

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

HELDER FERREIRA GONÇALVES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA ALÇA-D EM TUMORES GÁSTRICOS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

BELÉM - PA
2009

HELDER FERREIRA GONÇALVES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA ALÇA-D EM TUMORES GÁSTRICOS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia
Harada

BELÉM - PA
2009

HELDER FERREIRA GONÇALVES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA ALÇA-D EM TUMORES GÁSTRICOS
NA POPULAÇÃO PARAENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Belém (PA), 17 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia Harada

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFPA

Avaliador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFPA

BELÉM - PA
2009

À minha avó, Marialva Gonçalves,
com muito carinho e amor.

*“Chega de temer, chorar, sofrer, sorrir, se dar
E se perder e se achar e tudo aquilo que é viver
Eu quero mais é me abrir e que essa vida entre assim
Como se fosse o sol desvirginando a madrugada
Quero sentir a dor desta manhã.*

*Nascendo, rompendo, rasgando, tomando, meu corpo e então eu
Chorando, sofrendo, gostando, adorando, berrando
Feito louca, alucinada e criança
Eu quero o meu amor se derramando
Não dá mais pra segurar, explode coração...”*

Gonzaguinha

AGREDECIMENTOS

A Professora Maria Lúcia Harada, orientadora, conselheira e amiga, pela oportunidade única e pela confiança depositada em mim durante esses dois anos de trabalho, pela sua dedicação e apoio, pelos momentos de ensinamento e de descontração, pelos “puxões de orelha” e por ter aguçado meu desejo de ser cientista.

A Dra. Bárbara do Nascimento Borges (Babita), pela participação ativa e indispensável neste trabalho, pelo companheirismo, discussões, idéias, soluções pelos problemas que apareceram durante a realização deste estudo e pela extrema dedicação em todos os momentos que precisei. “Sabes que tua voz é um colírio para os meus ouvidos e teus ensinamentos colírios para minha formação”. – Muito obrigado por tudo, amore!

Ao Professor Nilson Praia Anselmo, pelas imensas dúvidas tiradas que surgiam enquanto minha orientadora estava ausente, pelo companheirismo, pelos momentos bons de descontração na copa nos intervalos das minhas atividades e por ter aceitado o convite para fazer parte da banca avaliadora em minha defesa.

Aos pacientes do Hospital Ofir Loyola, do Hospital Universitário João de Barros Barreto e do Laboratório de Análises Clínicas da UFPA pelo consentimento das amostras estudadas no presente estudo.

A querida Professora Rita de Cássia Mousinho Ribeiro, amiga, professora, conselheira, pelo imenso apoio durante a graduação, pelos abraços nos corredores, pelos momentos de preocupação, solucionadora dos imensos problemas que eu e minha turma tivemos durante esses anos.

Ao Professor André Salim Khayat, pela aceitação do convite para compor a banca avaliadora em minha defesa.

A Professora Margarida Lima, amiga, companheira, pelas risadas e brincadeiras e por todos os momentos bons de descontração nesses dois anos.

Ao meu Pai, Mãe, Irmãos e Soninha, pelo apoio durante todo esse tempo e por acreditarem que um dia eu seria um motivo de orgulho para a nossa família.

A minha Avó, Marialva Borges Gonçalves, minha fiel companheira, minha base, meu espelho de vida, meu apoio incondicional, por não ter medido esforços para que eu chegasse onde hoje estou. Por ter me mostrado o caminho certo a seguir durante todo esse tempo da minha criação e por todo o apoio financeiro mesmo nos momentos de dificuldades. Se hoje eu sou um Biomédico, é pela imensa dedicação dela em minha vida. - Te amo, Vó!

A minha fiel amiga, companheira, parceira em mil momentos, Bióloga preferida, Mariana Diniz Araújo, por ter sido o meu maior apoio dentro do Laboratório de Biologia Molecular, minha maior conselheira, a ela, quem mais fez tudo pelo meu bem lá dentro, pelas imensas ajudas na realização das minhas técnicas laboratoriais, por todos os momentos maravilhosos que tivemos e por todos os momentos tristes que nos fizeram chorar, mas também crescer muito nessa vida. – Muito obrigado, minha DAMA!

Ao meu amigo Wallax Augusto por sempre acreditar no meu esforço e dedicação, pelos momentos de aprendizado, discussões, idéias, companheirismo durante altas horas e finais de semana no laboratório e principalmente pela imensa surpresa ao final deste ano.

Aos meus maiores amigos do Laboratório de Biologia Molecular “Francisco Mauro Salzano”, Laine Pinto, Carlos Costa, Carinne Monteiro, Henrique Fonseca e o caçulinha Rodrigo de Oliveira, que já chegou no finalzinho, mas que é tão especial quanto, pelos momentos de ajuda, pelos conselhos, discussões, os vários momentos de descontrações nas pizzarias, nas caronas, no “HOT” e nos forrós do “Vadião”. Sem vocês meu sorriso não existiria nesses últimos meses.

As minhas “chefas” do Laboratório “Paulo C. Azevedo”, Dra. Maria Suely Cavalcante (Sú), por todo o ensinamento e confiança em mim depositados no setor de Imunologia e a Dra. Leila Tembra, pelos momentos de descontração e pelo total entendimento do meu afastamento nos últimos meses do ano para que eu conseguisse terminar este trabalho de conclusão de curso.

Aos meus inseparáveis e fies amigos de sala de aula e de vida, Jemima Messias, Bruna Lorena Henderson e Carlos Costa (mais uma vez), por todos esses quatro anos de imenso companheirismo, paciência, ajuda, brigas, discussões, alegrias e tristezas, pelos milhões de “galhos quebrados”, ou melhor, de imensas “árvores quebradas”, coisas que só fizeram crescer nossa amizade. Sem os quatro juntos, os quatro teriam chegado hoje onde estamos, mas tenho certeza que com muito mais dificuldades do que as que encontramos. – Amo vocês!

A minha estagiária, Lílian, pelas milhões de ajudas na realização de todas as etapas das minhas técnicas laboratoriais nos últimos dois meses, pela paciência e eficiência nos trabalhos. Sem ela, eu não teria conseguido avançar o quanto avancei em termos de números nos últimos meses. – Valeu, Baiana!

Aos meus amigos Mylner Fermiano, Fabíola Silva, Camila Ferreira e Rosângela Napoleão por nunca me deixarem desacreditar nos meus sonhos, pelo companheirismo, preocupações e os momentos de alegria que só me fazem muito mais feliz.

A Tiago Martins Estácio (Boleta), meu irmão, meu amigo, meu ombro, espelho e conselheiro, papai da minha sobrinha Lis, um garoto (um simples garoto), que me ensinou muitas coisas dessa vida. – Mano: “vi-da”. Te Amo!

A Wolfgang Allan Rodrigues Krueger, meu orgulho, por todo o companheirismo durante esses dois anos, por toda a paciência, aos incontáveis momentos de ajuda profissional e pessoal, ao apoio incondicional, aos inúmeros conselhos e “puxões de orelha”, por todas as preocupações e os momentos de alegria e tristeza que só me fizeram e ainda me fazem crescer como pessoa. – *Ich liebe viel dich, mein liebe. Für Immer!*

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, pela convivência e amizade nesses quatro anos.

A Universidade Federal do Pará, pela oportunidade única de realização do curso de Bacharelado em Biomedicina.

Ao Papai e a Mamãe do Céu por terem me dado o imenso dom da vida e o imenso presente de ter todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho para que eu conseguisse concluir esse trabalho e para que hoje eu pudesse me tornar um **Biomédico**.

A todos o meu eterno e muito obrigado!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
EPÍGRAFE	ii
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. BASES GENÉTICAS DO CÂNCER	2
1.2.1. Oncogenes	3
1.2.2. Genes Supressores de Tumor	4
1.3. O CÂNCER GÁSTRICO	5
1.3.1. Epidemiologia	5
1.3.2. Fatores Etiológicos	6
1.3.3. Classificação Histopatológica	7
1.4. O DNA MITOCONDRIAL	10
1.4.1. A Região Controle	12
1.4.2. Polimorfismos do DNA mitocondrial	13
1.5. OBJETIVOS	14
1.5.1. Objetivo Geral	14
1.5.2. Objetivos Específicos	14

2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. AMOSTRAS	15
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA	15
2.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	16
2.4. SEQUENCIAMENTO DO DNA	17
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	19
3.2. POLIMORFISMOS DA ALÇA-D	22
3.2.1. Polimorfismo C16516T	23
3.2.2. Microssatélite 16189T	25
3.2.3. Microssatélite 310T	28
3.2.4. Repetição dinucleotídica (CA)_n na posição 514-523	30
4. CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	44
ANEXO I	45
ANEXO II	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Manifestações de seis alterações fundamentais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento maligno	2
Figura 2	Estágios de desenvolvimento de tumores do tipo intestinal	9
Figura 3	Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso	10
Figura 4	Mapa do genoma mitocondrial humano	11
Figura 5	Diagrama da região controle mostrando o flanqueamento dos genes tRNA _{pro} e tRNA _{phe} e a localização das regiões hipervariáveis HVI e HVII	12
Figura 6	Distribuição da faixa etária dos indivíduos do grupo de casos analisados no presente estudo	20
Figura 7	Representação gráfica apresentando a porcentagem de pacientes idosos em ambos os grupos deste estudo.	21
Figura 8	Eletroferogramas de seqüências de mtDNA mostrando as duas formas polimórficas do SNP C16516T	24
Figura 9	Eletroferogramas com seqüências de mtDNA das 7 formas alélicas encontradas no grupo tumoral para o polimorfismo 16189T	27
Figura 10	Eletroferogramas com seqüências de mtDNA do grupo tumoral mostrando as 4 formas alélicas encontradas para o polimorfismo 310T	29
Figura 11	Eletroferogramas de seqüências de mtDNA de quatro pacientes mostrando os quatro alelos encontrados para a repetição dinucleotídica de (CA) na posição 514-523	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüências dos iniciadores utilizados para a reação de amplificação	17
Tabela 2	Seqüências dos iniciadores utilizados para a reação de seqüenciamento	18
Tabela 3	Freqüências dos alelos do polimorfismo C16.519T para cada característica clínico-patológica.	24
Tabela 4	Freqüências dos alelos do polimorfismo 16.189T para cada característica clínico-patológica.	26
Tabela 5	Freqüências dos alelos do polimorfismo 310T para cada característica clínico-patológica.	29
Tabela 6	Freqüências dos alelos do polimorfismo de repetição 514-5123 (CA) _n para cada característica clínico-patológica.	32

RESUMO

O mtDNA corresponde ao material genético extracelular, de formato circular com 16.569 pares de base. Existem evidências ligando o processo da carcinogênese gástrica ao envelhecimento, com o acúmulo de mutações somáticas mitocondriais e com a produção de radicais livres de oxigênio. Assim, no presente estudo, foram analisados pela técnica de seqüenciamento, quatro polimorfismos da região controladora de replicação e transcrição desse genoma (Alça-D) em 45 pacientes submetidos à gastrectomia nos anos de 1999 a 2001 no Hospital Ofir Loyola e no Hospital Universitário João de Barros Barreto e 44 indivíduos, sem histórico de neoplasias, atendidos pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará. O Teste Exato de Fisher, Teste-G, Qui-quadrado e *Odds Ratio* foram utilizados nas análises de associação. Os resultados demonstraram que o polimorfismo C16519T apresentou diferença estatística entre casos e controles, aumentando em 3,2 vezes o risco de desenvolver a neoplasia gástrica. O microssatélite C₅TC₄ da posição 16.189 apresentou um número maior de variantes no grupo de pacientes com tumores gástricos em relação ao grupo controle. Os resultados sugerem que o microssatélite C₇TC₆ na posição 310 pode ser utilizado como biomarcador de tumores em estágios iniciais e sem metástase em linfonodo e que a presença de instabilidade no microssatélite de repetição (CA)_n aumenta o risco de desenvolver tumores em estágios iniciais, sem metástase para os linfonodos e do tipo difuso. Neste trabalho, a faixa mais acometida na população estudada está entre 51 e 60 anos e que tais mutações são evidenciadas a partir da meia idade.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer pode ser entendido como uma massa celular com padrão anormal de proliferação e de crescimento autônomo que tende a invadir tecidos vizinhos e se disseminar por metástase para sítios mais distantes. Essas anormalidades são, geralmente, alterações somáticas que resultam do acúmulo de mutações nos genes de comandam esse sistema (HODGSON & MAHER, 1998).

