desenvolvem em resposta ao efeito cumulativo de fatores de risco ambientais e susceptibilidade genética. O supressor tumoral p53 desempenha um papel fundamental na resposta celular ao estresse oxidativo, através da modulação de genes de transcrição que comandam defesas contra o crescimento tumoral, os quais incluem interrupção do ciclo celular, manutenção da integridade genética e inibição da angiogênese, além de interagir com várias proteínas celulares que controlam a morte celular programada (apoptose). Alterações em p53 têm sido relacionadas ao início e progressão de malignidades, além de influenciar na resposta à terapia e prognóstico de tumores, como o câncer gástrico. Alterações na função de p53 são observadas na maioria dos cânceres humanos (YANG *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2009; HRSTKA *et al.*, 2009; WHIBLEY *et al.*, 2009).

Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do DNA encontrados em mais de 1% da população e estão associados ao risco de câncer gástrico quando combinados com fatores ambientais. São considerados biomarcadores ideais para estudos envolvendo o risco do desenvolvimento da doença, visto que vários já foram identificados com sucesso em diversas neoplasias (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004; IKEDA *et al.*, 2008; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2009).

O presente estudo investigou o polimorfismo PIN3 no gene TP53 (rs17878362), que consiste na inserção/deleção de 16 pares de bases no íntron 3.

O genótipo DEL/DEL ficou evidenciado como de proteção ao desenvolvimento do tumor gástrico ($p=0,020$, OR=0,34). Gaudet *et al.* (2008) obtiveram resultado semelhante em indivíduos norte americanos para o genótipo DEL como alelo de proteção ao desenvolvimento do câncer de mama (OR= 0,42).

Os genótipos INS/DEL e INS/INS + INS/DEL (rs17878362) no gene TP53 apresentaram associação significativa ($p\leq 0,05$) para susceptibilidade ao câncer gástrico. Resultado similar foi observado por Gemignani *et al.* (2004), que, ao analisarem o

polimorfismo no gene TP53 na população espanhola, constataram que o alelo INS apresentou risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver o câncer colorretal.

O polimorfismo PIN3 também mostrou-se associado ao aparecimento do câncer gástrico em indivíduos mais jovens, apresentando evidência de antecipação de 15% no tempo de aparecimento da doença em indivíduos portadores do alelo inserção para o polimorfismo PIN3 ($p=0,002$, $OR= 1,15$, $IC95\%=1,05-1,26$). Um trabalho desenvolvido recentemente por Marcel *et al.* (2009) analisaram alguns polimorfismos relacionados à Síndrome Li-Fraumeni, caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos tumores em pacientes com idade precoce. Ficou demonstrada uma elevada associação do polimorfismo PIN3 com a síndrome e com o fenômeno da antecipação gênica, com aceleração de até 19 anos no diagnóstico do primeiro tumor da referida patologia.

Marcel *et al.* (2009) também evidenciaram que o polimorfismo PIN3 é um potente modificador do gene TP53.

O diagnóstico molecular será o futuro do diagnóstico do câncer gástrico. Resultados de estudos genéticos têm o potencial de promover a compreensão do impacto de fatores de risco genéticos na etiologia da doença, especialmente quando explorada a associação com fatores ambientais. A integração entre a tecnologia genômica e as informações clínicas dos pacientes são fundamentais para o desenvolvimento de biomarcadores para um diagnóstico precoce do câncer gástrico (RICCIARDI & BOCCIA, 2007; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009).

Logo, fica claro que esse polimorfismo está relacionado diretamente com o desenvolvimento e manifestações precoces de câncer, tornando-se necessário o desenvolvimento de outras pesquisas desta mutação. Este é um dos primeiros trabalhos realizados na literatura mundial associando o polimorfismo PIN3 no gene TP53 com pacientes portadores de neoplasia gástrica.

7. CONCLUSÕES

O câncer gástrico mostrou-se associado ao sexo masculino (67,7% dos pacientes) e idade avançada (média de $59,3 \pm 1,2$ anos). Os dados relacionados à neoplasia indicam a maior frequência de tumores diagnosticados em estágios avançados da doença (70,7%

apresentaram estádios TNM III/IV). Foi observada uma maior incidência de câncer gástrico do subtipo difuso de Laurén (42,4%).

