

MAURÍCIO WESLEY FERROUD JUNIOR

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES *p53* e *K-ras* EM
PACIENTES COM CARCINOMA BRÔNQUICO
ATENDIDOS NO SERVIÇO DE ONCOPNEUMOLOGIA
FCM/UNICAMP**

CAMPINAS

2002

MAURÍCIO WESLEY FERROUD JUNIOR

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES *p53* e *K-ras* EM
PACIENTES COM CARCINOMA BRÔNQUICO
ATENDIDOS NO SERVIÇO DE ONCOPNEUMOLOGIA
FCM/UNICAMP**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de Clínica Médica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. LAIR ZAMBON

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2002

UNIDADE	82
Nº CHAMADA	UNICAMP
	P429p
V	EX
TOMBO BC/	53352
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 17,00
DATA	29/04/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00181074-B

BIBID.290698

P429p Perroud Junior, Maurício Wesley
 Pesquisa de mutações nos genes p53 e K-ras em pacientes com carcinoma brônquico atendidos no serviço de Oncopneumologia FCM / UNICAMP / Maurício Wesley Perroud Junior. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Lair Zambon, Fernando Ferreira Costa
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biologia Molecular. 2. Ciclo celular. 3. Câncer - Prognóstico.
 4. Câncer – Diagnóstico. 5. Câncer – Genes. 6. Traquéia. I. Lair Zambon. II. Fernando Ferreira Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno: MAURICIO WESLEY PERROUD JÚNIOR

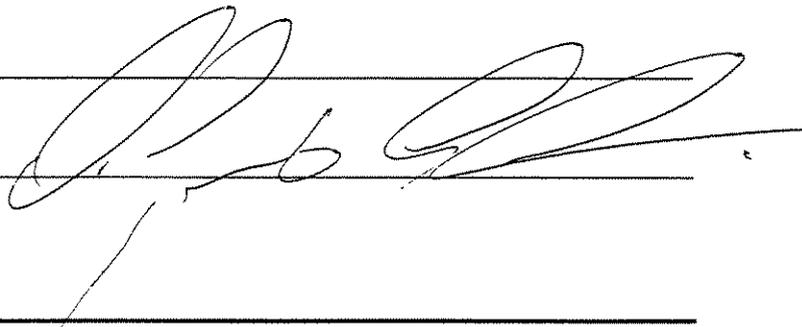
Orientador(a): Prof.Dr. Lair Zambon



Membros:

Profa.Dra. Mônica Barbosa de Melo

Prof.Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/07/02

Projeto de pesquisa financiado pela FAPESP

Processo 99/10624-2

DEDICATÓRIA

À Ana Paula,

Minha esposa, sem a qual este trabalho não existiria. Obrigado pelo amor e pelo carinho; pelos melhores momentos da minha vida. Simplesmente, obrigado por formarmos uma família.

*“It’s so easy loving you
With everything I feel inside,
And Holding me the way you do,
It’s here I’m staying all of my life.*

*I’ll never ever make you cry.
I’ll never ever say goodbye.
Can’t you see it in my eyes?
I’m yours until the day I die.*

*I’ll watch you fall asleep at night,
I’ll smile and kiss you, hold you tight,
I’ll hold your hand and close my eyes,
It’s here I’m staying all of my life”*

Eric Clapton

Aos meus filhos Vinícius e Marina,

A maior graça que recebi de Deus. Mostram com sua alegria que a vida pode ser simples, e me dão força para recomeçar a cada dia.

Ao meu Pai,

Muitos dos passos que dei na vida só foram possíveis porque me apoiava em terra firme. Obrigado por não abrir as portas, e sim por permitir que eu aprendesse a abri-las.

À minha Mãe,

Que teve a sensibilidade de ensinar tudo que eu precisaria na vida. Paradoxalmente, breve e eterna.

À Vó Cida e Tia Rô,

Pelo amor, carinho e paciência. Somente Deus e nós sabemos o quanto vocês foram importantes para mim.

Ao Tio Marcos,

Não há como agradecer tudo que você fez; qualquer palavra ou gesto, sempre será muito pouco.

AGRADECIMENTOS

À Miriam, representando todos os professores que participaram da minha formação.

Aos docentes da Faculdade de Medicina de Sorocaba; em especial aos professores José Rosemberg, Diana Tannos, José Rosalvo Santos Maia e Antônio Nelson Cincotto, que foram fundamentais para a minha formação médica.

Aos Prof. Drs. Reynaldo Quagliato Junior, Ilma Aparecida Paschoal, Eduardo Mello de Capitani, Silvio de Moraes Resende e aos médicos da Disciplina de Pneumologia da FCM/UNICAMP, pela minha formação como pneumologista.

Ao Prof. Dr. Lair Zambon, que foi de extrema importância para o meu amadurecimento pessoal e médico; exemplo de que a ética está acima de tudo. Seu espírito empreendedor foi fundamental no desenvolvimento deste projeto. Agradeço a confiança depositada no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pelo apoio e orientação durante o desenvolvimento do projeto. Sempre disposto a ajudar, suas discussões foram enriquecedoras.

À Helen Naemi Honma, por não temer desafios, foi de extrema importância na implementação e organização do laboratório da Disciplina de Pneumologia. Parabéns pelo seu trabalho que foi brilhante.

Ao Dr. Aristóteles Barbeiro pela amizade e colaboração.

À Disciplina de Cirurgia Torácica e ao Serviço de Broncoscopia, em especial ao Dr José Cláudio Teixeira Seabra, ao Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro e ao Enf. Natal pela colaboração na coleta das biópsias.

A todos os funcionários do Hemocentro, em especial à Mônica, Tereza, Dulcinéia, Lena, Ucha e Manuela, e à Rose (laboratório de Reumatologia), pela disponibilidade em ajudar.

À Margareth e Vera, obrigado pelo apoio e amizade.

A todos que trabalham na Clínica Médica do Hospital Estadual Sumaré, que compartilharam as angústias e comemoraram os resultados.

	PÁG.
RESUMO	<i>xxv</i>
ABSTRACT	<i>xxix</i>
1. INTRODUÇÃO	33
A – Ciclo Celular.....	37
B – Gene supressor <i>p53</i>	43
C – Gene <i>K-ras</i>	48
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
A – Pacientes.....	57
B – Rotina do laboratório.....	58
1. Extração de DNA a partir de biópsia.....	58
2. Amplificação e PCR-SSCP para rastreamento de mutações no gene <i>p53</i>	59
3. Seqüenciamento do gene <i>p53</i>	63
4. Amplificação do gene <i>K-ras</i>	66
5. Seqüenciamento do gene <i>K-ras</i>	67
6. SSCP para rastreamento de mutações no gene <i>K-ras</i> em mucosas.....	71
7. Extração de DNA de sangue do grupo controle.....	71

4. RESULTADOS.....	73
5. DISCUSSÃO.....	99
A – Carcinoma de pulmão não pequenas células.....	103
1. Gene <i>p53</i>	103
1.1. Polimorfismos e mutações silenciosas no gene <i>p53</i>	112
2. Gene <i>K-ras</i>	112
3. Influência de mutações no <i>p53</i> e <i>K-ras</i> no prognóstico.....	114
4. Genes <i>p53</i> e <i>K-ras</i> e diagnóstico precoce.....	117
B – Carcinoma de pulmão pequenas células.....	118
C – Avaliação anatomopatológica da carina traqueal.....	120
6. CONCLUSÕES.....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
8. ANEXOS.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>ATM/Rad3 related kinase</i>
BPDE	Epoxido-diol-benzo[a]pireno
C	Citosina
Cdc25A	<i>Cell division cycle</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinases</i>
CHK	Quinase homóloga Csk
CPNPC	Carcinoma de pulmão não pequenas células
CPPC	Carcinoma de pulmão pequenas células
Cys	Cisteína
ddNTP	Dideoxynucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dNTP	Deoxynucleotídeo
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Guanina
GDP	Difosfato de guanosina
Glu	Ácido Glutâmico
GTP	Trifosfato de guanosina
His	Histidina
IGF-BP3	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3</i>
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
KD	Quilodalton

L1	<i>Loop 1</i>
L2	<i>Loop 2</i>
L3	<i>Loop 3</i>
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mdm2	<i>Murine Double Minute-2</i>
Met	Metionina
MPF	<i>M Phase Promoting Factor</i>
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIGs	<i>p53-induced genes</i>
pRb	Proteína do gene do retinoblastoma
Pro	Prolina
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
Ser	Serina
SPF	<i>S Phase Promoting Factor</i>
SSCP	Polimorfismo de conformação em hélice simples
T	Timina
TGFa	Fator de crescimento tumoral alfa
TGFb	Fator de crescimento tumoral beta
Thr	Treonina
TK	Tirosina quinase
Tyr	Tirosina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Val	Valina



RESUMO

Considerada uma doença rara no início do século XX, o carcinoma de pulmão hoje é a neoplasia visceral mais comum e a principal causa de morte por câncer.

O estudo dos eventos moleculares envolvidos no câncer de pulmão é importante para o conhecimento do processo de carcinogênese, e para a determinação do espectro mutacional dos genes relacionados ao carcinoma brônquico. No futuro poderemos empregar as técnicas de biologia molecular no diagnóstico precoce e na correlação entre variáveis clínicas, tumorais e genéticas para definir os fatores de prognóstico e a abordagem terapêutica.

Realizamos a pesquisa de mutações nos genes *p53* e *K-ras* em pacientes com neoplasia de pulmão.

Em relação ao gene *p53*, pesquisamos mutações nos exons 5 a 10 em 38 pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células, e nos exons 5 a 9 em nove pacientes com carcinoma de pequenas células. A frequência de mutações foi, respectivamente, de 21 e 33%.