O câncer constitui um problema de saúde pública mundial. Ele é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo: mais de 7 milhões de pessoas morrem da doença anualmente. Como a expectativa de vida tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará quase 20 milhões em 2020, segundo a União Internacional Contra o Câncer (INCA, 2007).

No cenário mundial, os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon retal (655 mil); e de mama (502 mil). Desse total, no mesmo ano, mais de 70% ocorreram em países de baixa e média renda (INCA, 2007).

No Brasil, para o ano de 2008 e 2009, estimou-se, a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma, foram os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil observado no mundo (INCA, 2007).

O câncer, por ser uma doença crônico-degenerativa, apresenta evolução prolongada e progressiva. Em geral caracteriza-se por longo período de latência, fase assintomática extensa, e envolvimento de múltiplos fatores de risco (MS, 1995).

O surgimento de neoplasias está associado a fatores extrínsecos, como hábitos alimentares, e fatores decorrentes de constituição genética, como

fator hereditário ou acúmulo de mutações de ponto como inserções, deleções e transições (STRATHDEE, 2002; CARNEIRO *et al.*, 1997; ABREU, 1997).

1.2. BASES GENÉTICAS DO CÂNCER

As células, durante a proliferação celular, passam por quatro episódios que, juntos, formam o chamado ciclo celular. Durante este ciclo, a célula passa por vários pontos de checagem, a fim de se eliminar possíveis erros no DNA (GOLUBNTSCHAJA, 2007).

Hanahan & Weinberg, em 2002, sugeriram que o vasto catálogo genotípico das células cancerosas surge de manifestações de seis alterações fundamentais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento maligno (Figura 1).

Oncogenes e Genes Supressores de Tumor estão envolvidos na regulação do ciclo celular e nos pontos de checagem. A ocorrência de mutações em qualquer classe desses genes pode levar a desordens no ciclo natural das células, as quais geralmente acarretam o desenvolvimento do câncer (ELLEGE, 1996; MALUMBRES & CARNERO, 2003; HARTWELL & KASTAN, 1994).

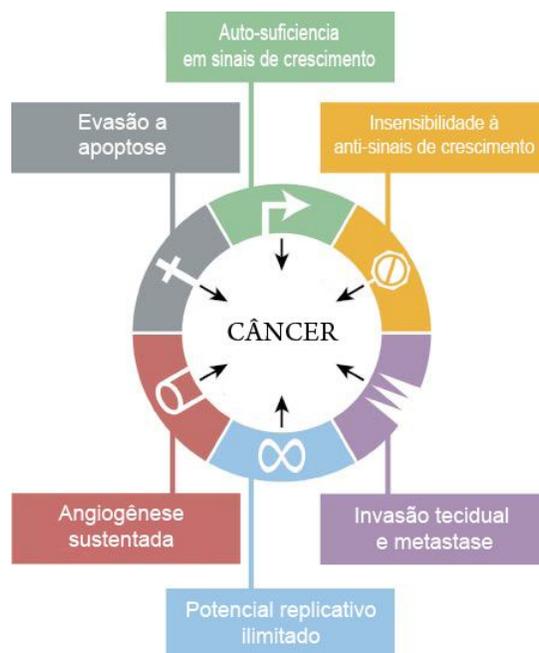


Figura 1. Manifestações de seis alterações fundamentais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento maligno.
Fonte: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2002.

1.2.1. Oncogenes

Oncogenes são alelos mutantes ativados de uma classe de genes celulares normais conhecidos como proto-oncogenes. Apresentam um comportamento dominante na indução ou manutenção da proliferação, ou seja, influenciam positivamente a reprodução celular. Esses genes facilitam a transformação maligna das células por mecanismos como o estímulo ao aumento do suprimento de sangue para o tumor (angiogênese) e a inibição da apoptose (HODGSON & MAHER, 1998).

Os produtos dos oncogenes dividem-se em quatro grupos, de acordo com a função da proteína codificada: fatores de crescimento, a exemplo do fator derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor-PDGF*), codificado pelo gene *c-sis* e o fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor EGF*); receptores de fatores de crescimento, localizados na superfície celular, que promovem ligações entre os sinais estimulatórios de fatores de crescimento e a via de transdução de sinalização celular, como os genes *MET*, *RET* e *KIT*; transdutores intracelulares, divididos em proteínas associadas à membranas ligadoras de guanina – Proteína G (*RAS*, *GSP* e *GIP*), proteínas associadas à membranas com atividade tirosina quinase (*ABL*, *SCR* e *FGR*) e proteínas serina-tirosina quinases (*RAF1*, *MOS*, *COT*); e os fatores de transcrição que incluem os membros da família *MYC* (*c-MYC* e *LMYC*) (HODGSON & MAHER, 1998; ALBERTS *et al.*, 2004; PINTO & FELTZENSWALB, 2003).

O primeiro gene descrito na literatura como proto-oncogene foi o gene *RAS*. Seu produto é uma GTPase monomérica que auxilia na transmissão de sinais provenientes de fatores de crescimento existentes na superfície da célula. Quando mutado, a proteína resultante é mantida em um modo ativo de sinalização, levando a proliferação celular descontrolada (MALUMBRE & CARNERO, 2003).

1.2.2. Genes Supressores de Tumor

A função dos genes supressores de tumor é inibir o crescimento celular, influenciando de maneira negativa a sua proliferação (MALUMBRES & CARNERO, 2003). Esses genes podem ser protetores ou de manutenção. Os protetores são verdadeiros supressores tumorais, uma vez que estão diretamente envolvidos na regulação do ciclo celular ou na inibição da proliferação por contato célula-célula. Os de manutenção estão envolvidos no reparo de danos ao DNA e na manutenção da integridade genômica. A perda ou inativação destes genes pode levar ao aparecimento de neoplasias por meio do acúmulo de mutações secundárias.

Para que ocorra a inativação destes genes, são necessários dois eventos mutacionais, um em cada alelo. Essa teoria dos dois eventos foi desenvolvida por Knudson, em 1971, ao propor uma explicação para a ocorrência de retinoblastoma. Desta forma, os genes supressores de tumor têm efeito recessivo na célula, pois necessitam de duas mutações para que ocorra a perda de função.

Esta perda de função ocorre através de mutações na estrutura do material genômico ou por processos epigenéticos. Dentre as mutações comuns estão as inversões, deleções, mutações pontuais entre outras. Os processos epigenéticos envolvem a hipermetilação do DNA, a qual é transmitida de maneira estável por mitose (MALUMBRES & CARNERO, 2003).

Além do retinoblastoma, outras neoplasias que possuem mutações nesta classe de genes são o tumor de Wilms, meningioma, neurinoma de acústica, neurofibromatose, síndrome de Bloom e câncer colorretal não polipóide hereditário (COOK & MCCAWE, 2000).

Os genes *p53*, *RB*, *APC*, *CDH1*, *BRCA1* e *BRCA2* são exemplos de genes supressores de tumor (TAMURA, 2002).

1.3. O CÂNCER GÁSTRICO

1.3.1. Epidemiologia

O câncer gástrico figura como a quarta causa mais comum de mortalidade e a segunda causa de óbitos por neoplasias no mundo. Apesar dos números elevados, as taxas de mortalidade por câncer de estômago vêm diminuindo progressivamente nos últimos anos. Muitos autores atribuem este declínio a mudanças de hábitos que outrora representavam um aumento no risco de desenvolvimento da doença (HOENBERG & GUSTSCHEL, 2003). Fato inverso ocorre com a taxa de ocorrência da doença que, devido ao diagnóstico precoce, proporciona uma maior sobrevida ao paciente. (PARKIN, 2005).

Parkin e seus colaboradores, em 2005, dividiram os países em áreas de maior (>20 casos por 100.000 habitantes) ou menor risco (<10 casos por 100.000). As áreas de maiores riscos incluem o Leste Asiático (China e Japão), o Oeste Europeu e parte da América Central e Sul. Áreas de menor risco de incidência incluem o Sul da Ásia, Norte e Leste da África, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia.

No Brasil, o câncer de estômago é uma importante causa de morbimortalidade em regiões mais desenvolvidas como o Sul e o Sudeste, assim como naquelas com menor desenvolvimento (MS, 1995). Segundo as estimativas de incidência de câncer, publicadas pelo INCA, foram previstos para o ano de 2010, 13.820 novos casos para o sexo masculino e 7.680 para o sexo feminino, totalizando 21.500 novos casos. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2009).

Para o Estado do Pará, estimou-se 560 novos casos, sendo 310 apenas na sua capital (INCA, 2009). Em 2001, a cidade de Belém foi considerada pela *International Agency for Research on Cancer* – IARC, a décima primeira capital no mundo em registros de caso dessa neoplasia.

1.3.2. Fatores Etiológicos

Estudos epidemiológicos comprovam que há relação entre nutrição e câncer de estômago, indicando como fator de proteção uma dieta composta por legumes frescos e frutas e que a vitamina C e o caroteno diminuem o risco de câncer gástrico (KONO & HIROHATA, 1996; LATORRE, 1997). Alguns trabalhos indicam um efeito protetor de outros antioxidantes, como as vitaminas A e E, sendo que para estes últimos os resultados ainda não são conclusivos (GRAHAM, 1984; RISCH *et al.*, 1985; STEHR *et al.*, 1985; WEISBURGER, 1985; BARTSCH *et al.*, 1988).

Em seu artigo de revisão, Britto (1997) cita que a ingestão de carnes defumadas ou curadas, peixes secos e outros alimentos em conserva, podem levar ao surgimento de câncer gástrico. Nestes alimentos são encontrados os nitritos e nitratos que, quando digeridos, são convertidos em nitrosaminas, conhecidos agentes causadores de câncer. Estes compostos metabólicos inibem a ação antioxidante de vitaminas, principalmente A e C. Logo, propiciam a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA podendo levar a mutações de ponto, alterando genes que possam estar envolvidos no processo de carcinogênese (KONO & HIROHATA, 1996).

Há ainda outros componentes ambientais considerados fatores de risco, como o tabagismo que, segundo estudos prospectivos ocasiona um discreto risco aumentado entre os fumantes (NOMURA *et al.*, 1990; KNELLER *et al.*, 1991); o consumo de bebida alcoólica, uma vez que o álcool é capaz de lesar a mucosa gástrica (GREW & NEUGUT, 2006); e a infecção por *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori é uma bactéria caracterizada como um bacilo gram negativo, espiralado e flagelado que coloniza o estômago e o duodeno de humanos. É classificada como um carcinógeno tipo I em humanos e é considerada o principal agente etiológico de doenças gástricas severas, incluindo úlcera péptica e gastrite ativa crônica que pode evoluir para a gastrite atrófica e para a atrofia gástrica, um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de estômago. Eleva em seis vezes o risco do desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico, devido induzir uma proliferação

celular elevada e danos oxidativos nas células epiteliais gástricas (IARC, 1994; DE LUCA *et al.*, 2004).

Segundo Parkin (2004), a proporção de casos de câncer gástrico atribuíveis a *H. pylori* em países em desenvolvimento, corresponderia a 78% dos casos localizados em porções fora da cárdia. Levando-se em conta estes parâmetros, pode-se afirmar que cerca de 15.000 casos de câncer, do número total estimado para o Brasil em 2006, estariam associados à infecção por este tipo de bactéria (INCA, 2007).

1.3.3. Classificação Histopatológica

O câncer de estômago é classificado por uma patologia morfológicamente heterogênea, resultando em diferentes classificações histopatológicas. Dentre as classificações existentes, destacam-se a de Làuren (1965), a da Sociedade Japonesa de Estudo do Câncer Gástrico (1998) e a da Organização Mundial da Saúde (2001). Tais classificações se baseiam em perfis histológicos, graus de diferenciação, padrões de crescimentos e histogênese (CALDAS *et al.*, 1990).

A classificação de Làuren (1965) divide os tumores gástricos em dois tipos, o intestinal e o difuso. Revela-se útil na avaliação da história natural do câncer gástrico, especialmente ao associar fatores ambientais, a incidência e seus precursores (HAMILTON & AATONEN, 2000). Tal classificação é a predominante nos estudos e por essa razão será adotada para este estudo.

O adenocarcinoma intestinal de Làuren é resultante de um processo de vários estágios (Figura 2). Inicia-se com uma gastrite crônica que se torna atrófica, progride para uma metaplasia intestinal, displasia e por fim para tumor. Este tipo apresenta-se com uma formação glandular similar a mucosa colonial.