Com relação à análise genética, os resultados obtidos demonstram associação significativa do polimorfismo PIN3 no gene TP53 (genótipos INS/DEL e INS/INS + INS/DEL) com a presença de câncer gástrico em pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto, além de uma antecipação aproximada de 15% na idade de aparecimento da doença em portadores do alelo INS.

O genótipo DEL/DEL ficou evidenciado como de proteção ao desenvolvimento do tumor gástrico.

O painel de marcadores elaborado em pesquisas como essa poderá ser usado em um programa de rastreamento em populações de alto risco, o que diminuiria custos ao SUS por não ser um procedimento invasivo.

O presente trabalho faz parte de um projeto mais amplo, que objetiva a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, possibilitando a contribuição para a construção de um painel de marcadores genéticos envolvidos no diagnóstico da doença. Estudos complementares são necessários para melhor caracterizar a relação desse polimorfismo com o tumor para, de fato, contribuir à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R.C. Revisão de Literatura: Marcadores Tumoriais. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 53, p. 305-316, 2007. Disponível em http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao1.pdf. Acesso em: 10 mai. 2009.
- ASSUMPÇÃO, P.P.; BURBANO, R.R.; SANTOS, A.R.; SANTOS, N.P.C.; CALCAGNO, D.Q.; PAIVA, S.C.; FERNANDES, M.R.; MUNIZ, G.M. Desenvolvimento de um painel de marcadores genéticos associados à susceptibilidade e farmacogenética do câncer gástrico no estado do Pará. **PPSUS - EDITAL FAPESPA**, n. 13, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal on Surgery Oncology**, v. 30, n.6, p. 593-601, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256231>. Acesso em: 07 mai. 2009.
- BJELAKOVIC, G; NIKOLOVA, D.; SIMONETTI, R.G.; GLUUD, C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 364, p. 1219-1228, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464182>. Acesso em: 07 mai. 2009.
- BOURDON, J.C.; FERNANDES, K.; MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LIU, G.; DIOT, A.; XIRODIMAS, D.P.; SAVILLE, M.K.; LANE, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Dev.**, v.19, p. 2122-2137, 2005. Disponível em: <http://genesdev.cshlp.org/content/19/18/2122.full.pdf?HITS=10&maxtoshow=&RESULTFOORMAT=1&title=%25253Ca%252520class%3D&hits=10>. Acesso em: 15 mai. 2009.
- BOURDON, J.C. p53 and its isoforms in cancer. **British Journal Cancer**, v. 97, p. 277-282, 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/bjc/journal/v97/n3/pdf/6603886a.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de informação e informática do SUS. **Sistema de informação sobre mortalidade 1998-1999: dados de declaração de óbito**. Brasília: MS, 2006. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 20 mai. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de informação e informática do SUS. **Sistema de informação sobre mortalidade 1998-1999: dados de declaração de óbito**. Brasília: MS, 2006 apud RESENDE, A.L.S.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, SERGIO. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n. 3, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032006000300018. Acesso em: 03 mai. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de informação e informática do SUS. **Sistema de informação sobre mortalidade 2008-2009: dados de declaração de óbito**. Brasília: MS, 2010. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 20 mai. 2009.
- BUYRU, N.; ALTINISIK, J.; DEMOKAN, S.; DALAY, N. p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 207-213, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574348>. Acesso em: 15 fev. 2011.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; ASSUMPCAO, P.P.; SMITH, M.A.; BURBANO, R.R. *MYC* and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World Journal Gastroenterology**, v. 14, n. 39, p. 5962-5968, 2008. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/5962.asp>. Acesso em: 20 mar. 2011.

CAPELOZZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 6, p. 321-328 apud ALMEIDA, J.R.C. Revisão de Literatura: Marcadores Tumoriais. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 53, p. 305-316, 2007. Disponível em http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03_/pdf/revisao1.pdf . Acesso em: 10 mai. 2009.

CAPPELL, M.S.; FRIEDEL, D. The role of esophagogastroduodenoscopy in the diagnosis and management of upper gastrointestinal disorders. **Med. Clinical North America**, v. 86, p. 1165-216, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510452>. Acesso em: 20 jun. 2009.