A pesquisa de mutações no gene *K-ras* foi realizada em 8 pacientes com adenocarcinoma e em quatro com carcinoma de grandes células. Não encontramos mutações, provavelmente, devido ao tamanho da amostra.

Nos pacientes com carcinoma não pequenas células a presença de mutação no gene *p53* não interferiu na sobrevida ($p=0,53$), no estadiamento ($p=0,67$) e no tempo de sintomatologia ($p=0,15$).

Comparamos as mutações encontradas no gene *p53* com o banco de dados mantido pela Organização Mundial de Saúde (*International Agency for Research on Cancer*). Considerando que o banco de dados da IARC foi atualizado em março/2002 (16285 entradas), provavelmente somos o primeiro grupo a descrever a mutação no codon 237 (ATG→AAG) em carcinoma brônquico, independente do tipo histológico; da mutação no codon 337 (CGC→CAC) em carcinoma de grandes células e da mutação silenciosa no codon 295 (CCT>CCC) (IARC, 2002).



ABSTRACT

Considered a rare illness in the beginning of 20th century, the lung cancer today is the more common visceral neoplasia and the main cause of death by cancer. The study of the molecular events involved in lung cancer is important for the knowledge of the process of carcinogenesis and for the determination of the mutational spectrum of the genes related to lung cancer. In the future we will be able to use the techniques of molecular biology in the early diagnosis, and the correlation between clinical, tumoral and genetic variables will be useful for us to define the factors of prognostic and therapeutic approach.

We carried out the study of mutations in the genes *p53* and *K-ras* in patients with lung cancer. In relation to the *p53* gene, we have looked for mutations in exons 5 to 10 in 38 patients with non-small cell lung cancer, and in exons 5 to 9 in nine patients with small cell lung cancer. The frequency of mutations was, respectively, 21 and 33%.

The analysis of mutations in the *K-ras* gene was carried out in 8 patients with adenocarcinoma and four with large cell carcinoma. We didn't find mutations, probably, due to the size of the sample.

In patients with non-small cell lung cancer, the presence of mutation in the *p53* gene did not correlate with survival ($p=0,53$), staging ($p=0,67$) and time of symptoms ($p=0,15$). We compared the mutations found in the *p53* gene with the database kept by the World Health Organization (International Agency for Research on Cancer). Taking into account that the IARC data bank was updated in March/2002 (16,285 entries), we are probably the first group to describe the transversion on codon 237 (ATG→AAG) in bronchial cancer, independent of the histological type and the mutation on codon 337 in large cell cancer (IARC, 2002).



1. INTRODUÇÃO

No início do século XX o câncer de pulmão era considerado uma doença rara. Em 1912, Adler conseguiu reunir 374 casos relatados na literatura médica. Outro estudo realizado em 1914, relatou 371 casos de câncer de pulmão em 52420 óbitos por neoplasia (apud MOREIRA et al.,1990). Nos últimos cem anos houve um aumento progressivo da incidência e mortalidade por carcinoma brônquico devido, principalmente, à expansão do tabagismo.

Atualmente, é a neoplasia visceral mais comum no mundo e a principal causa de morte por câncer (SMITH & GLYNN, 2000). Durante o ano de 2002 é previsto que nos Estados Unidos (E.U.A.) haverá 169.400 casos novos e 154.900 óbitos (AMERICAN CANCER SOCIETY,2002). No Brasil é a primeira causa de óbito por neoplasia entre homens e a segunda entre as mulheres. As taxas de incidência e mortalidade previstas para o ano 2002 no Brasil e no Estado de São Paulo estão expostas na tabela I (INCA,2002).

Tabela I. Taxa de Incidência e Mortalidade por câncer de Pulmão –INCA 2002

	Incidência/100.000		Mortalidade/100.000	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Brasil	17,45	7,2	12,99	5,29
São Paulo	25,91	11,56	17,16	6,64

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2025 haverá mais de 10 milhões de mortes no mundo por patologias relacionadas ao hábito tabágico e cerca de 30% destas serão por câncer de pulmão (PETO et al, 1996).

Em qualquer neoplasia quanto mais precoce for o diagnóstico melhor é o prognóstico. Pacientes com carcinoma de não pequenas células têm uma sobrevida em 5 anos variando entre 60 a 80% quando diagnosticados precocemente (estádios Ia e Ib) (NARUKE et al, 1997; PAIROLERO et al, 1984; WADA, et al, 1996; WATANABE et al, 1998; WILLIAMS et al, 1981). Enquanto os pacientes com estadio avançado (IV) têm uma sobrevida menor que 1% em cinco anos (MOUNTAIN, 1997).

Infelizmente, em relação ao carcinoma brônquico o diagnóstico precoce não é a regra, e sim uma exceção. Apenas 15% dos casos são diagnosticados enquanto a doença está localizada (RIES et al, 2000). Em um estudo brasileiro, apenas 22,3% dos pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células estavam no estadio I e II no momento do diagnóstico (ZAMBON, 1994). Por isso, considerando todos os casos de carcinoma brônquico independente do estadio, a taxa de sobrevida em cinco anos continua baixa, variando entre 8 e 15% (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; FUJINO et al, 1995a; KERN et al, 1994; PARKIN et al, 1999; SZABO et al, 1993), apesar do avanço obtido nos últimos anos em relação à terapêutica.

Portanto, para melhorar a sobrevida dos pacientes é essencial que seja aprimorado o diagnóstico do câncer de pulmão.

Os trabalhos realizados na tentativa de diagnóstico precoce na população de risco para neoplasia de pulmão, através de radiograma de tórax e citologia de escarro, não melhoraram a sobrevida dos pacientes (MAO et al, 1994; SZABO et al, 1993). A partir dos resultados desses trabalhos, foi estabelecido na década de 80 do século passado um dogma contra o diagnóstico precoce na neoplasia de pulmão. Hoje com as novas tecnologias que estão surgindo, como por exemplo, a tomografia computadorizada helical, a broncoscopia com uso de material imunofluorescente e a biologia molecular, poderemos reverter este dogma.

Há uma ampla evidência de que existe uma longa fase pré-clínica no câncer de pulmão. Clones de células endobrônquicas acumulam mutações genéticas levando ao desenvolvimento de células malignas com poder de invasão. Até o momento, não se sabe se há um número crítico de mutações, combinações de mutações ou uma ordem obrigatória de eventos para que ocorra essa transformação maligna. Estudar esse mistério é uma das áreas mais excitantes de pesquisa, pois o seu conhecimento permitirá melhorar o diagnóstico e a intervenção terapêutica (KENNEDY et al, 2000).

É fundamental determinar qual o espectro mutacional de cada gene envolvido no câncer de pulmão. O conhecimento das alterações genéticas e de seus fatores promotores ou indutores permitirá a identificação dos agentes carcinógenos que participaram do

desenvolvimento da neoplasia. Além disso, poderemos correlacionar cada mutação com variáveis clínicas, tumorais e genéticas para definir os fatores de prognóstico e a abordagem terapêutica.

A- Ciclo Celular

É argumentável que uma mutação genética casual ou rara, pode ser um evento saudável particularmente em células germinativas. Estas mutações complementam as recombinações genéticas que promovem a plasticidade genômica necessária para o processo de evolução, e selecionam características favoráveis para as gerações futuras. O risco de ocorrerem alterações genéticas excessivas, torna necessária uma vigilância constante sobre possíveis danos causados ao ácido desoxirribonucléico (DNA) por erros no processo de divisão celular (por exemplo durante a replicação do DNA) e também por agentes genotóxicos endógenos e exógenos (por exemplo radiação ionizante, ultravioleta e tabagismo) (BARTEK & LUKAS, 2001).

O período entre as duas divisões mitóticas define o ciclo celular das células somáticas (LEWIN, 1996).

Uma célula normal exibe um sistema altamente regulado que controla sua proliferação e diferenciação e que responde aos sinais extras e intracelulares. Células neoplásicas escapam desse controle através de mutações nos genes que controlam a proliferação celular, permitindo que elas sejam capazes de crescer e proliferar sem, ou com pouca, restrição. Estas mutações podem ocorrer em genes supressores de tumores ou em oncogenes. A ativação de oncogenes induz a uma estimulação mitótica persistente, e a inativação de genes supressores elimina as “barreiras” que impedem o crescimento celular descontrolado (GUPTA et al, 2000).

As células normais podem sair do ciclo celular e entrar em um estado semelhante à fase G1, porém são incapazes de prosseguir para a fase S. Este estado de latência é chamado de G0. Através de estímulos de crescimento, uma célula que não seja diferenciada poderá sair da fase G0 e entrar no ciclo celular passando pelas fases G1, S (síntese), G2 e M (mitose) (GUPTA et al, 2000).(Figura 1)

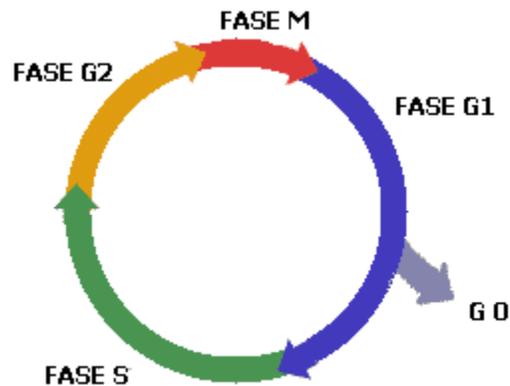


Figura 1: Fases do ciclo celular

Na fase G1 a célula prepara-se para a replicação e divisão do DNA acumulando as macromoléculas que são necessárias para o ciclo celular. As células devem transpor um ponto de regulação na passagem de G1 para a fase S, que é chamado de ponto de restrição. A fase S é a fase de síntese do DNA, onde ocorre a replicação de todo DNA celular e do seu aparato arquitetural. Após completar a fase S a célula entra na fase G2, onde os erros de replicação e danos no DNA poderão ser reparados. A presença de danos pode prolongar a fase G2 e impedir a progressão para a fase M, onde ocorrerá a mitose (GUPTA et al, 2000; LEWIN,1996). Para células animais em cultura, o controle existente na fase G1 é o mais importante e o ponto entre as fases G2/M é subsidiário. As células gastam a maior parte do ciclo na fase G1, que tem sua duração determinada em resposta às condições de crescimento (LEWIN, 1996).