Esta formação pode ser de tumores pobremente a altamente diferenciados, os quais crescem com padrão mais expansivo que infiltrativo e maior vascularização. Microscopicamente é bem delimitado, bastante diferenciado, muito vascularizado e com células colunares secretoras de mucina que provocam a formação de glândulas. Neste tipo de câncer, as lesões tendem a ser ulcerativas e são mais comuns no antro e na pequena curvatura. É o tipo predominante, principalmente, em áreas onde a neoplasia é

epidêmica, o que sugere uma etiologia preponderantemente ambiental e é mais freqüente em homens e em pessoas idosas (NARDONE, 2002).

O adenocarcinoma do tipo difuso de L Lauren (Figura 3) tipicamente não surge de lesões pré-cancerosas. Seu diagnóstico é mais fácil por apresentar lesões que não formam uma massa exofítica visível macroscopicamente (CALDAS *et al.*, 1999). Não apresenta, microscopicamente, limites definidos, havendo um espalhamento submucoso extensivo que favorece o aparecimento de metástases precoces. Suas células são pouco coesas, difusamente infiltradas no estroma gástrico, com pouca ou nenhuma formação glandular. As células apresentam-se geralmente redondas e pequenas, do tipo anel de sinete, organizadas como células únicas ou em pequenas tiras de células (HAMILTON & AATONEN, 2000). Este tipo histológico apresenta uma taxa mitótica mais baixa quando comparado com o tipo intestinal.

O tipo difuso é mais freqüente em áreas onde a neoplasia gástrica é endêmica, acometendo principalmente mulheres e indivíduos com idade inferior a 50 anos. Apresenta uma grande associação com histórico familiar, sugerindo uma etiologia predominantemente genética (NARDONE, 2003).

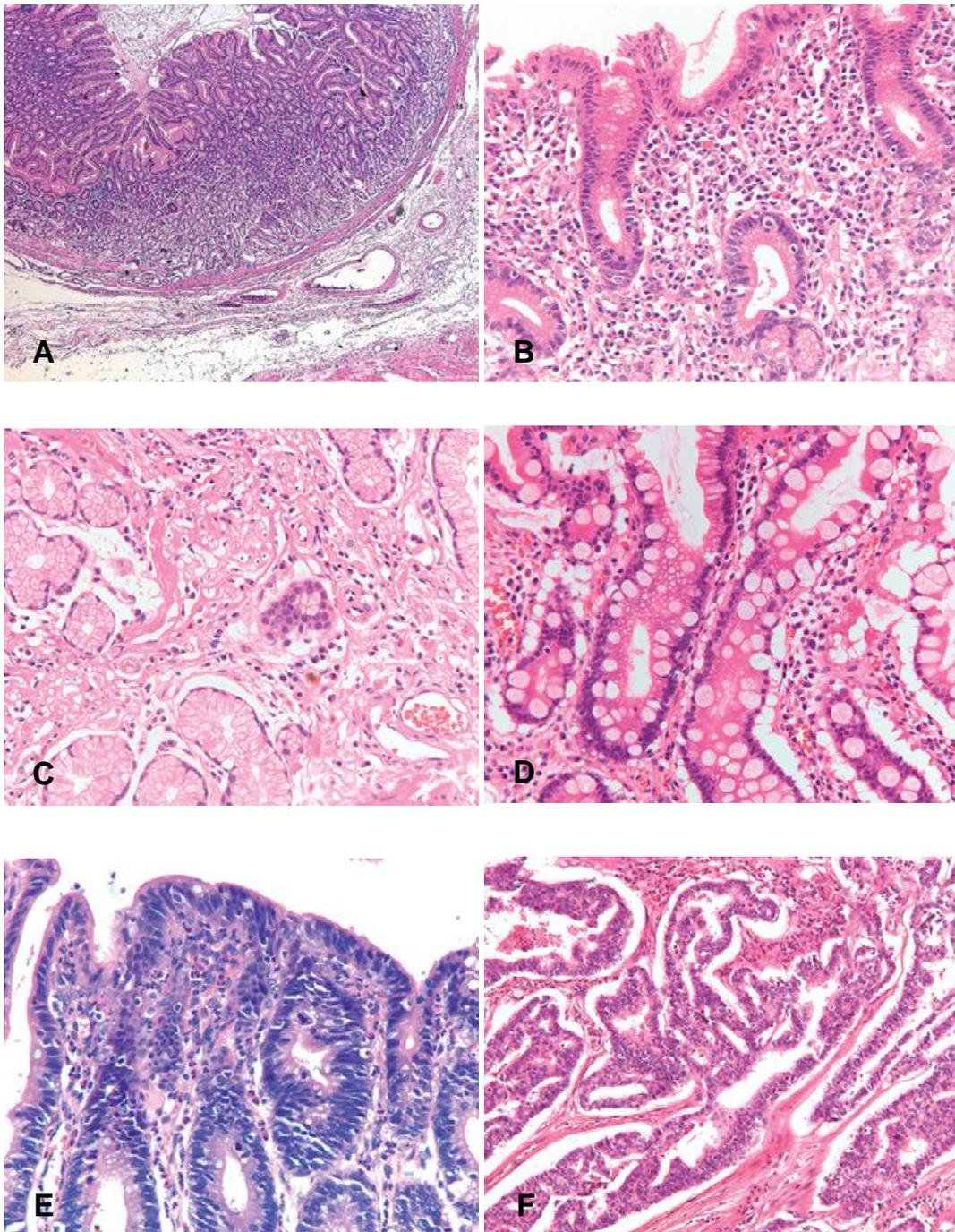


Figura 2. Estágios de desenvolvimento de tumores do tipo intestinal. (A) Mucosa normal. (B) Gastrite Crônica. (C) Mucosa atrófica. (D) Metaplasia Intestinal. (E) Displasia. (F) Adenocarcinoma do tipo intestinal. Fonte: HARTGRINK *et al.*, 2009.

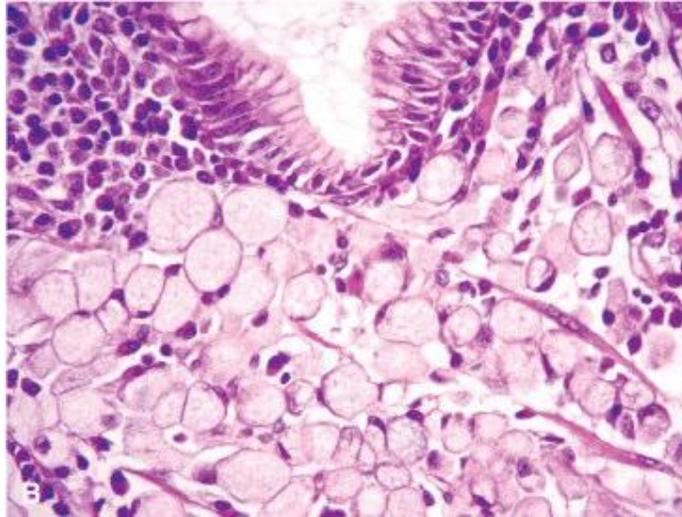


Figura 3. Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso.
Fonte: CARNEIRO, 2007

Existem ainda tumores que apresentam quantidades iguais de componentes do tipo difuso e do tipo intestinal. Estes tumores são chamados de carcinomas mistos. Outros estão demasiadamente indiferenciados e são chamados de indeterminados (HAMILTON & AATONEN, 2000).

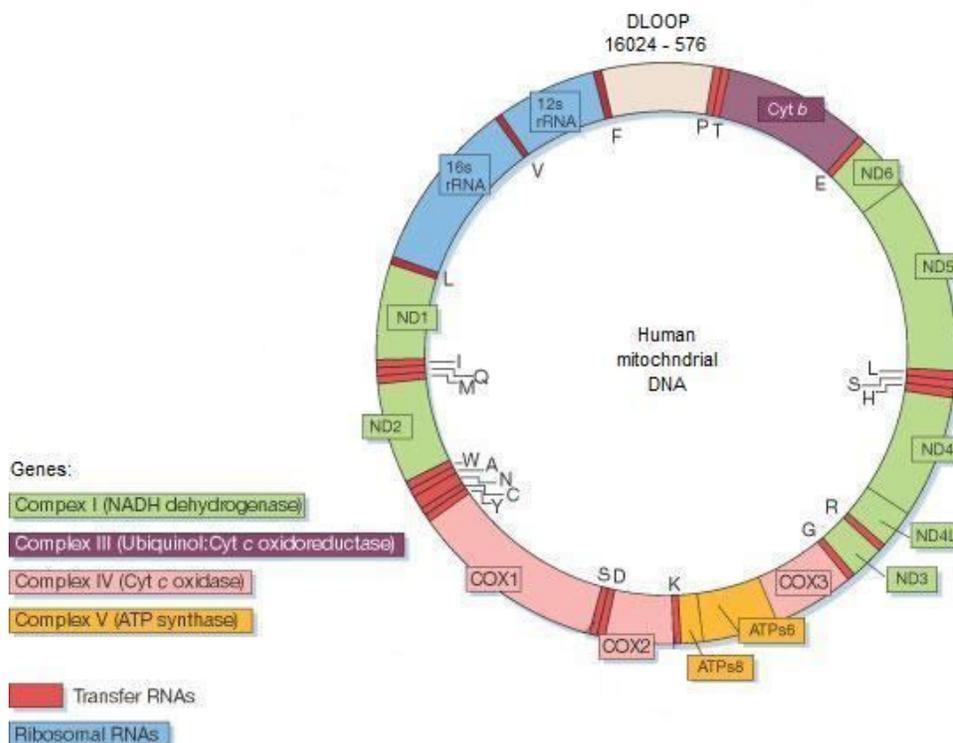
1.4. O DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial é um genoma formado por uma dupla fita circular, fechada, localizada na matriz das mitocôndrias, com 16.569 pb (Figura 4). Sua seqüência genômica foi primeiramente descrita em 1981 por Anderson e colaboradores. O genoma codifica 22tRNAs, 2 rRNAs e 13 proteínas envolvidas na cadeia de transferência de elétrons presentes na fase de fosforilação oxidativa mitocondrial e na produção de ATP e se faz presente com um alto número de cópias (10^3 a 10^4) por célula.

Estudos anteriores mostram que o DNA mitocondrial está intimamente relacionado ao desenvolvimento e a progressão do câncer gástrico em vários tipos de tecidos. Essa correlação é explicada por este ser extremamente propenso a sofrer mutações. Sua taxa mutacional é de dez a cem vezes maior do que o DNA nuclear, devido uma série de causas, dentre elas, o fato em que a organela gera uma grande quantidade de espécies

reativas de oxigênio, produzidas durante sua fase de fosforilação oxidativa (COPELAND *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2005; POLYAK *et al.*, 1998; FLISS *et al.*, 2000; JERONIMO *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001; KIRCHES *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2001; MÁXIMO *et al.*, 2001; PARRELLA *et al.*, 2001)..

A ausência de histonas no DNA mitocondrial é outro fator importante, uma vez que, essas proteínas exercem um papel protetor para o genoma (YAKES & VAN HOUTEN, 1997). Também, deve-se levar em consideração a baixa atividade corretora da enzima DNA polimerase mitocondrial quando comparada a enzima do DNA nuclear (KUNKEL & LOEB, 1981) e ainda, a reparação ineficiente do genoma dependente de excisão de nucleotídeos (CROTEAU *et al.*, 1999).



se adivhases o que eu to fazendo te 10 reais

Figura 4. Mapa do genoma mitocondrial humano. Estão listados os genes para os RNAs ribossomais 12S e 16S, subunidades do complexo NADH-coenzima Q oxidoreductase (ND), complexo citocromo C oxidase (CO), citocromo b (Cyt B), ATPase, 22tRNAs. Os polipeptídeos são constituintes dos complexos da cadeia respiratória: 7 subunidades do complexo I (NADH desidrogenase), 1 subunidade do complexo III (ubiquinol: oxidoreductase citocromo c), 3 subunidades do complexo IV (citocromo c oxidase) e 2 subunidades do complexo V (ATP sintase).

Fonte: Adaptado de MAECHLER & WOLLHEIM, 2001.