CHANDANOS, E.; LAGERGREN, J. Oestrogen and the enigmatic male predominance in gastric cancer. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2397-2403, 2008. Disponível em: [http://www.ejancer.info/article/S0959-8049\(08\)00578-9/abstract](http://www.ejancer.info/article/S0959-8049(08)00578-9/abstract). Acesso em: 20 mar. 2011.

CORREA, P.; SASANO, N.; STEMMERMANN, G.N.; HAENSZEL, W. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparisons between Miyagi prefecture, Japan, and Hawaii. **Journal National Cancer Institute**, v. 51, p. 1449-1459, 1973. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4762929>. Acesso em: 19 mai. 2009.

CORREA, P.; HOUGHTON, J. Reviews in basic and clinical Gastroenterology - Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 133, p. 659-672, 2007. Disponível em: [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(07\)01167-5/fulltext](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(07)01167-5/fulltext). Acesso em: 17 mai. 2009.

DAUGHERTY, C.L.; CURTIS, H.; REALINI, T.; CHARLTON, J.F.; ZAREPARSI, S. Primary open angle glaucoma in a Caucasian population is associated with the p53 codon 72 polymorphism. **Molecular Vision**, v. 15, p. 1939-1944, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19784392>. Acesso em: 05 mai. 2009.

DE VECCHI, G.; VERDERIO, P.; PIZZAMIGLIO, S.; MANOUKIAN, S.; BARILE, M.; FORTUZZI, S.; RAVAGNANI, F.; PIEROTTI, M.A.; RADICE, P.; PETERLONGO, P. Evidences for association of the CASP8 -652 6N Del promoter polymorphism with age at diagnosis in familial breast cancer cases. **Breast Cancer Res. Treatment**, v. 113, p. 607-608, 2009. Disponível em: <http://pubget.com/paper/18343995#>. Acesso em: 10 mai. 2010.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 2893-2917, 2010. Acesso em: 10 jan. 2011.

FUCCIO, L.; EUSEBI, L. H.; BAZZOLI, F. Gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection and other risk factors. **World Journal on Gastrointestinal Oncology**, v. 15, p. 342-347, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160805>. Acesso em: 30 jan. 2011.

GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. Cell proliferation-related genetic polymorphisms

and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis. **European Journal on Human Genetics**, v.17, p. 1658-67, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536170>. Acesso em: 10 ago. 2010.

GAUDET, M.M.; GAMMOM, M.D.; BENSEN, J.T.; SAGIV, S.K.; SHANTAKUMAR, S.; TEITELBAUM, S.L.; ENG, S.M.; NEUGUT, A.I.; SANTELLA, R.M. Genetic variation of TP53, polycyclic aromatic hydrocarbon-related exposures, and breast cancer risk among women on Long Island, New York. **Breast Cancer Res. Treatment**, v. 108, p. 93-99, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624591>. Acesso em: 15 abr. 2011.

GEMIGNANI, F.; MORENO, V.; LANDI, S.; MOULLAN, N.; CHABRIER, A.; GUITIÉRREZ-HENRÍQUEZ, S.; HALL, J.; GUINO, E.; PEINADO, M.A.; CAPELLA, G.; CANZIAN, S. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. **Oncogene**, v. 23, p. 1954-1956, 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v23/n10/full/1207305a.html>. Acesso em: 10 ago. 2010.

GREENBLATT, M.S.; BENNET, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in p53 suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**, v. 54, p. 4855-4878, 1994. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/18/4855>. Acesso em: 05 jun. 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>. Acesso em: 13 mai. 2009.

HRSTKA, R.; COATES, P.J.; VOJTESEK, B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, p. 440-453, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379143>. Acesso em: 12 jun. 2010.

HUNTSMAN, D.G.; CARNEIRO, F.; LEWIS, F.R.; MACLEOD, P.M.; HAYASHI, A.; MONAGHAN, K.G.; MAUNG, R.; SERUCA, R.; JACKSON, C.E.; CALDAS, C. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1904-1909, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11419427>. Acesso em: 23 jan. 2011.

HWANG, H.; DWYER, J.; RUSSELL, M. Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk: are there new roles for preventive factors? **Nutr. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 75-83, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015750>. Acesso em: 26 mai. 2009.