O núcleo da fase S contém o fator promotor desta fase (*SPF – S phase promoting factor*), que é capaz de induzir as células em G1 a entrarem na fase S. Concomitantemente, as células no final da fase G2, ou na fase M, possuem um fator promotor da fase M (*MPF – M phase promoting factor*) que é capaz de acelerar o início da mitose desde o princípio da fase G2. O SPF e MPF são um complexo formado por ciclinas e quinases catalíticas, e são conhecidos como quinases dependentes de ciclina (*CDK – cyclin-dependent kinases*) (GUPTA et al, 2000; LEWIN, 1996). (Figura 2)

Cada CDK é regulada por uma ciclina necessária para atividade catalítica e específica para cada substrato (ROM et al, 2000). As ciclinas têm domínios conservados homólogos, chamados de “cyclin boxes”, responsáveis pela ligação à CDK e sua ativação. Além da ligação com a ciclina, é necessário que a CDK seja fosforilada para ser ativada. Além disso, a maioria das CDKs envolvidas no controle do ciclo celular podem ser inibidas pela fosforilação da subunidade tirosina 15 e na sua treonina adjacente (Thr 14) (GUPTA et al, 2000; LEWIN, 1996).

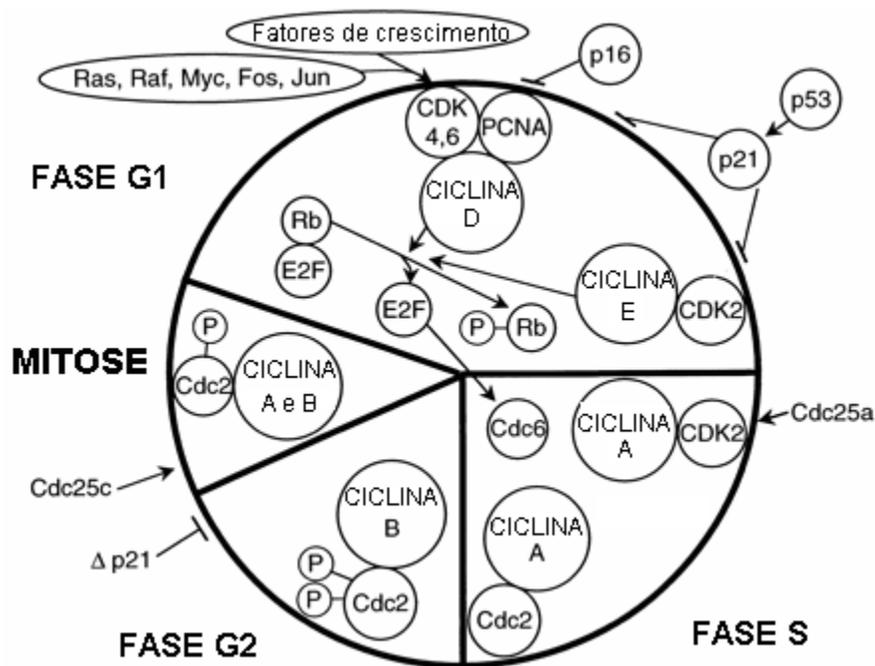


Figura 2: Reguladores do ciclo celular, envolvidos no câncer de pulmão.

A regularização negativa das CDKs também pode ser feita por uma família chamada de inibidores da quinase dependente de ciclina (*CKI – cyclin dependent kinase inhibitors*). As CKIs ligam-se aos sítios de ativação por fosforilação e inativam os complexos de CDKs. As CKIs formam uma família de várias proteínas, incluindo p21 (CIP1/WAF1) e p27 (KIP1), que se associam com CDK2, 4 e 6; e p16^{INK4} e p15^{INK4}, que agem sobre as CDK4 e 6 (GUPTA et al, 2000; LEWIN, 1996; ROM et al, 2000). Estas duas famílias de CKIs (KIP1/CIP1 e INK4) são essenciais para a progressão na fase G1 (ROM et al, 2000). (Figura 3)

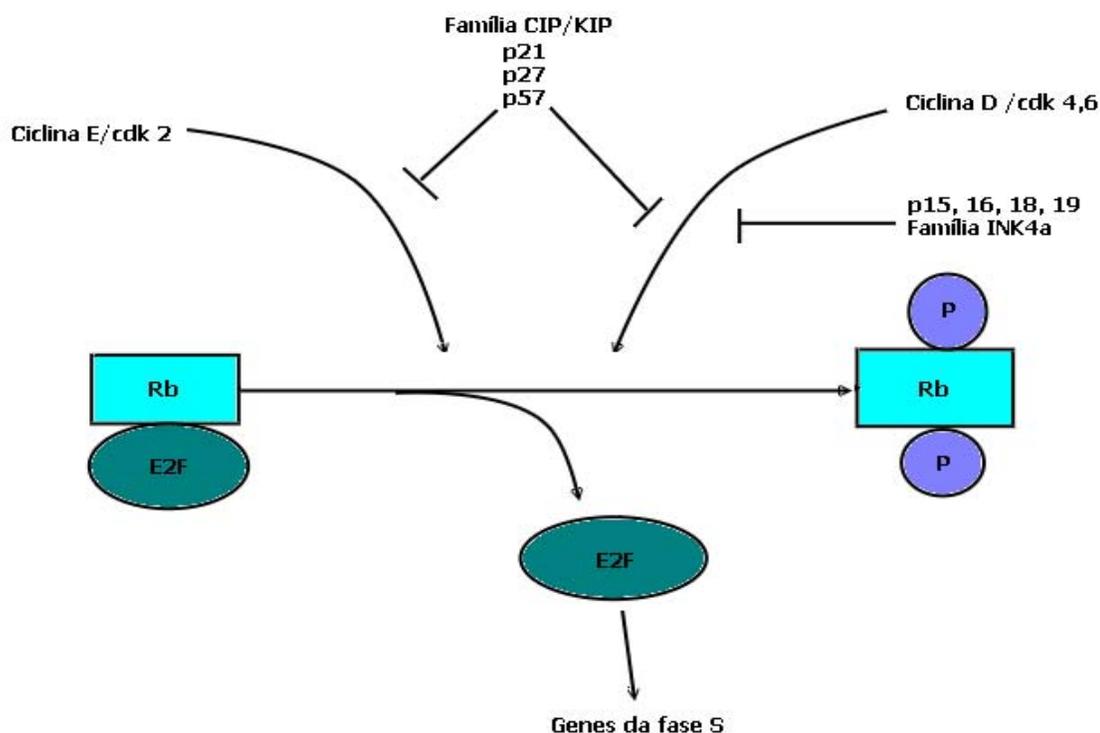


Figura 3: Os complexos Ciclina E/CDK 2 e Ciclina D/CDK 4,6 promovem a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) liberando o fator E2F que irá ativar os genes da fase S. Quando há dano no DNA, o ciclo celular pode ser interrompido através da inibição das DKs induzida pelos genes das famílias CIP/KIP e INK4.

O E2F é um grupo de fatores de transcrição, com um sítio de ligação específico para a região promotora de uma série de genes que controlam a divisão celular, como o dihidrofolato redutase, o antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA – proliferating cell nuclear antigen*), CDK1, ciclina E, ciclina A, *c-myc* e tirosina quinase (TK) (GUPTA et al, 2000). A proteína do gene do retinoblastoma (pRb) liga-se ao E2F, inativando-o. A fosfoliração da pRb libera o E2F, que por sua vez irá ativar os genes da fase S (BARTEK & LUKAS, 2001; GUPTA et al, 2000; LEWIN, 1996; ROM et al, 2000). (Figura 3 e 4)

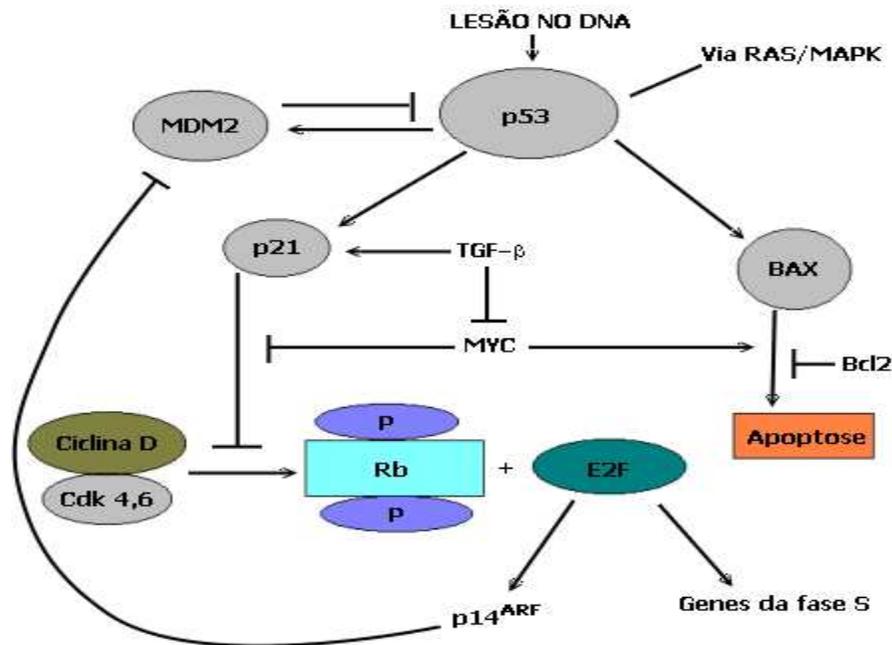


Figura 4: A lesão no DNA ativa a transcrição da proteína p53 que poderá induzir a parada no ciclo celular (ativação do gene *p21*) ou a apoptose (ativação do gene *bax*). O *p53* promove a transcrição do gene *Mdm2* que por sua vez é supressor das funções do *p53*, criando desta forma um sistema de autoregulação negativa. O fator E2F promove a progressão do ciclo celular através da ativação dos genes da fase S e bloqueia a inibição do *p53* através da ativação do gene *p14^{ARF}* que inibirá a Mdm2.