1.4.1. A Região Controle

O genoma das mitocôndrias apresenta uma porção não codificante denominada região controle ou Alça-D (*D LOOP*), com 1.122 pb e está compreendida entre as posições 16024 e 576 (NCBI Reference Sequence: NC_001807.4). Essa região contém seqüências importantes para funções mitocondriais fundamentais, como: (i) a origem de replicação da fita H; (ii) origem da transcrição das duas fitas, H e L; (iii) e os sítios de ligação dos fatores transcricionais. Além disso, a região *D LOOP* apresenta uma taxa de substituição nucleotídica maior do que o genoma nuclear e duas regiões hipervariáveis denominadas HVI e HVII (Figura 5), consideradas *hotspots* (ANDERSON *et al.*, 1981; RUIZ-PESINI *et al.*, 2007).

Acredita-se que as mutações somáticas ocorrentes na região *D LOOP* estão relacionadas com a diminuição do número de cópias do DNA mitocondrial. Além disso, há um crescente número de evidências que correlacionam a presença de mutações no DNA mitocondrial com características clinicopatológicas malignas ou mau prognóstico da neoplasia gástrica (MATSUYAMA *et al.*, 2003; LIEVRE *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; TSENG *et al.*, 2006).

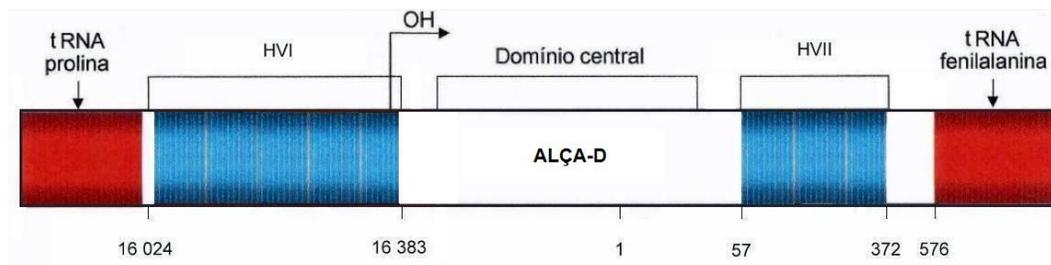


Figura 5. Diagrama da região controle mostrando o flaqueamento dos genes tRNA_{pro} e tRNA_{phe} e a localização das regiões hipervariáveis HVI e HVII.
Fonte: Adaptado de PINHEIRO, 2003.

1.4.2. Polimorfismos do DNA mitocondrial

Dentre os polimorfismos mais freqüentes descritos na literatura, 4 situados na região controle do DNA mitocondrial serão analisados no presente estudo, dentre eles, 3 microssatélites altamente instáveis, 16189T, 310T e a repetição dinucleotídica (CA)_n entre as posições 514 e 523 e um SNP caracterizado pela transição de um resíduo de citosina por um resíduo de timina na posição 16519.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo geral contribuir para o conhecimento dos fatores genéticos que aumentam o risco de desenvolvimento do câncer gástrico, investigando polimorfismos presentes na região controle do DNA mitocondrial.

1.5.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar as alterações nucleotídicas na região controladora do DNA mitocondrial em tecidos neoplásicos e amostras controle na população paraense;
- b) Verificar a associação dos dados das alterações nessa região com características histopatológicas, idade e sexo dos pacientes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

Para este estudo foram utilizadas 44 amostras de sangue coletadas de indivíduos sem histórico aparente de neoplasias, atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, compondo o grupo controle.

As amostras de pacientes com adenocarcinoma gástrico (n= 45), utilizadas para o desenvolvimento do presente estudo, foram obtidas no Hospital Ofir Loyola, órgão de referência em oncologia no Estado do Pará e no Hospital Universitário João de Barros Barreto, no período de 1999 a 2001.

De cada paciente tecidos da mucosa tumoral, foram coletados, acondicionados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido. O diagnóstico histopatológico fora realizado pela equipe de médicos patologistas de ambos os hospitais, seguindo a classificação de Lauren (1965), com o objetivo de minimizar a contaminação do fragmento tumoral com células normais ou ainda de células tumorais e inflamatórias nos fragmentos de tecido.

Os pacientes e/ou responsáveis foram devidamente esclarecidos sobre o estudo e, posteriormente, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I), autorizando o uso das amostras biológicas para esse fim. No termo também foram informados dados importantes como idade, histórico de neoplasias familiar, ocupação profissional e hábitos alimentares, de tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico, aproximadamente 150µL de sangue (grupo controle) e 20mg de tecido não tumoral e tumoral (casos de neoplasia), foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5mL, adicionados de 300µL de tampão de homogeneização, 300µL de tampão de lise, 20µL de Proteinase K (10mg/mL), misturados por inversão por 10 minutos e incubados em banho-maria por 30 minutos a 55°C, agitado-os delicadamente a cada 10 minutos e posteriormente deixados esfriar a temperatura ambiente.

Para a precipitação de proteínas, foram adicionados 700µL de fenol-clorofórmio (1:1), misturados por inversão por 10 minutos e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. Após esta etapa, transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo, onde adicionou-se 700µL de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) para desproteíntização das amostras. A presença de clorofórmio desnatura as proteínas e o álcool isoamil evita a formação de espuma e auxilia no separo e na manutenção da estabilidade das camadas do centrifugado. Mais uma vez, misturou-se por inversão por 10 minutos e centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm.

Ao sobrenadante, já transferido para outro microtubo, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio (3M; pH 4.8) para a precipitação do DNA. Após suave homogeneização, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm, descartou-se o álcool, adicionou-se 200µL de Etanol a 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 14.000 rpm. Depois de descartado o álcool, as amostras foram levadas a estufa, a uma temperatura de 37°C, por 5 minutos, para secagem. Por fim, o DNA foi eluído em 20µL de tampão TE (pH 8.0) e visualizado em gel de agarose a 1,0% para quantificação. Esse processo de extração foi descrito por Sambrook e colaboradores em 1989.

2.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Após a extração do DNA, foi realizada a amplificação da alça-D com o uso de iniciadores (*primers*), cujas seqüências encontram-se descritas na tabela 1.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: (1) Reação contendo 0,05 mM de dNTP; tampão de reação 1x (10x = KCL 500mM, 200mM Tris-HCL, pH 4.8); 1,5mM de MgCl₂, aproximadamente 100ng de DNA total, 10pM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase; (2) Amplificação com 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores utilizados para a reação de amplificação

Iniciador	Seqüência
DL218 (Forward)	CACCATTAGCACCCAAAGCT
DL2 (Reverse)	AAGGGCTAGGACCAAACCT

Para verificar a eficiência da amplificação, 3 μ L do produto da PCR acrescido de 3 μ L de corante de visualização (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromo fenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5M), foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose high melting a 1,0% corado com 1 μ L de brometo de etídio (0,2 mg/mL), usando um marcador de peso molecular de 1kb (12,5 μ g). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma corrente de 100 V, por aproximadamente 20 minutos, posteriormente visualizado através de luz ultravioleta.

2.4. SEQUENCIAMENTO DO DNA

O produto da PCR, purificado com kit “EZ-10, Spin Column PCR Purification Kit” de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, foi submetido a seqüenciamento, empregando o método de terminação de cadeia, descrito por Sanger e colaboradores (1977). A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o Kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems)* e os iniciadores apresentados na tabela 2. As amostras foram submetidas a 25 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos, a temperatura foi estabilizada em 4°C.

Ao termino da reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol a 65%.

Os precipitados foram entregues ao serviço de seqüenciamento nucleotídico do Instituto de Ciências Biológicas que utiliza o aparelho ABI 3130.

Tabela 2. Seqüências dos iniciadores utilizados para a reação de seqüenciamento

Iniciador	Seqüência
DL218 (Forward)	CACCATTAGCACCCAAAGCT
DL2 (Reverse)	AAGGGCTAGGACCAAACCT
DLF16236 (Forward)	CGTACATAGCACATTACAGT
DLR16434 (Reverse)	GAGTGCTACTCTCCTCGCT

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de significância estatística foi realizada usando os testes de Qui Quadrado, Teste G e Exato de Fisher para avaliar as associações das alterações nucleotídicas com idade, sexo e dados histopatológicos dos pacientes e cálculo de *Odds Ratio*, para avaliar os riscos, no programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2008). Para tanto foi realizado teste unilateral, e valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

No presente estudo, o número amostral investigado no grupo controle compreendeu 18 indivíduos do sexo masculino (40,9%) e 26 indivíduos do sexo feminino (59,1%). Dentre o grupo de casos, foram estudados 35 indivíduos do sexo masculino (77,8%) e 10 indivíduos do sexo feminino (22,2%), revelando uma prevalência de homens acometidos por câncer gástrico em relação às mulheres, em uma proporção de 3,5:1.

Esta proporção é similar à relatada por outros autores (LANDIS *et al.* 1998; SELPULVEDA *et al.* 1999; KELLEY & DUGGAN, 2003) em diferentes populações, confirmando a prevalência da neoplasia gástrica entre pacientes do sexo masculino. Entretanto, Kelley e Duggan (2003), em sua revisão epidemiológica, observaram proporções inferiores em populações com alta prevalência de câncer gástrico, como em coreanos (2,6:1) japoneses (2,4:1) colombianos (1,7:1) e costa riquenhos (2,3:1). Estes dados revelam um grau de heterogeneidade razoável quanto à prevalência sexual da doença.

Nogan & Yoshimura (2003), afirmam que indivíduos do sexo masculino desenvolvem mais atividades profissionais que os expõe mais frequentemente a carcinógenos em comparação ao sexo feminino, esta seria uma possível razão para explicar tal desvio quanto ao gênero sexual.

A faixa etária do grupo controle variou de 30 a 80 anos, com uma média de 52 anos, enquanto que no grupo de casos, variou de 33 a 77 anos, com uma média de 58,5 anos, sendo que a faixa mais acometida nessa população está entre 51 e 60 anos (Figura 6). A média de idade de indivíduos do sexo masculino acometidos por essa neoplasia foi de 58,6 anos, do sexo feminino foi de 58,1 anos.

No grupo controle, 28 indivíduos (63,6%) possuem idades inferiores a 60 anos e 16 (36,4%) pertencem a faixa etária considerada idosa, com idade igual ou superior a 60 anos. Para o grupo de casos, 26 indivíduos (57,8%) possuem idades inferiores a 60 anos e 19 (42,2%) igual ou superior a 60 (Figura 7), sendo essa diferença não significativa ($p=0,1551$; $\chi^2=2,64$).

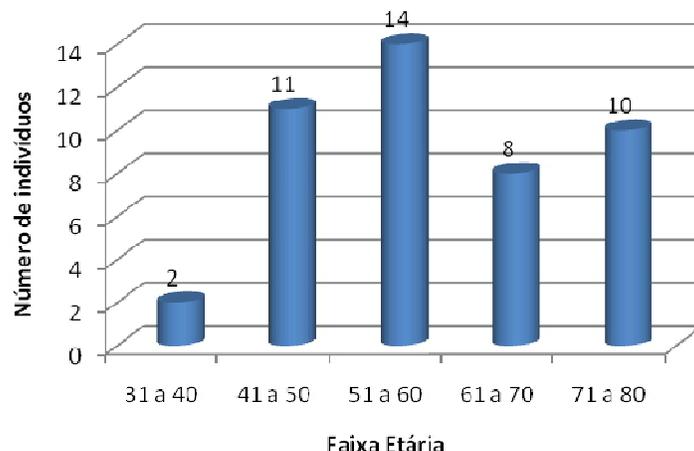


Figura 6. Distribuição da faixa etária dos indivíduos do grupo de casos analisados no presente estudo.

De acordo com a classificação de Laurèn (1965), dos 45 tumores gástricos analisados, 21 (46,7%) são do tipo difuso e 24 (53,3%) do tipo intestinal. Quanto a localização, 35 estavam situados no Antro (77,8%) e 10 no Corpo (22,2%).

As freqüências do estadiamento tumoral foram analisadas considerando-se: 1) Invasão da parede do órgão (T), sendo T_{is} , T_1 e T_2 classificados como tumores precoces e, T_3 e T_4 como avançados; 2) Comprometimento linfonodal por metástases (N), dividido em dois grupos N_0 e N_n (N_1 , N_2 e N_3). A análise com a presença de metástase em tecidos vizinhos não foi avaliada devido ao número reduzido de laudos contendo essa informação. O estadiamento TNM está presente no Anexo II.