IKEDA, S.; SASAZUKI, S.; NATSUKAWA, S.; SHAURA, K.; KOIZUMI, Y.; KASUGA, Y.; HNAMI, S.; SAKAMOTO, H.; YOSHIDA, T.; IWASAKI, M.; TSUGANE, S. Screening of 214 Single Nucleotide Polymorphisms in 44 Candidate Cancer Susceptibility Genes: A Case-Control Study on Gastric and Colorectal Cancers in the Japanese Population. **American Journal of Gastroenterology**, v. 103, p. 1476-1487, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510611>. Acesso em: 10 abr. 2011.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Estatísticas do câncer: Vigilância do câncer e de fatores de risco.** Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 10 mai. 2009.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Estatísticas do câncer: Vigilância do câncer e de fatores de risco.** Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 10 mai. 2009.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil: estimativas 2010.** Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1. Acesso em: 10 mai. 2009.

JOOSSENS, J.V.; HILL, M.J.; ELLIOT, P.; STAMLER, R.; LESAFFER, E.; DYER, A.; NICHOLS, R.; KESTELOOT, H. Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. **International Journal of Epidemiology**, v. 25, p. 494-504, 1996. Disponível em: <http://ije.oxfordjournals.org/content/25/3/494.full.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2009.

KHAYAT, A.S.; GUIMARÃES, A.C.; CALCAGNO, D.; SEABRA, A.D.; LIMA, E.M.; LEAL, M.F.; FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B; ASSUMPÇÃO, P.P.; DEMACHKI, S.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. Interrelationship between *TP53* gene deletion, protein expression and chromosome 17 aneusomy in gastric adenocarcinoma. **BMC Gastroenterology**, v. 9, n. 55, 2009.

KIM., J.G.; SOHN, S.K.; CHAE, Y.S.; MOON, J.H.; KIM, S.N.; KANG, B.W.; KIM, G.C.; LEE, M.H.; JEON, S.W.; CHUNG, H.Y.; YU, W. No association of the NFKB1 Insertion/Deletion Promoter Polymorphism with Survival in Patients with Gastric Cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 8, p. 497–501 2009. Disponível em: <http://jjco.oxfordjournals.org/content/39/8/497.full.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2010.

KOH, T.J.; WANG, T.C. Tumors of the stomach. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. **Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease**. 7ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2002, p.829–44 apud LAYKE, J.C.; LOPEZ, P.P. Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. **American Family Physician**, v. 69, n. 5, p. 1133-1141, 2004. Disponível em: <http://www.aafp.org/afp/2004/0301/p1133.html>. Acesso em: 15 mai. 2009.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat. Res**, v. 544, n. 2, p. 305-311, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644332>. Acesso em: 24 mai. 2009.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol. Microbiology Scandinavica**, v. 64, p. 31-49, 1965. Disponível em: <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1993/A1993LQ46500001.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2009.

LAYKE, J.C.; LOPEZ, P.P. Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. **American Family Physician**, v. 69, n. 5, p. 1133-1141, 2004. Disponível em: <http://www.aafp.org/afp/2004/0301/p1133.html>. Acesso em: 15 mai. 2009.

LEMES, L.A.O.; NEUNSCHWANDER, L.C.; MATTA, L.A.C.; OSÓRIO, J.; SOARES, P.C.M.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F.; RODRIGUES, M.A.G. Carcinoma gástrico: análise sistemática de 289 gastrectomias consecutivas em Belo Horizonte (MG). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v39n1/v39n1a11.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2009.

LIU, H.; MERRELL, D.S.; SEMINO-MORA, C.; GOLDMAN, M.; RAHMAN, A.; MOG, S.; DUBOIS, A. Diet synergistically affects helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis in nonhuman primates. **Gastroenterology**, v. 137, p. 1367-1379, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622359>. Acesso em: 15 mai. 2009.

LÓPEZ-CIMA, M.F.; GONZÁLEZ-ARRIAGA, P.; GARCÍA-CASTRO, L.; PASCUAL, T.; MARRÓN, M.G.; PUENTE, X.S.; TARDÓN, A. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. **BMC Cancer**, v. 7, p. 162-167, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705814>. Acesso em: 10 jul. 2009.

MARCEL, V.; PALMERO, E.I.; FALAGAN-LOTSCH, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; ASHTON-PROLLA, P.; OLIVIER, M.; BRENTANI, R.R.; HAINAUT, P.; ACHATZ, M.I. TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. **Journal Med. Genet.**, v. 46, p. 766-772, 2009. Disponível em: <http://jmg.bmj.com/content/46/11/766.abstract>. Acesso em: 14 abr. 2011.