Os complexos Ciclina E/CDK 2 e Ciclina D/CDK 4,6 promovem a fosforilação da pRb. Quando há dano no DNA, o gene *p53* induz a transcrição de CKIs (p21, p27, p57 – família CIP/KIP e p15, p16, p18 e p19 – família INK4) que inibem as CDK 2 e CDK 4,6 impedindo a fosforilação da pRb e levando à parada do ciclo celular na fase G1 (BARTEK & LUKAS, 2001; GUPTA et al, 2000; LEWIN, 1996; ROM et al, 2000; SIONOV & HAUPT, 1999).

A transcrição e a síntese protéica induzida pelo gene *p53* no ponto de restrição em G1 é extremamente lenta quando comparada com a rápida inibição da CDK2 após a exposição a agentes genotóxicos. Além disso, a inibição da atividade do complexo ciclina E-CDK2, na fase tardia da G1, ocorre nas células que não possuem as funções dos genes *p53* e *p21*. Portanto, nas células de mamíferos existem dois mecanismos de ação no ponto de restrição em G1; o primeiro é rápido, transitório e independente da resposta do *p53*, seguido por um tardio, dependente do eixo *p53-p21* que é capaz de manter a interrupção do ciclo celular. Esta via rápida atua sobre o complexo Cdc25A (*cell division cycle*) que tem uma função essencial na transição G1/S por eliminar a fosforilação inibitória da CDK2. Em contraste com a importância do *p53* na manutenção da parada no ciclo na fase G1, não há qualquer evidência de que o *p53* ou *p21* atuem no controle da fase S. Nesta fase o controle do ponto de restrição é exercido pela via que atua sobre o Cdc25A (BARTEK & LUKAS, 2001).

A célula entra na fase G2 após completar a replicação do DNA. Neste momento os níveis de ciclina B aumentam. Esta proteína forma um complexo com CDK1, também conhecida como Cdc2, para formar o MPF. Muitas células exibem uma parada em G2 após a exposição a agentes genotóxicos, como radiação ionizante, cisplatina e etoposídeo. Acredita-se que esta parada tenha uma função protetora, permitindo que a célula repare o DNA antes de terminar o ciclo celular. Como o complexo ciclina B/CDK1 é necessário para a saída da fase G2 e início da mitose, a diminuição dos níveis de ciclina B, como é vista na exposição à radiação ionizante, tem sido responsabilizada pela parada no ciclo na fase G2. Entretanto, este não deve ser o único fator regulador, pois a fosforilação da Thr14 e Tyr15 na CDK1 torna o complexo ciclina B/CDK1 inativo (GUPTA et al, 2000).

Na fase G2 a proteína p53 pode induzir a parada no ciclo celular através da ativação do gene *14-3-3σ*. O seu produto sequestra a forma fosforilada da Cdc25C, a fosfatase do complexo ciclina B/CDK1, que é essencial para a transição G2/M. Um mecanismo adicional pelo qual a proteína p53 pode inibir o complexo ciclina B/CDK1, é através da indução de GADD45 que é capaz de romper esta ligação provavelmente por interação direta com a CDK1 (SIONOV & HAUPT, 1999).

B- Gene supressor *p53*

Inativação do *p53*¹ é um dos eventos genéticos mais comuns na carcinogênese humana, realçando a importância do *p53* como um gene supressor de tumores (Hupp et al, 2000). A proteína p53 tem sido chamada de guardião do genoma devido ao seu papel na prevenção do acúmulo de alterações genéticas. Esta função é realizada através da indução da parada no ciclo celular ou senescência para prevenir a replicação do DNA lesado. Entretanto, a supressão do desenvolvimento tumoral é dependente, em grande parte, da habilidade da p53 de eliminar as células aberrantes pelo processo de apoptose (SIONOV & HAUPT, 1999).

O gene *p53* humano está localizado no cromossomo 17p13 (FUJINO et al, 1995b; MELO et al, 1998; MITSUDOMI et al, 1993) e consiste de 11 exons, sendo que o exon 1 não é codificante (MAY & MAY, 1999) (ANEXO 1).

O *p53* manteve-se conservado durante a evolução (MAY & MAY, 1999). Comparando-se as seqüências de aminoácidos entre as espécies, a proteína p53 apresenta 5 regiões altamente conservadas entre os seguintes aminoácidos: 13-23, 117-142, 171-181, 234-250 e 270-286. Estas regiões, chamadas de domínios I-V, são cruciais para as funções da p53 (MAY & MAY, 1999).

Os exons 2 a 11 codificam uma fosfoproteína (MILLER et al, 1992) de 393 aminoácidos (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; GREENBLATT et al, 1994) com 53 kD que pode ser subdividida em 4 unidades distintas e separáveis: um domínio de ativação, codificado pelos exons 2-4; um domínio de ligação ao DNA, codificado pelos exons 5-8; um domínio de oligomerização e um domínio de localização nuclear com atividade de ligação ao DNA não específica, codificados pelos exons 9-11 (LEE & BERNSTEIN, 1995) (Figura 5).

¹ A grafia em itálico define o genótipo e a grafia em romano, o fenótipo. Portanto, *p53* refere-se ao gene e p53 à proteína p53.

Tabela II. Estrutura do *p53*

Exon	Nucleotídeo		Codons	
	Início	Fim	Início	Fim
1	843	949	Não codificante	
2	11689	11790	1	24
3	11906	11927	25	32
4	12021	12299	33	125
5	13055	13238	126	186
6	13320	13432	187	224
7	14000	14109	225	260
8	14452	14588	261	306
9	14681	14754	307	331
10	17572	17678	332	366
11	18599	19876	367	393 + "stop codon"

Fonte: GenBank, Locus HSU94788, Accession U94788, Version U94788.1 GI:3041866

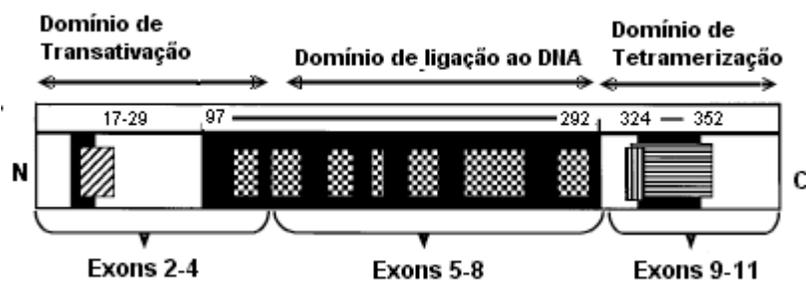


Figura 5: Representação esquemática da molécula *p53*. Domínio de transativação: listras diagonais. Domínio de localização nuclear: listras verticais. Domínio de oligomerização: listras horizontais. Domínios conservados durante a evolução: áreas em preto aminoácidos (17-29, 97-292 e 324-352).

O domínio de ativação (resíduos 1-42) localiza-se na região N-terminal e provavelmente seqüências próximas ao domínio são necessárias à sua ativação e função plena. As proteínas E1B-55 kDa do adenovírus, MDM2 humana, e X da hepatite B, ligam-se à região amino terminal e inibem sua função.

A parte central da proteína p53 (resíduos 102 a 292) contém as quatro regiões conservadas II-V onde estão concentradas cerca de 80-90% das mutações. A estrutura do domínio central possui três elementos em forma de laço (*loop*), o primeiro e o segundo (L1 e L2) ligam-se ao DNA, e o terceiro (L3) une-se ao L1 estabilizando-o. Os laços L2 e L3 estão conectados a um átomo de zinco nos aminoácidos Cys 176, His 179 (L2), Cys 238 e Cys 242 (L3); o átomo de zinco estabiliza a estrutura dos laços. (MAY & MAY, 1999).

Na região carboxi-terminal localiza-se uma região de ligação, aproximadamente entre os resíduos 300-318, que conecta o domínio central à região C-terminal; e um domínio de tetramerização, ou oligomerização, entre os resíduos 323-356. Aparentemente, a tetramerização é necessária para a transativação *in vivo* e para a supressão, mediada pelo p53, do crescimento de células de carcinomas (MAY & MAY, 1999).

Adjacente ao domínio de oligomerização, entre os aminoácidos 363-393, existe uma região que tem sido relatada como um domínio apoptótico ou de regulação da transcrição, ou ainda, como um domínio de reconhecimento de dano no DNA. (MAY & MAY, 1999).

Apesar da proteína p53 estar envolvida em diversos processos celulares, incluindo diferenciação e desenvolvimento, bem como envelhecimento e angiogênese (MAY & MAY, 1999; SIONOV & HAUPT, 1999), nenhuma função específica foi identificada no crescimento normal da maioria dos tipos celulares. Esta aparente contradição foi resolvida quando foi descoberto que o p53 normal exerce um papel importante na mediação da parada do ciclo celular e na indução da apoptose devido ao dano no DNA ou por outros fatores como hipóxia, hiperóxia, ativação de oncogenes (MAY & MAY 1999; CADWELL & ZAMBETTI, 2001) e hiperproliferação (CADWELL & ZAMBETTI, 2001).