Das amostras analisadas, 11 (24,44%) foram consideradas precoces e 34 (75,56%) avançadas. Doze indivíduos (26,7%) não apresentaram comprometimento linfonodal (N_0) e 33 (73,3%) se enquadraram em algum estágio de N_n .

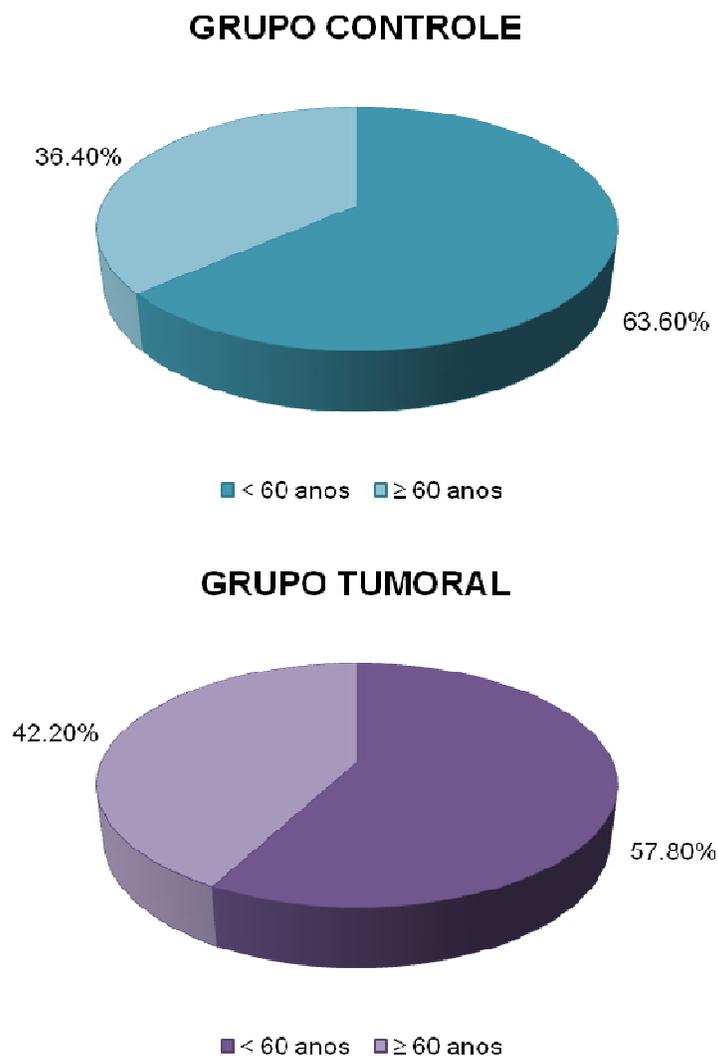


Figura 7. Representação gráfica apresentando a porcentagem de pacientes idosos em ambos os grupos deste estudo.

Rinnovati *et al.* (2001) afirmaram que maioria dos pacientes com câncer gástrico no ocidente são diagnosticados em estádios mais avançados da doença, o que explica a baixa taxa de ressecabilidade e uma sobrevida baixa, contrapondo-se a Mäkelä *et al.* (2000) que afirmam que em japoneses a sobrevida de 5 anos é superior a 50%.

Collucia *et al.* (1987) relataram 89,2% dos tumores como sendo estágio T₃ e T₄, determinando um pequeno percentual de operações curativas.

Essa informação condiz com o presente estudo que mostrou 75,56% dos pacientes nos estádios T₃ e T₄.

A metástase linfonodal é um fator crítico no prognóstico do câncer gástrico e pacientes com envolvimento nodal têm um curso clínico desfavorável. Extensa dissecação linfonodal tem sido recomendada sendo baseada em estudos de drenagem linfática e disseminação linfática de células tumorais (EGUCHI *et al.* 2000).

A neoplasia gástrica é uma das principais causas de morte por doença maligna no mundo e a ressecção cirúrgica é o único tratamento que pode oferecer cura para os pacientes com essa patologia (MELLO & CORREIA, 1999).

3.2. POLIMORFISMOS DA ALÇA-D

A alça-D contém o sítio de replicação da cadeia pesada (H) e os promotores de transcrição das cadeias pesada e leve (H e L) (ZHAO *et al.* 2005; FERNÁNDEZ-SILVA *et al.* 2003). Inúmeros trabalhos sugerem que mutações somáticas nessa região, associadas a outros fatores genéticos e ambientais, desencadeiem o processo da carcinogênese (BIRCH-MACHIN 2005; KANG 2005; KOSE *et al.* 2005; PETROS *et al.* 2005).

Em tumores esofágicos, freqüências gerais de mutações variando de 35 a 40% foram relatadas (MIYAZONO *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2005). Wu *et al.* (2005) relataram uma taxa de mutações somáticas de 48% em adenocarcinomas gástricos.

Porém, apenas dois trabalhos da literatura abordaram a relação das alterações polimórficas da alça-D com as características histopatológicas do adenocarcinoma gástrico. Em ambos os casos, as alterações encontradas, incluindo as estudadas no presente trabalho, foram agrupadas em uma única categoria (presença de mutação), não tendo sido observada correlação estatisticamente significativa entre estas e as características analisadas (WU *et al.*, 2005; HUNG *et al.*, 2008). No entanto, os polimorfismos analisados neste estudo tem sido investigados em outros tipos de câncer.

3.2.1. Polimorfismo C16516T

A forma polimórfica 16519T e o alelo selvagem 16519C (Figura 8) tiveram freqüências iguais a 31,8% e 68,2% no grupo controle e 62,2% e 37,8% no grupo de casos, respectivamente, sendo a diferença observada estatisticamente significativa ($p=0,0078$; $\chi^2=8,252$).

Não foram observadas diferenças significantes entre as formas alélicas e as características histopatológicas analisadas (Tabela 3).

Para verificar a influência das formas polimórficas nos indivíduos do grupo tumoral sobre os indivíduos do grupo controle, o teste de *Odds Ratio* indicou que no grupo de casos, indivíduos que possuem o alelo polimórfico têm 3,52 vezes mais chances de desenvolver tumores gástricos e quando do sexo masculino, essa chance é aumentada em 1,9 vezes em relação ao sexo feminino.

O teste também revelou que, no grupo de casos, indivíduos com o alelo 16.519T possuem um risco de 3,5 vezes mais para desenvolver tumores com estadiamento em T_{is}, T₁ e T₂ e 2,2 vezes para tumores que não causam metástase para linfonodos regionais.

Recentemente, Bai *et al.* (2007) reportaram que o polimorfismo C16519T na região da alça-D, está associado ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (OR: 1,98; IC 95%, 1,25-3,12) em um estudo do tipo caso-controle.

Navaglia *et al.* (2006), em um estudo de 246 pacientes americanos, obtiveram associação significativa entre o alelo T e a presença de *diabetes mellitus* e câncer pancreático ($p<0,05$; $\chi^2=4,70$), sugerindo assim que os pacientes com alelo 16519T, estão em maior risco de desenvolver diabetes e têm uma menor sobrevida, possivelmente por que esta variação altera a função mitocondrial. A presença deste alelo pode causar não só uma predisposição para a disfunção metabólica celular, mas também uma resposta alterada das células ao estresse oxidativo, fazendo com que as células tumorais se tornem mais resistentes à apoptose.

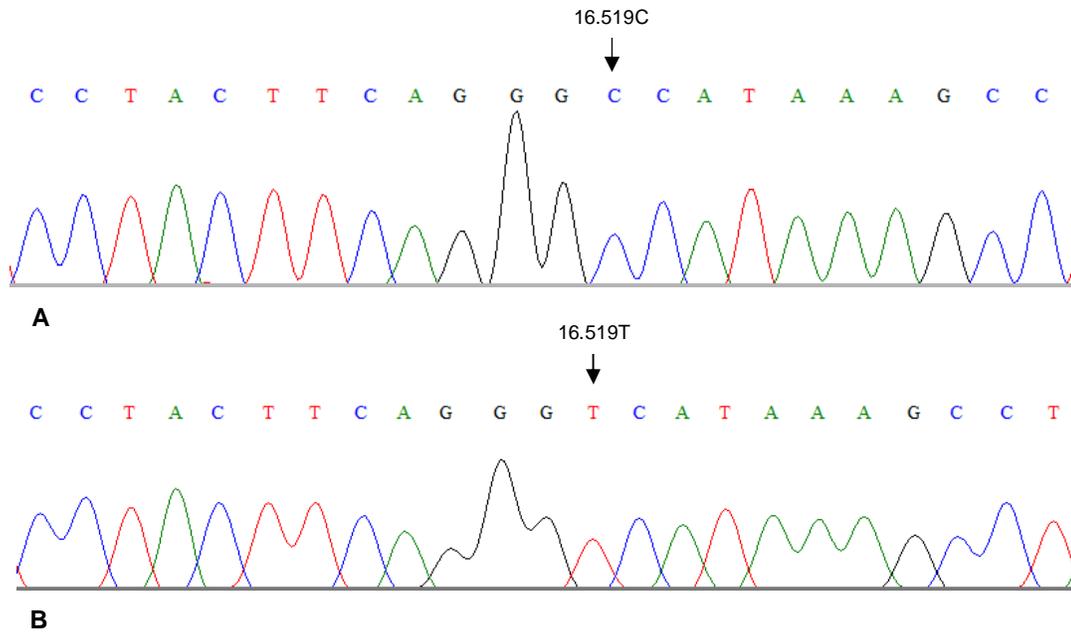


Figura 8. Eletroferogramas de seqüências de mtDNA mostrando as duas formas polimórficas do SNP C16516T (A) alelo normal C (B) alelo mutante T.

Tabela 3. Frequências dos alelos do polimorfismo C16519T para cada característica clínico-patológica

Característica	Alelo C n (%)	Alelo T n (%)	P valor	OR (IC 95%)
Sexo				
Masculino	12 (26,60%)	23 (51,10%)	0,593	1,91 (0,46-7,95)
Feminino	05 (11,10%)	05 (11,10%)		
Idade				
< 60	09 (20,00%)	17 (37,8%)	0,841	1,37 (0,40-4,64)
≥ 60	08 (17,80%)	11 (24,50%)		
Histopatológico				
Difuso	11 (24,40%)	10 (22,20%)	0,113	0,30 (0,08-1,06)
Intestinal	06 (13,30%)	18 (40,00%)		
Localização				
Antro	13 (28,90%)	22 (48,90%)	0,0,837	1,12 (0,26-4,7)
Corpo	04 (8,90%)	06 (13,30%)		
Estádio				
T _{1a} , T ₁ , T ₂	02 (4,40%)	09 (20,00%)	0,236	3,5 (0,66-18,96)
T ₃ , T ₄	15 (33,30%)	19 (42,20%)		
Metástase				
Linfonodal				
N ₀	03 (6,70%)	09 (20,00%)	0,472	2,21 (0,50-9,68)
N ₁ , N ₂ , N ₃	14 (31,10%)	19 (42,20%)		

3.2.2. Microssatélite 16189T

O microssatélite compreendido entre as posições 16184 - 16193 (CCCCCTCCCC – C₅TC₄) da região da alça-D, foi a região em que mais se verificou a presença de alelos mutantes na população estudada. A frequência de alelos selvagens foi igual a 63,7% dentre os indivíduos do grupo controle e 51,1% para o grupo tumoral.

Neste estudo foram encontradas 6 tipos de seqüências variantes, C₃TC₆, C₁₁ e C₁₂ (Figura 9) que tiveram frequências iguais a 22,7%, 4,5%, 9,1%, respectivamente para o grupo controle e C₃TC₆, C₉TC₆, C₁₀, C₁₁, C₁₂ e C₁₃, com frequências iguais a 11,1%, 2,2%, 8,9%, 6,6%, 8,9% e 11,1%, respectivamente para o grupo de casos, sendo essas diferenças não estatisticamente significantes. As variantes C₉TC₆, C₁₀ e C₁₃ só foram observadas no grupo de casos.

Liu *et al.* (2003) detectaram uma frequência de 14% (7/50) deste polimorfismo em indivíduos com carcinoma endometrial de Hong Kong. Kirches *et al.* (2001), em estudos com pacientes com glioblastomas multiformes, encontraram uma frequência de 23% (4/17), com 8 formas alélicas (C₇-C₁₄). Sharma (2005), observou esta instabilidade em apenas 1 de 19 indivíduos em seu estudo com câncer cervical.