MAYNE, S.T.; RISCH, H.Á.; DUBROW, R.; CHOW, W.; GAMMON, M.D.; VAUGHAN, T.L. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. **Cancer Epidemiol. Biom. Prevention**, v. 10, n. 10, p. 1055-1062, 2001. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/content/10/10/1055>. Acesso em: 26 mai. 2009.

MILLS, R.E.; LUTTIG, C.T.; LARKINS, C.E.; BEAUCHAMP, A.; TSUI, C.; PITTARD, W.S.; DEVINE, S.E. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. **Genome Res.**, v. 16, p. 1182-1190, 2006. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/16/9/1182.full.pdf+html>. Acesso em: 10 jun. 2009.

MUNOZ, N.; CORREA, P.; CUELLO, C.; DUQUE, E. Histologic types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas. **International Journal of Cancer**, v. 3, p. 809-818, 1968. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5731983>. Acesso em: 20 mai. 2009.

NARDONE, G. Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacology Ther.**, v. 17, n. 2, p. 75-81, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786617>. Acesso em: 25 mai. 2009.

NARDONE, G. Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacology Ther.**, v. 17, n. 2, p. 75-81, 2003 apud CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; ASSUMPCAO, P.P.; SMITH, M.A.; BURBANO, R.R. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World Journal Gastroenterology**, v. 14, n. 39, p. 5962-5968, 2008. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/5962.asp>. Acesso em: 20 mar. 2011.

NEUGUT, A.I.; HAYEK, M.; HOWE, G. Epidemiology of gastric cancer. **Semin. Oncol.**, v. 23, n. 3, p. 281-291, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658212>. Acesso em: 07 mai. 2009.

NISHIYAMA, M.E.; EGUCHI, H. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 402-407, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133303>. Acesso em: 30 mai. 2009.

NOMURA, A.M.; HANKIN, J.; KOLONEL, L.N.; WILKINS, L.R.; GOODMAN, M.T.; STEMMERMANN, G.N. Case-control study of diet and other risk factors for gastric cancer in Hawaii. *Cancer Causes Control*, v. 14, n. 6, p. 547-558, 2003 apud RESENDE, A.L.S.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, SERGIO. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n. 3, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032006000300018. Acesso em: 03 mai. 2009.

PAIVA, S.C.; SANTOS, N.P.C.; ALENCAR, D.O.; SANTOS, S. **Investigação de sete marcadores INDEL, em genes associados a diversos tipos de câncer, na população de Belém.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56, São Paulo. Anais.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer Journal Clin.**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078>. Acesso em: 04 mai. 2009.

PERA, M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. **Recent Results Cancer Research**, v. 155, p. 1-14, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693234>. Acesso em: 05 mai. 2009.

PINTO, C.E.; SOUSA FILHO, O.; CORREA, J.H.S.; LANDIM, F.M.; KURODA, B.R.; OLIVEIRA, I.M. Câncer gástrico precoce: revisão de 47 casos do instituto nacional de câncer nos últimos cinco anos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, n. 3, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912001000300002. Acesso em: 20 mai. 2009.

RESENDE, A.L.S.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, SERGIO. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n. 3, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032006000300018. Acesso em: 03 mai. 2009.

RICCIARDI, W.; BOCCIA, S. Assessment of genomics as a priority for Public Health. **Eurohealth**, v. 13, p. 7-9, 2007. Disponível em: <http://www2.lse.ac.uk/LSEHealthAndSocialCare/LSEHealth/pdf/eurohealth/VOL13No4/RicciardandBoccia.pdf>. Acesso em: 26 mai. 2009.

ROCHA, A.P.; MAGALHÃES, P.K.R.; MAIA, A.L.; MACIEL, L.M.Z. Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, p. 51-55, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v51n5/a09v51n5.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2 ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 1626.

SANTOS, N.P.C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C.; PEREIRA, R.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A.; GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.A.; MATTE, C.; HUTZ, M.H.; SANTOS, S.E.B. Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48-Insertion-Deletion (INDEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel. **Human Mutation**, v. 31, p. 184-190, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.21159/abstract>. Acesso em: 12 jan. 2011.