Em alguns tipos celulares, a ativação do *p53* desencadeia com maior frequência o processo de apoptose do que a parada no ciclo celular. Alguns dos fatores que determinam o tipo de resposta são independentes da ação do *p53*, como por exemplo, presença de fatores de sobrevivência extracelulares, alterações em oncogenes e disponibilidade de fatores e co-fatores de transcrição. A atividade da *p53* pode contribuir para a escolha da resposta, já que o tipo e a magnitude da agressão celular influencia nos níveis e na atividade da proteína. A ativação da apoptose tem sido associada com níveis mais elevados de *p53* quando comparado com os níveis necessários para indução da parada no ciclo celular (BÁLINT & VOUSDEN, 2001; SIONOV & HAUPT, 1999).

A ativação da apoptose, ou morte celular programada, ainda é pouco compreendida, mas são conhecidos vários genes que são regulados pelo *p53* e que são responsáveis por induzir a apoptose (CADWELL & ZAMBETTI, 2001; SIONOV & HAUPT, 1999). Porém, a expressão isolada de um gene usualmente é insuficiente para induzi-la (SIONOV & HAUPT, 1999). Um desses genes é o *bax*, e a expressão de sua proteína é suficiente para induzir a morte celular. Entretanto, em alguns tipos celulares a expressão do *bax* não é necessária para a apoptose mediada pelo *p53*, pois outros genes como *KILLER/DR5*, *FAS/APO1* (ambos são receptores de membrana na superfamília TNFR) e *IGF-BP3* (*insulin-like growth factor binding protein 3*) contribuem para a morte celular programada (CADWELL & ZAMBETTI, 2001; SIONOV & HAUPT, 1999). Podemos concluir que a apoptose mediada pelo *p53* é consequência da expressão combinada de vários genes, e a resposta pode ser influenciada pelo tipo celular (CADWELL & ZAMBETTI, 2001).

Recentemente, foi descrito que um grupo de 14 genes chamados de *PIGs* (*p53-induced genes*) que inclui 13 genes que controlam a oxi-redução e o *p21^{WAF1/CIP1}*, são induzidos pelo *p53* normal (“*wild-type*”) e são ativados antes da apoptose induzida pelo *p53*. Foi proposto que esses genes produzem espécies oxigênio reativas (ROS – *reactive oxygen species*) que causariam danos à parede mitocondrial, por ativar a cascata da caspase, iniciando desta forma o processo de apoptose (SHEIKH & FORNACE, 2000; BÁLINT & VOUSDEN, 2001).

O *p53* normal também é responsável por reprimir um grande número de promotores celulares que podem ser importantes para a resposta à apoptose, ao controle do ciclo celular ou a outra função biológica. A expressão do fator Bcl-2 é suprimida pelo *p53* normal, e a perda dessa supressão por mutação ou inativação do *p53* pode levar à hiperexpressão do Bcl-2, e conseqüentemente, à diminuição da resposta apoptótica aos agentes genotóxicos (veja figura 4). A expressão do proto-oncogene *c-myc* também é regulada negativamente pelo *p53* normal, e níveis elevados de *c-myc* induzem à progressão no ciclo celular. Portanto, a perda da supressão do *c-myc* devido à mutação no *p53* pode induzir ao crescimento celular contribuindo para a formação tumoral (CADWELL & ZAMBETTI, 2001).

Nas células normais a proteína *p53* é encontrada em baixos níveis em estado de latência. Após o dano ao DNA ela pode acumular e tornar-se ativa, rapidamente (CADWELL & ZAMBETTI, 2001; LAKIN & JACKSON, 1999; SIONOV & HAUPT, 1999). Isto é resultado do aumento da tradução do mRNA (RNA mensageiro) do *p53* e estabilização da proteína *p53*, que possui uma meia vida curta de aproximadamente 10 a 20 minutos. Muito provavelmente, o aumento na meia vida é resultado de modificações pós-tradução que alteram a interação entre a *p53* e as proteínas que promovem sua degradação, como a Mdm2 (*Murine Double Minute-2*) (CADWELL & ZAMBETTI, 2001). O *p53* induz a transcrição do proto-oncogene Mdm2, que por sua vez é um supressor das funções do *p53*, criando desta forma um sistema de autoregulação negativa. A Mdm2 liga-se à porção N-terminal da *p53* bloqueando sua interação com o sistema de transcrição da célula. Além disso, a Mdm2 medeia a exportação nuclear da *p53*, tornado-a alvo da destruição pela via proteolítica mediada por ubiquitina (ASHCROFT & VOUSDEN, 1999; BÁLINT & VOUSDEN, 2001; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; SIONOV & HAUPT, 1999).

A conversão da *p53* da forma latente para a ativa é pouco conhecida. A fosforilação pode ser um mecanismo importante na regulação das suas atividades de supressão tumoral. Várias quinases foram descritas como capazes de fosforilar a *p53 in vitro* (BÁLINT & VOUSDEN, 2001; CADWELL & ZAMBETTI, 2001), e provavelmente *in vivo* (BÁLINT & VOUSDEN, 2001). Essas quinases são a quinase caseína 1 e 2, ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*), ATR (*ATM/Rad3 related kinase*), JNK (*jun N-terminal kinase*),

DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) e CHK 1 e 2 (BÁLINT & VOUSDEN, 2001; LAKIN & JACKSON, 1999). Vários resíduos N-terminais, incluindo Ser15, Ser20 e Ser33, são fosforilados poucos minutos após o dano no DNA inibindo a sua interação com a Mdm2. Além disso, a acetilação pode influenciar a ativação e as funções da p53. Provavelmente, os mecanismos de regulação da p53 se sobrepõem, pois a fosforilação dos resíduos na porção N-terminal facilita a acetilação dos sítios da região C-terminal, formando uma cascata em resposta à lesão do DNA (BÁLINT & VOUSDEN, 2001; CADWELL & ZAMBETTI, 2001).

Recentemente, foram descritos dois genes homólogos ao *p53*, chamados de *p63* e *p73*. A estrutura das proteínas *p63* e *p73* são semelhantes à da *p53*. Esses genes são conhecidos há pouco tempo e por isso suas funções não são bem conhecidas. É possível que *p53*, *p63* e a *p73* participem de algumas vias comuns na indução da apoptose. Além do mais, mutações nos genes *p63* e *p73* não são freqüentes e a sua importância no processo de carcinogênese é desconhecida (SHEIKH & FORNACE, 2000).

C- Gene *K-ras*

A família *ras* é formada por 3 genes que são associados a carcinogênese em humanos: *H-ras*, *K-ras* e *N-ras* (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; MILLS et al, 1995a; SZABO et al, 1993; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; SMIT et al, 1996; WESTRA et al, 1996) que estão localizados no braço curto dos cromossomos 11, 12 e 1, respectivamente (MELO et al, 1997). São os oncogenes mais freqüentes nas neoplasias humanas.(RODENHUIS & SLEBOS, 1990; WESTRA et al, 1993).

Os três genes codificam uma proteína de 21 kD ($p21^{\text{ras}}$) localizada na face interna da membrana celular que se liga ao difosfato de guanosina (GDP) e ao trifosfato de guanosina (GTP) (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; BIRRER & BROWN, 1992; KOBAYASHI et al, 1990; SMIT et al, 1996; SLEBOS et al, 1991), e tem atividade GTPase intrínseca; a forma ativa está ligada ao GTP e a inativa ao GDP (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993). A $p21^{\text{ras}}$ participa da transdução de sinais extracelulares para o interior da célula, através de mecanismos mediados via receptor, durante a divisão celular

(ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; BIRRER & BROWN, 1992; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; SMIT et al, 1996). O sinal é transmitido por uma cascata de quinases, resultando na ativação da MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) que é translocada para o núcleo e ativa os fatores de transcrição (ROM et al, 2000). (Figura 6)