A maioria das análises de associações entre os genótipos e as diversas características histopatológicas não apresentou diferenças significativas, exceto quanto aos tipos histológicos tumorais, onde para o câncer do tipo difuso, em pacientes com o alelo C₃TC₆, a diferença revelou-se estatisticamente significativa em relação ao tipo intestinal ($p=0,03$; Teste-G: 4,7118). Para a localização do tumor, a diferença encontrada foi significativa ($p=0,0384$; $\chi^2=5,562$) apresentando um risco de aumentado de 4,45 vezes em desenvolver tumores localizados no antro (Tabela 4).

Outro risco considerável para este polimorfismo, foi de 1,96 vezes de indivíduos da população desenvolverem tumores com estadiamento em T_{is}, T₁ e T₂ e 2,4 vezes para tumores sem metástase em linfonodos.

Yoneyama *et al.* (2005) encontraram, em 77% de linhagens de tumor de fígado e 20% de tumor de estômago, substituições de T para C na posição 16.189, um número superior aos do presente estudo.

Tabela 4. Frequências dos alelos do polimorfismo 16.189T para cada característica clínico-patológica

Característica	C ₅ TC ₄ n (%)	C ₃ TC ₆ n (%)	C ₉ TC n (%)	C ₁₀ -C ₁₃ n (%)	P valor	OR (IC 95%)
Sexo						
Masculino	11 (24,40%)	02 (4,40%)	01 (2,20%)	07 (15,50%)	0,71	1,1 (0,17-6,75)
Feminino	03 (6,70%)	0 (0%)	0 (0%)	03 (6,70%)		
Idade						
<60	14 (31,10%)	02 (4,40%)	0 (0%)	10 (22,20%)	0,89	1,29 (0,39-4,24)
≥60	09 (20,0%)	03 (6,70%)	01 (2,20%)	06 (13,3%)		
Histopatológico						
Difuso	09 (20,0%)	05 (11,10%)	01 (2,20%)	06 (13,3%)	0,53	0,53 (0,16-1,75)
Intestinal	14 (31,10%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (22,20%)		
Localização						
Antro	19 (42,20%)	0 (0%)	01 (2,20%)	15 (33,30%)	0,03	4,45 (1,22-16,14)
Corpo	04 (8,90%)	05 (11,10%)	0 (0%)	10 (22,20%)		
Estádio						
T ₀ , T ₁ , T ₂	07 (15,50%)	0 (0%)	01 (2,20%)	03 (6,70%)	0,05	1,96 (0,48-7,99)
T ₃ , T ₄	16 (35,50%)	05 (11,10%)	0 (0%)	13 (28,90%)		
Metástase						
Linfonodal						
N ₀	08 (17,80%)	0 (0%)	01 (2,20%)	03 (6,70%)	0,35	2,4 (0,60-9,55)
N ₁ , N ₂ , N ₃	15 (33,30%)	05 (11,10%)	0 (0%)	13 (28,90%)		

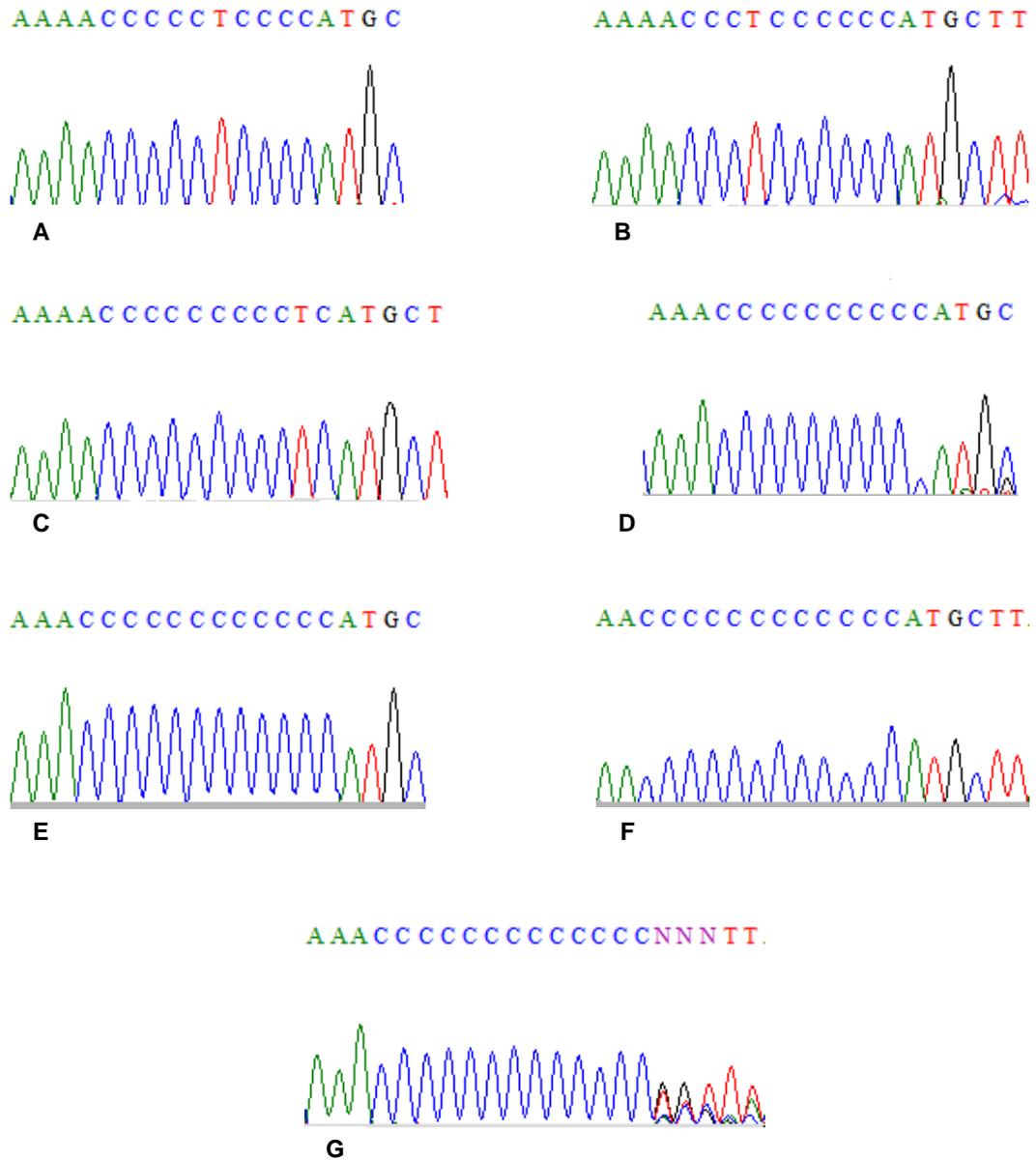


Figura 9. Eletroferogramas com seqüências de mtDNA das 7 formas alélicas encontradas no grupo tumoral para o polimorfismo 16189T. (A) alelo selvagem C₅TC₄ (B) alelo C₃TC₆ (C) alelo C₉TC (D) alelo C₁₀ (E) alelo C₁₁ (F) alelo C₁₂ (G) alelo C₁₃.

3.2.3. Microssatélite 310T

A frequência do alelo selvagem do microssatélite compreendido entre as regiões 303 - 315 (CCCCCCTCCCCC - C₇TC₆) da região controle mitocondrial, foi igual a 56,8% dentre os indivíduos do grupo controle e 64,4% para o grupo tumoral.

No grupo controle foi encontrado apenas um alelo diferente do selvagem, denominado C₈TC₆ em 43,2% dos indivíduos. No grupo de casos, três seqüências variantes foram encontradas, C₈TC₆, C₉TC₆ e C₁₅ (Figura 10), com as frequências 26,7%, 6,7% e 2,2%, respectivamente, sendo essas diferenças não significantes estatisticamente.

Habano *et al.* (1998), os primeiros a investigar esse polimorfismo no cenário mundial, descreveram essa instabilidade em 20% dos pacientes analisados em seu estudo com câncer colorretal. Sharma (2005), observou em 11 de 19 indivíduos com câncer cervical a transição do nucleotídeo T na posição 310 para C.

Máximo *et al.* (2005) encontraram em 4 de 59 pacientes (6,1%) com tumor na tireóide, o alelo C₆TC₆. No presente estudo, este alelo não foi encontrado na amostra populacional.

Em relação às características histopatológicas, apenas as associações com o estadiamento tumoral mostraram significância estatística na população estudada, pois para o estadiamento T_{is}, T₁ e T₂ em relação a T₃ e T₄, o valor de p obtido foi de 0,0341 e para tumores que não causam metástase para linfonodos regionais (N₀) em relação aos que causam (N₁, N₂ e N₃) com o p igual a 0,0099 (Tabela 5).

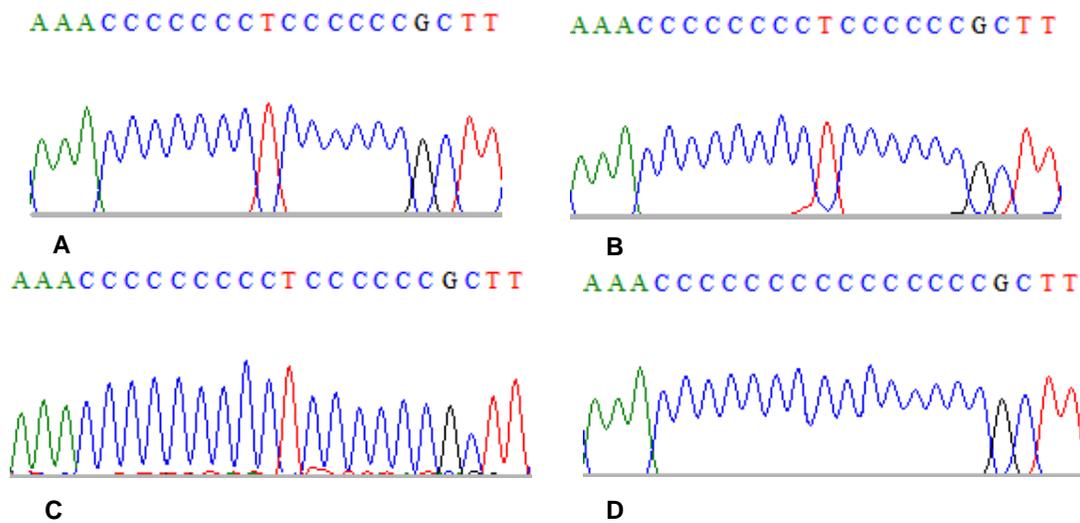


Figura 10. Eletroferogramas com seqüências de mtDNA do grupo tumoral mostrando as 4 formas alélicas encontradas para o polimorfismo 310T (A) alelo selvagem C₇TC₆ (B) alelo C₈TC₆ (C) alelo C₉TC₆ (D) alelo C₁₅.

Tabela 5. Freqüências dos alelos do polimorfismo 310T para cada característica clínico-patológica

Característica	C ₇ TC ₆ n (%)	C ₈ TC ₆ n (%)	C ₉ TC ₆ n (%)	C ₁₅ n (%)	P valor	OR (IC 95%)
Sexo						
Masculino	21 (46,70%)	10 (22,20%)	03 (6,70%)	01 (2,20%)	0,429	0,37 (0,06-2,03)
Feminino	08 (17,80%)	02 (4,40%)	0 (0%)	0 (0%)		
Idade						
<60	15 (33,30%)	08 (17,80%)	02 (4,40%)	01 (2,20%)	0,428	0,48 (0,13-1,75)
≥60	14 (31,10%)	04 (8,90%)	01 (2,20%)	0 (0%)		
Histopatológico						
Difuso	13 (28,90%)	06 (13,30%)	01 (2,20%)	01 (2,20%)	0,983	0,81 (0,23-2,76)
Intestinal	16 (35,50%)	06 (13,30%)	02 (4,40%)	0 (0%)		
Localização						
Antro	23 (51,10%)	09 (20,0%)	02 (4,40%)	01 (2,20%)	0,966	1,27 (0,30-5,41)
Corpo	06 (13,3%)	03 (6,70%)	01 (2,20%)	0 (0%)		
Estádio						
T _{1s} , T ₁ , T ₂	05 (11,10%)	06 (13,30%)	0 (0%)	0 (0%)	0,034	0,34 (0,08-1,40)
T ₃ , T ₄	24 (53,30%)	06 (13,30%)				
Metástase						
Linfonodal						
N ₀	05 (11,10%)	07 (15,50%)	0 (0%)	0 (0%)	0,009	0,26 (0,06-1,06)
N ₁ , N ₂ , N ₃	24 (53,30%)	05 (11,10%)	03 (6,70%)	01 (2,20%)		

3.2.4. Repetição dinucleotídica (CA)_n na posição 514-523

Dentre as 45 amostras tumorais e 44 amostras controles, foram verificados quatro alelos polimórficos para o microsatélite de repetição 514-523 (CA)_n: (CA)₅ (alelo selvagem), (CA)₄, (CA)₆ e (CA)₇ (Figura 11). Os mais freqüentes foram (CA)₅ com 40% no grupo tumoral e 61,4% no grupo controle e (CA)₄ com 55,6% dentre os casos e 38,6% dentre a população controle. As freqüências dos alelos de repetição (CA)₆ e (CA)₇ foram baixas, 4,4% em casos e nenhum encontrado no grupo controle, e portanto, neste estudo, esses alelos foram agrupados em um grupo denominado (CA)₆₋₇ nas análises. As diferenças entre freqüências dos grupos de casos e controles não foram estatisticamente significantes, porém estão próximas do índice de significância ($p=0,0713$; $\chi^2=4,062$).