SCARTOZZI, M.; BITTONI, A.; PISTELLI, M.; GALIZIA, E.; BERARDI, R.; GIAMPIERI, R.; FALOPPI, L. E.; CASCINU, S. Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: State of the art and future perspectives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, p. 451-462, 2009. Disponível em: [http://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(09\)00061-9/abstract](http://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(09)00061-9/abstract). Acesso em: 14 abr. 2011.

SHEN, H. *et al.* P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. **Oncol. Rep.**, v. 11, p. 1115–1120, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069555>. Acesso em: 13 jun. 2009.

SIEWERT, J.R.; BÖTTCHER, K.; STEIN, H.J.; RÖDER, J.D. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. **Ann. Surg.**, v. 228, n. 4, p. 449–461, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1191515/>. Acesso em: 24 mai. 2009.

SILVEIRA, A.S. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. **Fatores prognósticos, preditivos e marcadores**. Florianópolis: UFSC, 2005, p. 135-152 apud ALMEIDA, J.R.C. Revisão de Literatura: Marcadores Tumoriais. **Rev. Bras. de Cancerologia**, v. 53, p. 305-316, 2007. Disponível em http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao1.pdf. Acesso em: 10 mai. 2009.

SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2979-2990, 2006. Disponível em: http://www.wjgnet.com/1007-9327/abstract_en.asp?f=2979&v=12. Acesso em: 20 mar. 2011.

SOBIN, L.; GOSPODAROWICZ, M.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7 ed., New York: Wiley, 2009.

SQUIRE, J. A.; WHITMORE, G. F. & PHILLIPS, R. A., 1998. Genetic basis of cancer. In: **The Basic Science of Oncology** (I. F. Tannock & R. P. Hill, ed.), pp. 48-78, 3 ed. New York: McGraw-Hill.

THOMSON, A.; HEMPHILL, D.; JEEJEEBHOO, K.N. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. **Digestive Diseases**, v. 16, p. 152-158, 1998. Disponível em: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=16859>. Acesso em: 14 mai. 2009.

TOLEDO, F.E.; WAHL, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature Rev. Cancer**, v. 6, p. 909-923, 2006. Disponível em: <http://www.nature.com/nrc/journal/v6/n12/pdf/nrc2012.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2009.

TOWNSEND, M.C. Neoplasia gástrica. **Tratado de cirurgia: a base biológica da moderna prática cirúrgica**. 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 1302-1314.

VERGUEIRO, C.S.V.; CORDIOLLI, R.; MARTUCCI, D.; PERES, V.; KIYAMU, A.R.; RIBEIRO, K.C.B.; CHIATTONE, C.S. Soroprevalência e fatores associados à infecção pelo *Helicobacter pylori* em doadores de medula óssea de São Paulo. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 11, n. 2, p. 196-203, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v11n2/02.pdf>. Acesso em: 24 mai. 2009.

VOGIATZI, P.; VINDIGNI, C.; ROVIELLO, F.; RENIERI, A.; GIORDANO, A. Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis. **Journal of Cell Physiology**, v. 211, p. 287-295. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.20982/pdf>. Acesso em: 20 mar. 2011.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. **The Genetic Basis of Human Cancer**. New York: McGraw-Hill, 1998.

VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. **Nature Review of Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 275-283, 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n4/full/nrm2147.html>. Acesso em: 15 jun. 2009.

WASHINGTON: American Institute for Cancer Research (AICR). **World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**, 1997.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P.D.P.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature Reviews**, v. 9, p. 95-106, 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/nrc/journal/v9/n2/full/nrc2584.html>. Acesso em: 10 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 12, n. 5, p. 366-370, 2002. Disponível em: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892002001100015. Acesso em: 15 mai. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **Who technical report series 916**. Geneva: World Health Organization, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon: 2009.

WÜNSCH FILHO, V.; GATTÁS, G.J.F. Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 467-480, 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2001000300003&script=sci_arttext. Acesso em: 25 mai. 2009.

YANG, M.; GUOY, Y.; ZHANG, X.; MIAO, X.; TAN, W.; SUN, T.; ZHAO, D.; YU, D.; LIU, D.; LIN, D. Interaction of P53 Arg72Pro and MDM2 T309G polymorphisms and their associations with risk of gastric cardia cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 9, p. 1996-2001, 2007. Disponível em: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/28/9/1996.full>. Acesso em: 20 mar. 2011.