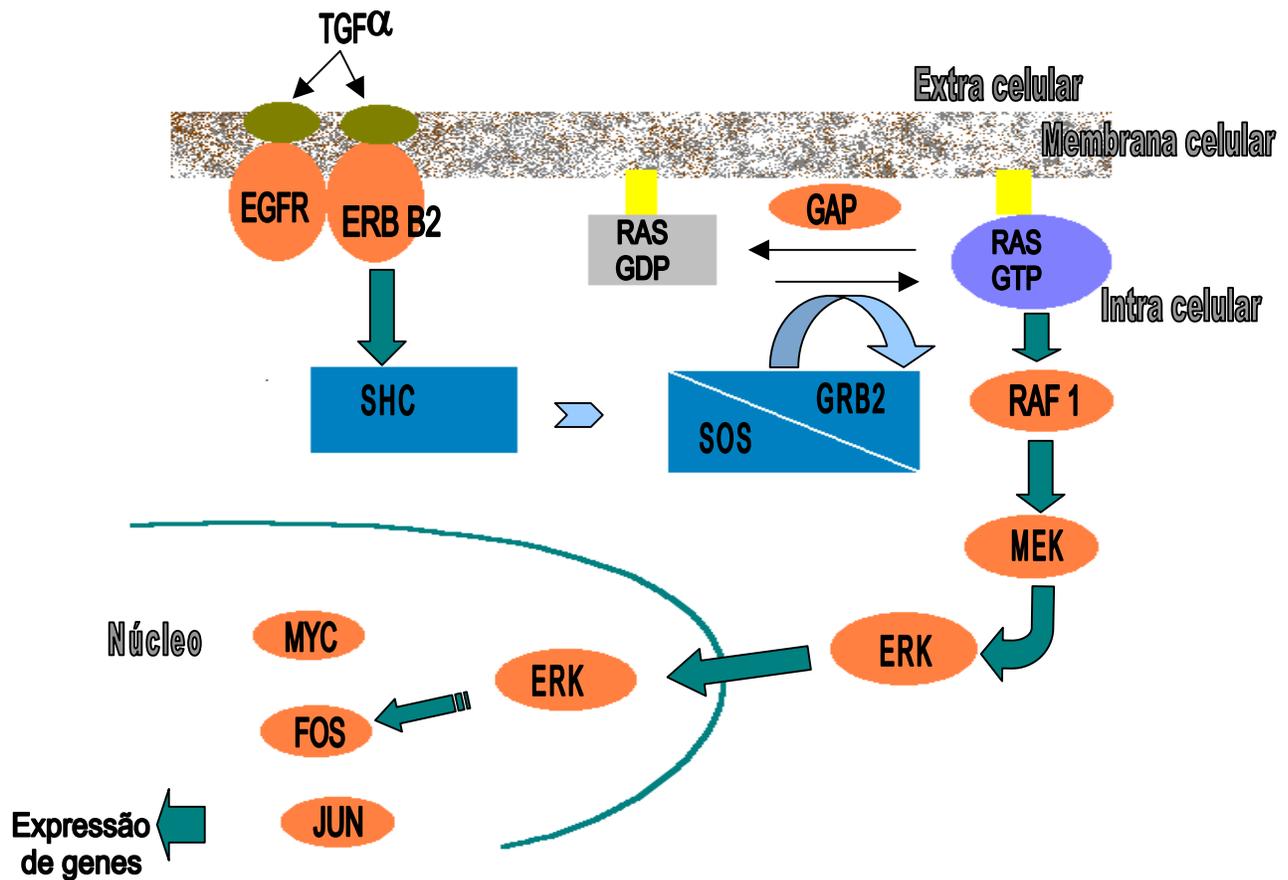


Figura 6: Via e transdução do gene *K-ras*. TGF α Fator de crescimento tumoral α ; SHC: Complexo homólogo Src; SOS: *Sons of Sevenless*; GRB2: Proteína ligante de resposta ao fator de crescimento; GAP: Proteína ativadora de GTPase; GDP: Guanosina difosfato; GTP: Guanosina trifosfato; MEK: Quinase MAPK/ERK

A transformação do gene *ras* em oncogene ocorre após a mutação em uma base no codon 12, porém pode ocorrer também nos codons 13 e 61 (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; KOBAYASHI et al, 1990; MILLS et al, 1995a; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; SLEBOS et al, 1991; SMIT et al, 1996). A presença de mutações em outros codons é rara, mas já foi encontrada nos codons 3, 8 (GEALY et al, 1999), 59 e 63 (WANG et al, 1998a).

A mutação caracteriza-se pela substituição de um aminoácido próximo ao domínio de ligação com a GTP, ocasionando a perda da atividade GTPase da p21^{ras}. Essa perda impede a passagem da proteína da fase ativa para a inativa, perpetuando a transdução inapropriada de sinais de crescimento (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; SLEBOS et al, 1991; SMIT et al, 1996).

Recentemente foi relatado que o *K-ras* normal tem funções de gene supressor, e seria capaz de reduzir o potencial transformador do *ras* oncogênico. Finney & Bishop mostraram que uma mutação de ponto no gene *Hras1* não é suficiente para transformação neoplásica em linhagens celulares, e que pelo menos um evento adicional, seja a amplificação do alelo mutante ou a perda do alelo normal, é necessário (FINNEY & BISHOP, 1993). Estas observações levaram à hipótese de que o alelo *ras* ativado não é, por si só, dominante sobre o alelo normal, e que este pode agir como um supressor da carcinogênese ou transformação celular induzida pelo alelo mutante. Zhang e colaboradores demonstraram que a presença do alelo *K-ras2* normal está associado com redução da carcinogênese em pulmões de ratos, e do fenótipo tumoral de linhagens celulares. Morfologicamente, a perda do alelo normal resultou em adenocarcinomas de pulmão altamente indiferenciados em um curto período de tempo, sugerindo que o *Kras2* normal possa promover a diferenciação de células pulmonares. Este estudo também mostrou que, a atividade da ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*) pode ser inibida pelo aumento da expressão do *Kras2*, e este poderia ser o mecanismo molecular da atividade inibitória do alelo normal (ZHANG et al, 2001).



2. OBJETIVOS

A- Objetivo Geral

Iniciar pesquisa na área de biologia molecular em câncer de pulmão no Serviço de Oncopneumologia da FCM/UNICAMP, na tentativa de obter dados para melhorar a abordagem desta doença.

B- Objetivos específicos:

1. Pesquisar a frequência de mutações nos genes *p53* e *K-ras* em pacientes com carcinoma brônquico, através da biópsia por broncoscopia.
2. Analisar o espectro mutacional do gene *p53* na nossa população.
3. Pesquisar a presença de mutações nos genes *p53* e *K-ras* na carina traqueal normal por broncoscopia, em pacientes com carcinoma brônquico.
4. Pesquisar a presença de células neoplásicas em carina traqueal com aspecto normal na broncoscopia.
5. Correlacionar a presença de mutações no gene *p53* com tabagismo, estadiamento anatômico e prognóstico.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

A- Pacientes

Sessenta e um pacientes encaminhados ao Serviço de Oncopneumologia das Disciplinas de Pneumologia e Cirurgia Torácica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de março/1999 a outubro/2001, submetidos a fibrobroncoscopia para diagnóstico histológico foram incluídos no estudo. Os critérios de exclusão foram: antecedente de doença neoplásica, exceto carcinoma basocelular; tratamento quimioterápico ou radioterápico prévio.

A fibrobroncoscopia foi realizada por via transnasal com anestesia local (broncoscópio Olympus BF-1T20D; Olympus; Tóquio, Japão). Primeiro, foi realizado biópsia da carina principal desde que esta estivesse com aspecto normal, e posteriormente foi obtido o fragmento do tumor (pinças Olympus Standart FB-21C-1 ou Olympus Fenestrada FB-19C-1; Olympus; Tóquio, Japão). Esta seqüência foi estabelecida para evitar a contaminação da pinça e do broncoscópio por células tumorais.. Após a coleta, as amostras separadas para a anatomia patológica foram conservadas em formol 12%, e as amostras para análise molecular foram preservadas em nitrogênio líquido (-70°C) até o momento da extração do DNA ou então, foram encaminhadas para extração imediatamente após a coleta. Não houve diferença na qualidade do DNA obtido dos fragmentos conservados em nitrogênio em relação ao DNA extraído logo após a broncoscopia. As amostras foram identificadas pela ordem de entrada do paciente seguida da letra “T” para identificar a biópsia do tumor e “M” para amostra da mucosa normal.

Os dados dos pacientes e a evolução, foram obtidos durante o acompanhamento clínico e/ou do prontuário médico. Os dados foram coletados em uma ficha de acompanhamento clínico e transpostos para um banco de dados que foi elaborado com o programa EpiInfo 6.

A classificação histológica foi realizada segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde 1981, e o estadiamento anatômico foi realizado pelo sistema TMN proposto por Mountain (MOUNTAIN, 1997). A condição clínica (*performance status*) foi avaliada pela escala de Zubrod (ZUBROD et al, 1960).

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, e todos os pacientes foram orientados e assinaram o termo de consentimento pós-informação.

B- Rotina do laboratório

Para pesquisa de mutações foram realizadas as seguintes técnicas, conforme a amostra:

- Gene *p53* em biópsia de tumor e mucosa, de todos os tipos histológicos: rastreamento por polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP) e seqüenciamento das amostras com mobilidade eletroforética alterada;
- Gene *K-ras* em biópsia de mucosa, de todos os tipos histológicos: rastreamento por SSCP e seqüenciamento das amostras com mobilidade eletroforética alterada;
- Gene *K-ras* em biópsia de tumor, de adenocarcinomas e carcinomas de grandes células: seqüenciamento direto;
- Gene *p53* em DNA obtido do sangue de doadores (grupo controle) para confirmação da mutação encontrada no codon 295: seqüenciamento direto.

O seqüenciamento do gene *p53* foi comparado com o GenBank U94788, e o do gene *K-ras* foi comparado com a seqüência descrita por Kahn e colaboradores (KAHN et al, 1987).

As rotinas e técnicas utilizadas no laboratório estão detalhadas a seguir.

1- Extração de DNA a partir de biópsia

Os fragmentos de biópsias foram submetidos à lise em uma solução tampão de extração Tris-HCl 0,1M pH 7,5 (SIGMA) + SDS 1% (dodecilssulfato de sódio- GIBCO BRL) e adicionou-se 10µl de uma solução contendo 10mg/ml de proteinase K (GIBCO BRL). A solução foi incubada a 55°C por 3 horas ou “overnight”.

Após a incubação foram adicionados 200µl de Fenol (ULTRA CHEM), homogeneizando-se no vortex por 20 segundos e colocando-se mais 200 µl da mistura de clorofórmio (SYNTH) mais álcool isoamílico (MERCK) na proporção 24:1. A amostra foi agitada e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para um novo “ependorf”, repetindo-se o procedimento acima. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi então adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação.

Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido nucléico foi conduzida pela adição de 25 µl de acetato de sódio 3M pH 5,3 e 900 µl de etanol absoluto gelado (MERCK). A mistura foi homogeneizada e incubada no freezer –80°C por 30 minutos. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 900 µl de etanol 70% gelado, repetindo-se a centrifugação e descarte do sobrenadante. O DNA foi solubilizado em água destilada estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro GeneQuant (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Consideraram-se adequadas as amostras com razão entre 1.6 e 1.8, que é dada pela relação espectrofotométrica de OD 260/OD 280.

2- Amplificação e PCR-SSCP para rastreamento de mutações no gene *p53*

O rastreamento dos exons 5 a 10 do gene *p53* foi realizado pelo método de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP), conforme descrito por Orita e colaboradores (ORITA et al, 1989). O método não radioativo foi utilizado com o equipamento “PhastSystem” (PHARMACIA BIOTECH, UPPSALA, SWEDEN).