As associações das formas alélicas e as características histopatológicas não apresentaram diferenças significativas (Tabela 6). Porém, verificou-se, pelo teste de *Odds Ratio*, um risco de 2,6 vezes maior de indivíduos com o alelo (CA)₅ em desenvolver tumor do tipo difuso, um risco de 4,5 vezes maior de indivíduos com alelos (CA)₄ em desenvolverem tumores com estadiamento em T_{is}, T₁ e T₂ e por fim, um risco de 3,18 vezes mais de indivíduos com o alelo (CA)₄ para tumores que não causam metástase em linfonodos.

Ye *et al.* (2008) encontraram um total de oito alelos de repetição (CA)_n, onde o “n” variou de 4 a 11, em mulheres chinesas com câncer de mama, onde os mais freqüentes foram (CA)₅ com 52% e (CA)₄ com 41,5% dentre o número de casos. Assim como na nossa população, alelos com um maior número de repetições foram encontrados em freqüência muito baixas. Os alelos com 8 a 11 repetições foi encontrado em 1,1% em casos e 0,7% em controles, sendo o alelo (CA)₇, o único estatisticamente associado com o risco de câncer de mama (OR: 0,50; IC 95%, 0,27-0,93). Em nossas análises só foi encontrado um único indivíduo com o alelo (CA)₇, não tendo assim como realizar uma comparação com essa literatura.

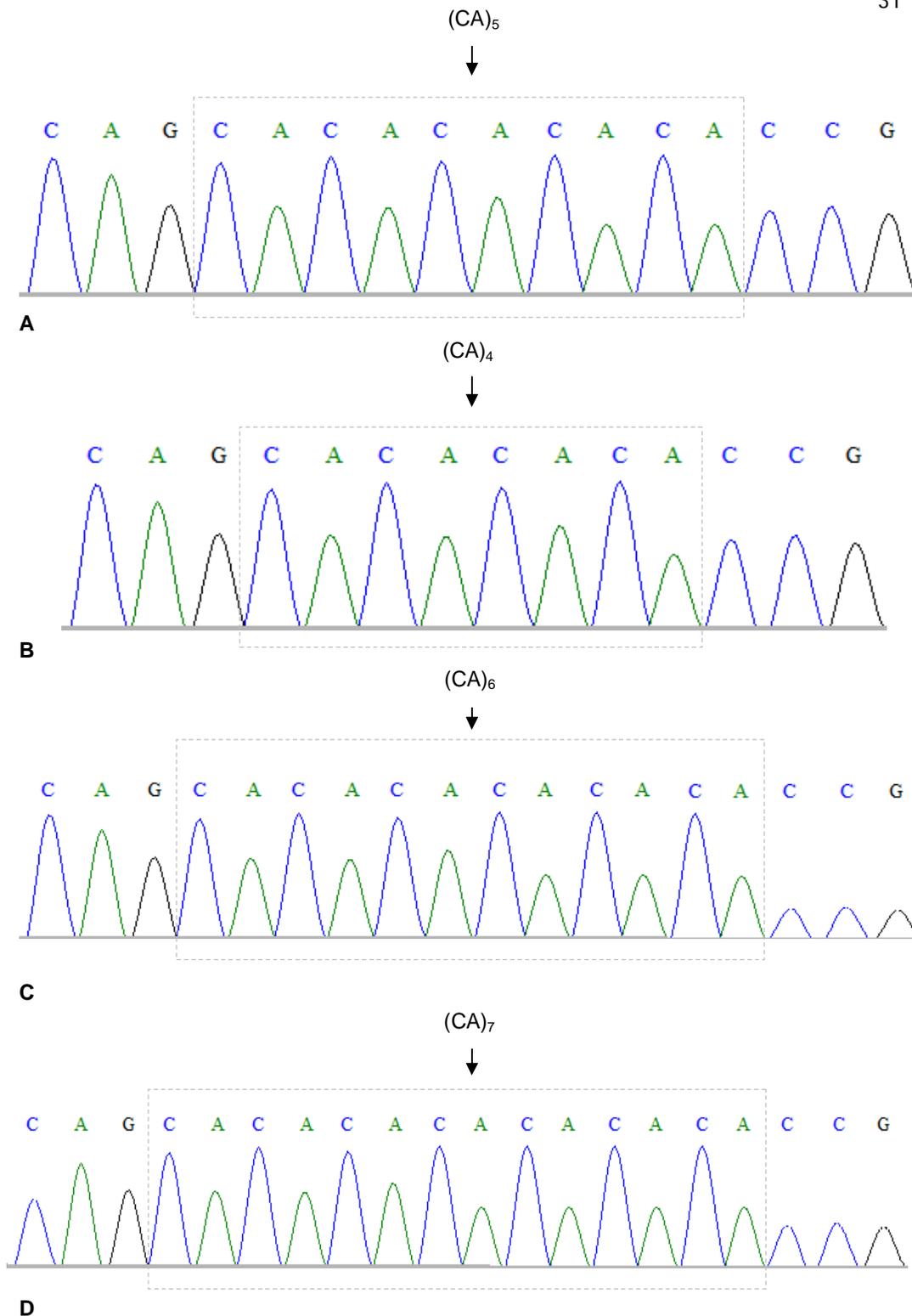


Figura 11. Eletroferogramas de seqüências de mtDNA de quatro pacientes mostrando os quatro alelos encontrados para a repetição dinucleotídica de (CA) na posição 514-523. (A) alelo selvagem $(CA)_5$ (B) alelo $(CA)_4$ (C) alelo $(CA)_6$ (D) alelo $(CA)_7$.

Tabela 6. Freqüências dos alelos do polimorfismo de repetição 514-523 (CA)_n para cada característica clínico-patológica

Característica	(CA) ₅ n (%)	(CA) ₄ n (%)	(CA) ₆₋₇ n (%)	P valor	OR (IC 95%)
Sexo					
Masculino	13 (28,90%)	20 (44,40%)	02 (4,40%)	0,710	0,59 (0,14-2,43)
Feminino	05 (11,10%)	05 (11,10%)	0 (0%)		
Idade					
< 60	11 (24,40%)	13 (28,90%)	02 (4,40%)	0,095	1,25 (0,37-4,23)
≥ 60	07 (15,50%)	12 (26,60%)	0 (0%)		
Histopatológico					
Difuso	11 (24,40%)	09 (20,00%)	01 (2,20%)	0,200	2,67 (0,78-9,12)
Intestinal	07 (15,50%)	16 (35,50%)	01 (2,20%)		
Localização					
Antro	14 (31,10%)	19 (42,20%)	02 (4,40%)	0,818	1,10 (0,26-4,67)
Corpo	04 (8,9%)	06 (13,30%)	0 (0%)		
Estádio					
T _{1a} , T ₁ , T ₂	02 (4,40%)	08 (17,80%)	0 (0%)	0,139	4,5 (0,05-1,52)
T ₃ , T ₄	16 (35,50%)	16 (35,50%)	02 (4,40%)		
Metástase					
Linfonodal					
N ₀	03 (6,70%)	09 (20,00%)	0 (0%)	0,213	3,18 (0,72-13,92)
N ₁ , N ₂ , N ₃	15 (33,30%)	16 (35,50%)	02 (4,40%)		

4. CONCLUSÕES

- a) A frequência do polimorfismo C16519T observada apresentou diferença estatística entre casos e controles, aumentando em 3,2 vezes o risco de desenvolver a doença, sugerindo, dessa forma, que o mesmo seja um biomarcador da carcinogênese gástrica.
- b) Apesar das associações entre polimorfismo C16519T e as características histopatológicas não terem sido significantes, observamos um aumento no risco de desenvolver tumores em estágios iniciais e sem metástases em linfonodos regionais em pacientes portadores de alelos variantes;
- c) O microssatélite C₅TC₄ da posição 16.189 está associado com tumores do tipo difuso e localizados no antro. Apresentou um número maior de variantes (instabilidade) no grupo de pacientes com tumores gástricos em relação ao grupo controle.
- d) Nossos dados sugerem que o microssatélite C₇TC₆ na posição 310 possa ser utilizado como biomarcador de tumores em estágios iniciais e sem metástase em linfonodos;
- e) A presença de instabilidade no microssatélite de repetição (CA)_n aumenta o risco de desenvolver tumores em estágios iniciais, sem metástase para os linfonodos e do tipo difuso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU E. **A prevenção primária e detecção do câncer de estômago.** Caderno de Saúde Publica. 13 (Supl 1):105-8. 1997.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K E WALTER P. *Biologia molecular da célula.* Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.* – 4.ed. – Porto Alegre. Ed. Artmed, 2004.

ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN MH, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER , SMITH AJ, STADEN R, YOUNG IG. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** Nature. 457–465. 1981.

AYRES, M. AYRES, M.JR. AYRES, D.L E DOS SANTOS, AS. **Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreasdas ciências biológicas e médicas.** Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 290p. 2008.

BAI RK, LEAL SM, COVARRUBIAS D, LIU A, WONG LJ. **Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk.** Cancer Res. 15;67(10):4687-94. 2007

BARTSCH H, OHSHIMA H, IGNATELLI B. **Inibitors of endogenous nitrosation mechanisms and implications in human cancer prevention.** Mutation Research. 202:307-324. 1988.

BIRCH-MACHIN MA. **Using mitochondrial DNA as a biosensor of early cancer development** [editorial]. Br J Cancer.;93:271-272. 2005

CALDAS C, CARNEIRO F, LYNCH HT. Familial gastric cancer overview and guidelines for management. **J. Med Genet**, 36: 873-880, 1990.

CARNEIRO MRG, PINTO LFR, PAUMGARTTEN FJR. **Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão toxicologista.** Cad Saúde Publica. 13 (supl 1):27-38. 1997.

COLUCCIA C, RICCI EB, MARZOLA GG, MOLASCHI M, NANO MG. **Gastric cancer in the elderly: results of surgical treatment.** Int Surg.;72:4-10. 1987

COOK WD, MCCAWE BJ. **Accommodating haploinsufficient tumor suppressor genes in Knudson's model.** Oncogene.19(30):3434-8. 2000

COPELAND WC, WACHSMAN JT, JOHNSON FM, PENTA JS. **Mitochondrial DNA alterations in cancer.** Cancer Invest; 20: 557-569. 2002

CROTEAU DL, STIERUM RH e BOHR VA. **Mitochondrial DNA repair pathways.** Mutation Research 434:137-148. 1999.

DE LUCA A, IAQUINTO G. ***Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association.** Cancer Lett Sep;213(1):1-10. 2004.

EGUCHI T, TAKAHASHI Y, IKARASHI M, KASAHARA M, FUJII M. **Is extended lymph node dissection necessary for gastric cancer in elderly patients?** Eur J Surg.;166:949-53. 2000

ELLEDGE, S.J.; **Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis.** Science 6 (274): 1664-1672, 1996.

FLISS M.S, USADEL H, CABALLERO O.L, WU L, BUTA M.R, ELEFF S.M, JEN J, SIDRANSKY D. **Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids.** Science. 287: 2017–2019. 2000.

GRAHAM S. **Epidemiology of retinoids and cancer.** Journal of the National Cancer Institute, 73:1423-1428. 1984.

GOLUBNTSCHAJA, O. Cell Cycle Checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, câncer, and neurodegenerative diseases. **Amino Acids** **32**: 359-371, 2007.