YANG, H.; ZHONG, Y.; PENG, C.; CHEN, J.Q.; TIAN, D. Important role of indels in somatic mutations of human cancer genes. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 128, p. 1471-

2350, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/128>. Acesso em: 01 abr. 2011.

YASUI, W.; OUE, N.; KUNIYASU, H.; ITO, R.; TAHARA, E.; YOKOZAKI, H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. **Gastric Cancer**, v. 4, p. 113–121, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11760076>. Acesso em: 30 mai. 2011.

ZHANG, Z.W.; NEWCOMB, P.; HOLLOWOOD, A.; FEAKINS, R.; MOORGHEN, M.; STOREY, A.; FARTHING, M.J.G.; ALDERSON, D.; HOLLY, J. Age-associated increase of codon 72 Arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2151–2156, 2003. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/6/2151.full>.

APÊNDICES

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução Nº 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

Título da pesquisa: **GENÉTICA DO CÂNCER GÁSTRICO**

Instituições Envolvidas: Universidade Federal do Pará (UFPA), Hospital Universitário João de Barros Barreto.

Esclarecimento da Pesquisa

O estômago é o órgão que vem logo após o esôfago, no trajeto do alimento dentro do aparelho digestivo. Ele tem a função de armazenar por pequeno período os alimentos, para que possam ser misturados ao suco gástrico e digeridos.

O câncer de estômago (também denominado câncer gástrico) é a doença em que células malignas são encontradas nos tecidos do estômago.

Vários estudos têm demonstrado que a dieta é um fator muito importante no aparecimento do câncer de estômago. Uma alimentação pobre em frutas e vegetais, ou ainda, rica em alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento deste tipo de câncer. Também é fator de risco para o desenvolvimento do câncer de estômago a infecção do órgão por uma bactéria denominada *Helicobacter pylori*. Uma lesão pré-cancerosa leva aproximadamente 20 anos para evoluir para a forma grave. Sendo assim, a medida mais eficaz para diminuir os riscos é iniciar uma dieta balanceada precocemente, ainda na infância. Pessoas fumantes, que ingerem bebidas alcoólicas ou que já tenham sido submetidas a operações no estômago também têm maior probabilidade de desenvolver este tipo de câncer.

Não há sintomas específicos do câncer de estômago. Porém, algumas características como perda de peso, anorexia, fadiga, sensação de saciedade precoce, vômitos, náuseas e desconforto abdominal persistente podem indicar uma doença benigna ou mesmo o câncer de estômago.

Um número elevado de casos de câncer de estômago é diagnosticado em estágio avançado, devido aos sintomas vagos e não específicos. O tratamento cirúrgico é a principal alternativa de tratamento

O objetivo desta pesquisa é a detecção de um marcador tumoral. Os marcadores tumorais são moléculas presentes no sangue, em geral, proteínas ou pedaços de proteína, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações podem indicar a presença de um tumor. Isto permitirá o conhecimento de características desse tipo de doença na população paraense, o que, no futuro, poderá auxiliar no diagnóstico do câncer de estômago.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em fornecer alguns dados, como nome, idade, resultados de endoscopia e histopatológico de biópsia do estômago, além de sintomas da doença, assim como, permitir a coleta de 5 mililitros de seu sangue, que será colhido com material estéril e descartável, podendo provocar o aparecimento de dor e/ou hematoma no local.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Somente os autores desta pesquisa terão acesso às informações confidenciais para publicação em relatórios e revistas científicas.

Deixa-se claro que a sua participação é de seu livre-arbítrio, não havendo pagamento pela mesma, podendo, em qualquer momento do estudo, recusar-se a responder qualquer pergunta, permitir a análise e divulgação de dados contidos em seu questionário.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a **GENÉTICA DO CÂNCER GÁSTRICO₁** e que me sinto perfeitamente esclarecido(a) sobre o conteúdo do mesmo, assim como quais são os riscos e propósitos da pesquisa, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando e fornecendo informações sobre a minha pessoa, que constarão em um questionário epidemiológico, os quais só poderão ser utilizadas em relatórios e publicações científicas.

Belém, / / .

Nome do participante: _____ Assinatura: _____

Pesquisador Responsável: Paulo Pimentel Assumpção.