A amplificação da PCR para os exons 5 a 10 do gene *p53* foi realizada com a utilização de 0,2 µg de DNA genômico (de 1 a 2µl, dependendo da concentração do DNA); 0,5µl de “primer sense”, 0,5 µl do “primer anti-sense” a uma concentração de 15 a 20 pmoles de cada (CLONTECH- PALO ALTO, CA), 5 µl de tampão para PCR (Tris-HCl 200mM pH 8,4 + KCl 500mM), 1µl do mix de dNTP 10mM, 1,5µl MgCl₂ 50 mM e 1 a 1,5

unidade de Taq Polimerase (GIBCO-BRL) em um volume final de 50 µl. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C) anelamento (x°C) e extensão (72°C) em aparelho ciclador de temperatura PTC-100 (MJ-RESEARCH). O último ciclo teve um período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,5 ou 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. A seqüência dos “primers”, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento amplificado estão descritos na tabela III.

A amplificação do exon 4 do gene *p53* foi padronizada com uma amostra de tumor retirado cirurgicamente mas, a mesma padronização não funcionou para as amostras de biópsias obtidas por broncoscopia (ANEXO 2).

Tabela III: seqüência dos primers utilizados (Clontech- Palo Alto, CA), tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento dos exons 5 a 10 do gene *p53*

EXON	SEQÜÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO	T.A (°C)
PU5	5`-CTC TTC CTA CAG TAC TCC CCT GC-3`	211pb	59
PD5	5`-GCC CCA GCT GCT CAC CAT CGC TA-3`		
PU6	5`-GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC-3`	185pb	65
PD6	5`-GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC-3`		
PU7	5`-GTG TTA TCT CCT AGG TTG GCT CTG-3`	139pb	63
PD7	5`-CAA GTG GCT CCT GAC CTG GAG TC-3`		
PU8	5`-ACC TGA TTT CCT TAC TGC CTC TTG C-3`	200pb	62
PD8	5`-GTC CTG CTT GCT TAC CTC GCT TAG T-3`		
PU9	5`-GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC-3`	102pb	59
PD9	5`-CCC AAG ACT TAG TAC CTG AAG GGT G-3`		
PU10	5`-TGT TGC TGC AGA TCC GTG GGC GT-3`	131pb	60
PD10	5`-GAG GTC ACT CAC CTG GAG TGA GC-3`		

PU: “Primer sense” PD:”Primer anti-sense” T.A:Temperatura de Anelamento

A uma alíquota de 3µl do produto da PCR foram adicionados uma solução desnaturante contendo 95% de formamida (GIBCO – BRL), 0,1% de azul de bromofenol (MERCK), 0,1% de xileno cianol (SIGMA) e EDTA (GIBCO – BRL) a 10mM pH 8,0. A diluição se deu nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4.

A mistura foi levada ao termociclador para desnaturar a 95° C por 5 minutos e colocada no gelo rapidamente; 1,0µl da amostra desnaturada foi separada em um gel de poliacrilamida 20% homogêneo de tamanho 43 x 50 x 45mm, em tampão acetato 0,112M e Tris 0,112M pH 6,4 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

As condições da corrida, baseadas nos dados de Mohabeer e colaboradores, 1991, foram:

a) Para os exons 5, 6, 7, 8 e 9:

1- Pré-corrída: 400V; 5,0 mAmp; 1,0W; 15°C; 10Vh

2- Aplicação das amostras: 25V; 5,0mAmp; 1,0W; 15°C; 2Vh

3- Corrida :

Exon 5: 150V; 5,0mAmp; 1W; 15°C; 270Vh

Exon 6: 150V; 5,0mAmp; 1W; 15°C; 200Vh

Exon 7: 150V; 5,0mAmp; 1W; 15°C; 150Vh

Exon 8: 150V; 5,0mAmp; 1W; 15°C; 250Vh

Exon 9: 150V; 5,0mAmp; 1W; 15°C; 190Vh

b) Para o exon 10:

1- Pré-corrída: 400V; 5mAmp; 1W; 4°C; 10Vh

2- Aplicação das amostras: 25V; 5mAmp; 1W; 4°C; 2Vh

3- Corrida: 90V; 5mAmp; 1W; 4°C; 200Vh

Diferentes condições de temperatura e relação voltagem/hora foram testadas para cada exon. As condições relatadas acima foram as que possibilitaram melhor migração eletroforética no SSCP.

A coloração dos géis foi realizada no equipamento PhastSystem seguindo as seguintes etapas:

- 1- Ácido Tricloroacético (MERCK) 20% por 5 minutos a 26°C;
- 2- Glutaraldeído (MERCK) 5% por 5 minutos a 50°C;
- 3- Água deionizada por 2 minutos a 50°C (2 vezes);
- 4- Nitrato de Prata (MERCK) 0,4% por 8 minutos a 40°C;
- 5- Água deionizada por 30 segundos a 30°C (2 vezes);
- 6- Carbonato de sódio (MERCK) 2,5%, contendo formaldeído (SIGMA) 0,01% por 30 segundos a 30°C, seguida por outra incubação por 5 minutos a 30°C;
- 7- Ácido Acético (MERCK) 5% por 2 minutos a 50°C;
- 8- Glicerol (INVITROGEN- LIFE TECHNOLOGIES) 13% por 3 minutos a 50°C.

Função de cada reagente para a coloração do gel (revelação das bandas):

- Ácido Tricloroacético: fixador;
- Glutaraldeído: sensibilizador;
- Água: lavagens;
- Prata: corante;
- Carbonato de cálcio + formaldeído: revelador;
- Glicerol: conservante;
- Ácido Acético: interrupção da reação.

3- Seqüenciamento do gene *p53*

Para a confirmação das alterações de mobilidade eletroforética encontradas no gene *p53*, utilizou-se o seqüenciamento automatizado com o aparelho ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (APPLIED BIOSYSTEMS).

A- Purificação para seqüenciamento

Antes do seqüenciamento, a reação de PCR foi purificada com a utilização do “QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)” ou do “Concert Rapid PCR Purification System” (LIFE TECHNOLOGIES), seguindo-se as instruções do fabricante, como será descrito a seguir:

- Procedimento nº1 (QIAGEN):

- 1- Verificar o volume da PCR e acrescentar 5X o volume de tampão PB. Ex: 20 μ l de PCR + 100 μ l de tampão PB ou 40 μ l de PCR+ 200 μ l de tampão PB;
- 2- Transferir para a coluna;
- 3- Centrifugar por um minuto a 13.000 rpm;
- 4- Descartar o eluente e colocar a coluna no mesmo tubo;
- 5- Acrescentar 750 μ l de tampão PE para lavagem;
- 6- Centrifugar um minuto a 13.000 rpm;
- 7- Descartar o eluente;
- 8- Colocar a coluna novamente no mesmo tubo e centrifugar mais uma vez (um minuto a 13.000 rpm) para remover o etanol residual;
- 9- Colocar a coluna em um novo “eppendorf” (1,5 ml), previamente identificado;
- 10- Acrescentar bem no centro da coluna de 15 a 20 μ l de tampão EB;
- 11- Deixar 1 minuto à temperatura ambiente;
- 12- Centrifugar um minuto a 13.000 rpm;
- 13- Agora o eluente é o produto da PCR purificado.

- Procedimento nº2 (LIFE TECHNOLOGIES):

Antes de começar o procedimento pré-aquecer uma alíquota do tampão TE a 65- 70°C. Adicionar 30ml de etanol no Wash Buffer (H2).

- 1- Adicionar 400µl do “Binding Solution” (H1) na reação amplificada e misturar. Não é necessário remover o óleo. Usar 400 µl de H1 para a reação amplificada com menos de 100 µl, caso a PCR tenha um volume maior que 100 µl, ajustar o volume em 4:1 (para uma proporção de H1:reação amplificada);
- 2- Colocar a coluna dentro de um tubo para lavagem de 2ml. Encher a coluna com a mistura acima (H1 + reação de PCR);
- 3- Centrifugar em microcentrífuga por 1 minuto a 13.000 rpm;
- 4- Descartar o sobrenadante;
- 5- Adicionar 700 µl de “Wash Buffer” (H2) na coluna;
- 6- Centrifugar em microcentrífuga por 1 minuto a 13.000rpm;
- 7- Descartar o sobrenadante e centrifugar novamente por 1 minuto para remover todo o resíduo do “Wash Buffer”;
- 8- Colocar a coluna dentro de um “eppendorf” de 1,5ml. Adicionar 15 µl do tampão TE aquecido, bem no centro da coluna;
- 9- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e então centrifugar por 2 minutos.

B- Quantificação da PCR purificada

A quantificação do produto da PCR purificada foi feita em gel de agarose 1,5%, aplicando-se 2 µl do Low DNA Mass Ladder (GIBCO-BRL) mais 2 µl do azul de bromofenol (MERCK) no primeiro poço. Nos demais, 2 µl das amostras com 2 µl do azul de bromofenol (MERCK). A eletroforese foi realizada em aproximadamente 100 ml de tampão TEB a 90 volts por 20 minutos.

Tendo como resultado a quantificação de cada banda em ng/μl, foi calculada a reação de seqüenciamento usando-se de 5 a 10ng da PCR purificada, 1μl do primer na concentração de 1,6 pmol, 2μl de BigDye (*BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.0 with AmpliTaq DNA Polymerase, FS- AppliedBiosystems*) que contém: dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂, tampão Tris- HCl) e a quantidade necessária de água para completar 10μl. Os primers utilizados foram os mesmos da reação de PCR, diferindo apenas na concentração (1,6 pmol).

A reação de seqüenciamento consistiu de um ciclo de 96°C por 10 segundos; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos; 57°C por 5 segundos; 60°C por 4 minutos; o último ciclo foi prolongado por 10 minutos no aparelho ciclador de temperatura PTC-100 (MJ – RESEARCH).