GREW KD, NEUGUT AI. **Epidemiology of Gastric Cancer**. World J Gastroenterol, 12(3): 354-62. 2006.

HABANO W, NAKAMURA S, SUGAI T. **Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome**. Oncogene, 17, 1931–1937. 1998.

HAMILTON SR., AALTONEN LA. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System**. IARC Press: Lyon 2000.

HARTGRINK HH, JANSEN EP, VAN GRIEKEN NC, VAN DE VELDE CJ. **Gastric cancer**. Lancet. 374(9688):477-90. Epub 2009 Jul 20. 2009.

HARTWELL LH, KASTAN MB. **Cell Cycle Control and Cancer**. Science 266: 1821-1828, 1994.

HODGSON SV, MAHER ER. **Molecular genetics of cancer. A practical guide to human cancer genetics**. Cambridge University Press. 14-21, 1998.

HOENBERGER P, GRETSCHEL S. Gastric Câncer. **Lancet** **362**: 305 – 315. 2003.

HUNG WY, LIN JC, LEE LM, WU CW, TSENG LM, YIN PH, CHI CW, LEE HC. **Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region**. Mutagenesis vol. 23 no. 2 pp. 137–142, 2008.

IARC. **Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions.** IARC Working Group of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC; p.177-240. 1994.

IARC. **Cancer incidence and mortality worldwide in 2001.** Disponível em www.iarc.fr, Acesso em 8 de junho de 2009.

INCA. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: 2007.

INCA. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: 2009.

JERONIMO C, NOMOTO S, CABALLERO O.L, USADEL H, HENRIQUE R, VARZIM G, OLIVEIRA J, LOPES C, FLISS M.S, SIDRANSKY D. **Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids.** Oncogene. 20: 5195–5198. 2001.

JONES JB, SONG JJ, HEMPEN PM, PARMIGIANI G, HRUBAN RH, KERN S.E. **Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a ‘mass’ive advantage over detection of nuclear DNA mutations.** Cancer Res. 61: 1299–1304. 2001.

KANG D, HAMASAKI N. **Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes and cancer.** Curr Med Chem.12:429-441.2005.

KELLEY JR, DUGGAN JM, **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** J Clin Epidemiol. Jan;56(1):1-9. 2003.

KIRCHES E, KRAUSE G, WARICH-KIRCHES M, WEIS S, SCHNEIDER T, MEYER-PUTTLITZ B, MAWRIN C, DIETZMANN K. **High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples.** *Int J Cancer.* 93: 534–538. 2001.

KNELLER RW, McLAUGHLIN JK, BJELKE E. **A cohort study of stomach cancer in a high risk american population.** *Cancer.* 68:672-678. 1991.

KNUDSON AG. **Mutation and cancer: statistical study of Rb.** *Proc Nat Acad Sci USA,* 68(4): 820--823. 1971.

KONO S, HIROHATA T. **Nutrition and Stomach cancer.** *Cancer Causes Controle;* 7(1):41-55. 1996.

KOSE K, HIYAMA T, KOSE K, HIYAMA T, TANAKA S. **Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:1679-1684.

KUNKEL TA, LOEB LA. **Fidelity of mammalian DNA polymerases.** *Science* 213:765-767. 1981.

LANDIS SH, MURRAY T E BOLDEN S. **Cancer statistics.** *Cancer J Clin,* 48: 6-29. 1998.

LATORRE MRDO. **A mortalidade por câncer de estômago no Brasil: análise do período de 1977 a 1989.** *Cad Saúde Pública;* 13(Supl 1):67-78. 1997.

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 Microbiol Scand,* 64: 31-49. 1965.

LIEVRE A, CHAPUSOT C, BOUVIER AM. **Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer.** *J. Clin. Oncol.* 23, 3517–3525. 2005.

LIU VWS, SHI HH, CHEUNG ANY, CHIU PM, LEUNG TW, NAGLEY P, WONG LC, NGAN HYS. **High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas.** *Cancer Res.* 61: 5998– 6001. 2001.

LIU VW, YANG HJ, WANG Y, TSANG PC, CHEUNG AN, CHIU PM, NG TY, WONG LC, NAGLEY P, NGAN HY. **High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas.** *Br J Cancer.* Aug 18;89(4):697-701. 2003.

MAECHLER P, WOLLHEIM CB. **Mitochondrial function in normal and diabetic β -cells.** *Nature* 414, 807-812. 2001.

MALUMBRES, M, CARNERO A. Cell Cycle Desregulation: a Common Motif in Câncer. **Progress in Cell Cycle Research 5:** 5-18. 2003.

MÄKELÄ JT, KIVINIEMI H, WIIK H, LAITINEN S. **Survival after surgery for gastric cancer in patients over 70 years of age.** *Ann Chir Gynaecol.* 89(4):268-72. 2000

MATSUYAMA W, NAKAGAWA M, WAKIMOTO J, HIROTSU Y, KAWABATA M, OSAME M. **Mitochondrial DNA mutation correlates with stage progression and prognosis in non-small cell lung cancer.** *Hum. Mutat.* 21, 441–443. 2003.

MÁXIMO V, SOARES P, SERUCA R, ROCHA AS, CASTRO P, SOBRINHO-SIMÕES M. **Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma.** *Genes Chromosomes Cancer.* 32: 136– 143. 2001.

MÁXIMO V, LIMA J, SOARES P, BOTELHO T, GOMES L, SOBRINHO-SIMÕES M. **Mitochondrial D-Loop instability in thyroid tumours is not a marker of malignancy.** *Mitochondrion.* Oct;5(5):333-40. 2005.

MELLO ELR, CORREIA MM. **Câncer gástrico.** Rio de Janeiro: Revinter; 1999.

MIYAZONO F, SCHNEIDER PM, METZGER R, WARNECKE-EBERZ U, BALDUS SE, DIENES HP, AIKOU T, HOELSCHER AH. **Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus.** *Oncogene*. 21(23):3780-3. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. Pro-Onco. **Ações de enfermagem para controle do câncer.** Rio de Janeiro: Pro-Onco; 1995.

NARDONE G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 17 (2) 75-81. 2002.

NAVAGLIA F, BASSO D, FOGAR P, SPERTI C, GRECO E, ZAMBON CF, STRANGES A, FALDA A, PIZZI S, PARENTI A, PEDRAZZOLI S, PLEBANI M. **Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome.** *Am J Clin Pathol*. Oct;126(4):593-601. 2006.

NOGAN L, YOSHIMURA T. **Work, salt intake and the development of stomach cancer.** *Medical Hypotheses* 60 (4): 552-556. 2003.

NOMURA A, GROVE JS, STEMMERMANN GN, SEVERSON RK. **A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption.** *Cancer Research*. 50: 627-631. 1990.

PARKIN DM. **International variation.** *Oncogene*. 23(38):6329-40. 2004.

PARRELLA P, XIAO Y, FLISS M, SANCHEZ-CESPEDES M, MAZZARELLI P, RINALDI M, NICOL T, GABRIELSON E, CUOMO C, COHEN D, PANDIT S, SPENCER M, RABITTI C, FAZIO V.M, SIDRANSKY D. **Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates.** *Cancer Res*. 61: 7623–7626. 2001.

PETROS JA, BAUMANN AK, RUIZ-PESINI E. **mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer.** Proc Natl Acad Sci U S A.;102:719-724. 2005.

PINHEIRO, LML. **Abordagem molecular sobre as relações filogenéticas entre populações de Saimiri (Cebidae, Primates).** Dissertação de Mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará. 108 f. 2003.

PINTO LFR, FELZENSWALB I. Genética do Câncer In: **Mutagênese Ambiental.** RIBEIRO L.R; SALVADORI D.M FMARQUES E.K (Eds) Universidade Luterana do Brasil, 29-48. 2003.

POLYAK K, LI Y, ZHU H, LENGAUER C, WILLSON JK, MARKOWITZ SD, TRUSH MA, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. **Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours.** Nat Genet. 20: 291–293. 1998.

RINNOVATI A, TORRICELLI F, PELO E, FABBRUCCI P, CAMMILLINI C. **The role of surgery in the treatment of gastric cancer in the elderly.** Proceedings of the 4th International Gastric Cancer Congress; New York, USA. p. 1097-103. 2001.

RISCH AH, JAIN M, CHOI N. W, FODOR G, PFEIFFER CJ, HOWE G, HARRISON LW, CRAIB KJP, MILLER AB. **Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach.** American Journal of Epidemiology, 122:947-957. 1985.

RUIZ-PESINI E, LOTT MT, PROCACCIO V, POOLE JC, BRANDON MC, MISHMAR D, YI C, KREUZIGER J, BALDI P, WALLACE DC. **An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny.** Nucleic Acids Res. 35. D823–D828. 2007.

SAMBROOK J, FRITSCH E.F, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.** *Biotechnology*. 24:104-8. 1992.

SEPULVEDA AR, SANTOS AC, YAMAOKA Y, WU L, GUITIERREZ O, KIM JG E GRAHAM, D. **Marked differences in the frequency in gastric cancer from different countries.** *American J on Castroenterology*, 94 (10): 3034-3038. 1999.

SHARMA H, SINGH A, SHARMA C, JAIN SK E SINGH N. **Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical câncer.** *Cancer Cell International*. 5:34. 2005.

STEHR P, GLONINGER MF, KULLER LH, MARSH GM, RADFORD, EP, WEINBERG GB. **Dietary vitamin A deficiencies and stomach cancer.** *American Journal of Epidemiology*. 121:65-70. 1985.

STRATHDEE G. **Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin.** *Seminars in Cancer Biology* 12(5):373-379, 2002.

TAMURA, G. Genetic and Epigenetic Alterations of Tumor Suppressor and Tumor Reated Genes in Gastric Cancer. **Histology and Histopatology 17:** 323 – 329. 2002.

TSENG LM, YIN PH, CHI CW, HSU CY, WU CW, LEE LM, WEI YH, LEE HC. **Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer.** *Genes Chromosomes Cancer*. 45, 629–638. 2006.

YAKES MF e VAN HOUTEN B. **Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.** *Proc Natl Acad Sci USA* 94:514-519. 1997.

YE C, GAO YT, WEN W, BREYER JP, SHU XO, SMITH JR, ZHENG W, CAI Q. **Association of mitochondrial DNA displacement loop (CA)_n dinucleotide repeat polymorphism with breast cancer risk and survival among Chinese women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2117-22. 2008.

YONEYAMA H, HARA T, KATO Y, YAMORI T, MATSUURA ET, KOIKE K. **Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells.** *Mol Cancer Res.* Jan;3(1):14-20. 2005.

WEISBURGER JH. **Nutrition and cancer prevention: gastrointestinal cancer.** *Gann Monography.* 31:275-283. 1985.

WU CW, YIN PH, HUNG WY, LI AF, LI SH, CHI CW, WEI YH, LEE HC. **Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer.** *Genes Chromosomes Cancer.* 44, 19–28. 2005.

ZHAO YB, YANG HY, ZHANG XW, CHEN GY. **Mutation in D-loop region of mitochondrial DNA in gastric cancer and its significance.** *World J Gastroenterol.* 11(21):3304-63306. 2005.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Instituto Ofir Loyola, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões do estômago e o desenvolvimento de tumor gástrico, através da identificação das alterações genéticas (cromossomos e genes) associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital ou Clínica, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma doença gástrica e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado será encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido estomacal para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof^a. Maria Lúcia Harada, pelo telefone (91) 8115-8754.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.

Belém, de de

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome:

RG:

ANEXO II

Estadiamento TNM (Schlemper *et al.*, 1997)

Tumor primário (T)

Tx	Tumor primário, não pode ser avaliado.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor limitado à mucosa e submucosa, independente de sua extensão e localização.
T2	Tumor invade a muscular própria ou a submucosa.
T3	Tumor penetra na serosa (peritônio visceral) sem invasão de estruturas adjacentes.
T4	Tumor penetrado na serosa e invadindo estruturas adjacentes.

Metástases Linfonodais (N)

Nx	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados.
N0	Sem metástases para linfonodos regionais.
N1	Metástases em um a seis linfonodos regionais.
N2	Metástases em sete a quinze linfonodos regionais.
N3	Metástases em mais de quinze linfonodos regionais.

Metástases distantes (M)

Mx	Não se avaliaram metástases à distância.
M0	Ausência de metástases à distância.
M1	Metástases à distância.