Assinatura: _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará (CEP-HUJBB/UFPA) – Rua dos Mundurucus, N°. 4487, Guamá – CEP: 66073-000 – Belém – Pará. Tel.: 3201 6652. E-mail: **cephujbb@ufpa.br**

APÊNDICE B**ANÁLISE DO POLIMORFISMO PIN3 DO GENE TP53 EM PACIENTES COM
CÂNCER GÁSTRICO ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE
BARROS BARRETO****QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO**

REGISTRO:

1- IDENTIFICAÇÃO PESSOAL

A) NOME:

B) SEXO: ☐ Masculino ☐ Feminino

C) DATA DO NASCIMENTO:

2- DADOS INERENTES AO CÂNCER GÁSTRICO

A) TIPO HISTOLÓGICO

☐ Adenocarcinoma gástrico ☐ Linfoma gástrico ☐ Leiomioma gástrico ☐ Sarcoma
☐ Tumor estromal gastrintestinal – GIST

B) CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN

☐ Intestinal ☐ Difuso

C) GRAU DE INVASÃO, segundo TNM (ANEXO A)

☐ Tx ☐ T0 ☐ Tis ☐ T1a ☐ T1b ☐ TII
☐ TIII ☐ TIVa ☐ TIVb

D) LINFONODOS ATINGIDOS

Nx ☐ ☐ N0 ☐ N1 ☐ N2 ☐ N3

E) PRESENÇA DE METÁSTASE

☐ Mx ☐ M0 ☐ M1

F) ESTÁGIO DA DOENÇA

() 0	() IA	() IB	() IIA	() IIB	() IIIA
() IIIB	() IIIC	() IV			

ANEXOS

ANEXO A

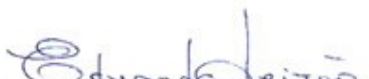


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14.05.2004, o projeto de pesquisa intitulado "***Genética do Câncer Gástrico***", desenvolvido por Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Burbano, Sílvia Regina Caminada de Toledo, Maisa Yoshimoto, Eleonidas Moura de Lima, Cacilda Casartelli e André Salim Khayat, sob a Orientação do Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 14 de maio de 2004


DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HUIBB

ANEXO B

ESTADIAMENTO TNM – 7ª EDIÇÃO (SOBIN *et al.*, 2009).

TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial tumor without invasion of the lamina propria
T1	Tumor invades lamina propria, muscularis mucosae, or submucosa
T1a	Tumor invades lamina propria or muscularis mucosae
T1b	Tumor invades submucosa
T2	Tumor invades muscularis propria
T3	Tumor penetrates subserosal connective tissue without invasion of visceral peritoneum or adjacent structures. T3 tumors also include those extending into the gastrocolic or gastrohepatic ligaments, or into the greater or lesser omentum, without perforation of the visceral peritoneum covering these structures
T4	Tumor invades serosa (visceral peritoneum) or adjacent structures
T4a	Tumor invades serosa (visceral peritoneum)
T4b	Tumor invades adjacent structures such as spleen, transverse colon, liver, diaphragm, pancreas, abdominal wall, adrenal gland, kidney, small intestine, and retroperitoneum

NX	Regional lymph node(s) cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in 1 to 2 regional lymph nodes
N2	Metastasis in 3 to 6 regional lymph nodes
N3	Metastasis in 7 or more regional lymph nodes

ANEXO B

Estadiamento TNM – 7ª edição (SOBIN *et al.*, 2009).

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Stage IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Stage IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Stage IIIB	T4b	N0 or N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Stage IIIC	T4b	N2 or N3	M0
	T4a	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

ANEXO C

TP 53: Código, sequência dos primers, tamanho do amplicon, frequências em populações e fluorocromo.

Marcadores	RS	Sequência dos primers		Frequências em populações	INDEL	Amplicon	Fluorocromo
TP53	17878362	F	5'GGGACTGACTTTCTGCTCTTGT 3'	6.:90%; 9.:73%; 5.:98%	16	147-163	HEX
		R	5'GGGACTGTAGATGGGTGAAAAG 3'				

¹Caucasianos. ²Africanos. ³Asiáticos.

ANEXO D

Eletroferograma representativo da genotipagem do TP53 (Ins/Del).