Ao final dos ciclo, a reação de seqüenciamento foi purificada com álcool isopropílico 75% e etanol 70% conforme os passos a seguir:

- 1- Adicionar 40μl de álcool isopropílico 75% (SYNTH);
- 2- Homogeneizar com o auxílio do vortex e incubar à temperatura ambiente no escuro por 20 minutos;
- 3- Centrifugar a 13.000 rpm por 25 minutos (temperatura ambiente);
- 4- Remover todo o sobrenadante (com muito cuidado, pois o DNA estará grudado na parede do “eppendorf”);
- 5- Adicionar 125μl de etanol 70%;
- 6- Homogeneizar com o auxílio do vortex e centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm;
- 7- Remover todo o sobrenadante;
- 8- Secar as amostras no termociclador a 65 °C por 10 minutos (com a tampa do termociclador aberta);

- 9- Antes de aplicar as amostras em gel de poliacrilamida, diluí-las com 2µl de um corante contendo Formamida (GIBCO-BRL) + Blue Dextran 2000 (Amershan Pharmacia) + EDTA (GIBCO-BRL);
- 10- Centrifugar brevemente a 12.000 rpm e desnaturar a 95 °C por 5 minutos;
- 11- Retirar do termociclador e incubar no gelo por 2 a 3 minutos;
- 12- Aplicar os 2µl da(s) amostra(s) no gel de poliacrilamida do seqüenciador automático (ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER - PERKIN ELMER) (ANEXO 3).

OBS: O seqüenciamento automatizado foi feito no HEMOCENTRO/ UNICAMP.

4- Amplificação do gene *K-ras*

As amplificações dos codons 12,13 e 61 do gene *k-ras* foram realizadas por meio da técnica de PCR, na qual utilizou-se para cada tubo de reação, 0,2 µg de DNA genômico (de 1 a 2µl, dependendo da concentração do DNA); 0,5µl do “primer sense”; 0,5 µl do “primer anti-sense” a uma concentração de 50 pmoles cada (SUGIO et al, 1992); 5 µl de tampão para PCR (Tris-HCl 200mM + KCl 500mM), 1µl do mix de dNTP 10mM, 1,5µl de MgCl₂ 50 mM) e uma unidade de Taq Polimerase (GIBCO-BRL) em um volume final de 50 µl. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C) anelamento (56°C) e extensão (72°C) em aparelho ciclador de temperatura PTC-100 (MJ-Research). O último ciclo teve um período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta.

Tabela IV: Seqüência dos *primers* para o gene *K-ras*.

Codon	Seqüência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)
12,13	GACTGAATATAAACTTGTGG CTATTGTTGGATCATATTCG	108
61	TTCCTACAGGAAGCAAGTAG CACAAAGAAAGCCCTCCCA	128

5- Seqüenciamento do gene *K-ras*.

As amostras de DNA de pacientes com tipo histológico grande células e adenocarcinoma foram seqüenciadas diretamente.

Utilizou-se o seqüenciamento automatizado com o aparelho ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (PERKIN ELMER).

A- Purificação para seqüenciamento

Antes do seqüenciamento, a reação de PCR foi purificada com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) ou com o Concert Rapid PCR Purification System (LIFE TECHNOLOGIES), seguindo-se as instruções do fabricante, como será descrito a seguir:

- Procedimento nº1 (QIAGEN):

1. Verificar o volume da PCR e acrescentar 5X o volume de tampão PB. Ex: 20 µl de PCR + 100 µl de tampão PB ou 40µl de PCR+ 200µl de tampão PB;
2. Transferir para a coluna;
3. Centrifugar por um minuto a 13.000 rpm;
4. Descartar o eluente e colocar a coluna no mesmo tubo;
5. Acrescentar 750µl de tampão PE para lavagem;

6. Centrifugar um minuto a 13.000 rpm;
7. Descartar o eluente;
8. Colocar a coluna novamente no mesmo tubo e centrifugar mais uma vez (um minuto a 13.000 rpm) para remover o etanol residual;
9. Colocar a coluna em um novo “ependorf” (1,5 ml), previamente identificado;
10. Acrescentar bem no centro da coluna de 15 a 20µl de tampão EB;
11. Deixar 1 minuto à temperatura ambiente;
12. Centrifugar um minuto a 13.000 rpm;
13. Agora o eluente é o produto da PCR purificado.

- Procedimento nº2 (LIFE TECHNOLOGIES):

Antes de começar o procedimento pré-aquecer uma alíquota do tampão TE a 65-70°C. Adicionar etanol no “Wash Buffer” (H2).

1. Adicionar 400µl do “Binding Solution” (H1) na reação amplificada e misturar. Não é necessário remover o óleo. Usar 400 µl de H1 para a reação amplificada com menos de 100 µl, caso a PCR tenha um volume maior que 100 µl, ajustar o volume em 4:1 (para uma proporção de H1:reação amplificada);
2. Colocar a coluna dentro de um tubo para lavagem de 2ml. Encher a coluna com a mistura acima (H1 + reação de PCR);
3. Centrifugar em microcentrífuga por 1 minuto a 13.000rpm;
4. Descartar o sobrenadante;
5. Adicionar 700 µl de “Wash Buffer” (H2) na coluna;

6. Centrifugar em microcentrífuga por 1 minuto a 13.000 rpm;
7. Descartar o sobrenadante e centrifugar novamente por 1 minuto para remover todo o resíduo do “Wash Buffer”;
8. Colocar a coluna dentro de um “eppendorf” de 1,5ml. Adicionar 15 µl do TE Tampão aquecido, bem no centro da coluna;
9. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e então centrifugar por 2 minutos;
10. Agora o eluente é o produto do PCR purificado.

B- Quantificação da PCR purificada

A quantificação do produto da PCR purificada foi feita em gel de agarose 1,5%, aplicando-se 2 µl do Low DNA Mass Ladder (GIBCO-BRL) mais 2 µl do azul de bromofenol (MERCK) no primeiro poço. Nos demais, 2 µl das amostras com 2 µl do azul de bromofenol (MERCK). A eletroforese foi realizada em aproximadamente 100 ml de tampão TEB a 90 volts por 20 minutos.

Tendo como resultado a quantificação de cada banda em ng/µl, foi calculada a reação de seqüenciamento, usando-se de 5 a 10ng da PCR purificada, 1µl do primer na concentração de 1,6pmol, 2µl de BigDye (*BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 1.0 with AmpliTaq DNA Polymerase, FS- AppliedBiosystems*) que contém : dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂, tampão Tris- HCl e a quantidade necessária de água para completar 10µl. Os primers utilizados foram os mesmos da reação de PCR, diferindo apenas na concentração (1,6pmol).

A reação de seqüenciamento consistiu de um ciclo de 96°C por 10 segundos; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos; 57°C por 5 segundos; 60°C por 4 minutos; o último ciclo foi prolongado por 10 minutos no aparelho ciclador de temperatura PTC-100 (MJ – RESEARCH).

Ao final do ciclo, a reação de seqüenciamento foi purificada com álcool isopropílico 75% e etanol 70% conforme os passos a seguir:

- 1- Adicionar 40µl de álcool isopropílico 75% (SYNTH);
- 2- Homogeneizar com auxílio do vortex e incubar a temperatura ambiente no escuro por 20 minutos;
- 3- Centrifugar a 13.000 rpm por 25 minutos (temperatura ambiente);
- 4- Remover todo o sobrenadante (com muito cuidado, pois o DNA estará grudado na parede do “eppendorf”);
- 5- Adicionar 125µl de etanol 70%;
- 6- Homogeneizar com auxílio do vortex e centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm;
- 7- Remover todo o sobrenadante;
- 8- Secar as amostras no termociclador a 65 °C por 10 minutos (com a tampa do termociclador aberta);
- 9- Antes de aplicar as amostras em gel de poliacrilamida, diluí-las com 2µl de um corante contendo Formamida (GIBCO-BRL) + Blue Dextran 2000 (Amershan Pharmacia) + EDTA (GIBCO –BRL);
- 10- Centrifugar brevemente a 12.000 rpm e desnaturar a 95 °C por 5 minutos.;
- 11- Retirar do termociclador e incubar no gelo por 2 a 3 minutos;
- 12- Aplicar os 2µl da(s) amostra(s) no gel de poliacrilamida do seqüenciador automático (ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER - PERKIN ELMER) .

OBS: O seqüenciamento automatizado foi feito no HEMOCENTRO/ UNICAMP.

6- SSCP para rastreamento de mutações no gene *K-ras* em mucosas.

Nas amostras de mucosa em que não havia exame histológico, foi realizado o rastreamento dos codons 12, 13 e 61 pelo método de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP – *Single Strand Conformation Polymorphisms*), conforme descrito por Orita e colaboradores (ORITA et al, 1989). O método não radioativo foi utilizado com o equipamento “PhastSystem” (PHARMACIA BIOTECH, UPPSALA, SWEDEN).

À uma alíquota de 3µl do produto da PCR foram adicionados uma solução desnaturante contendo 95% de formamida (GIBCO – BRL), 0,1% de azul de bromofenol (MERCK), 0,1% de xileno cianol (SIGMA) e EDTA (GIBCO – BRL) 10mM pH 8,0. A diluição se deu nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4.

A mistura foi levada ao termociclador para desnaturar a 95° C por 5 minutos e colocada no gelo rapidamente. Um microlitro da amostra desnaturada foi separada em gel de poliacrilamida 20% homogêneo de tamanho 43 x 50 x 45mm, em tampão acetato 0,112M e Tris 0,112M pH 6,4 (Amersham Pharmacia Biotech).

Padronização no “PhastSystem” dos codons 12, 13 e 61 para o gene *K-ras*:

1- Pré- corrida: 400V; 10mA; 2,5W; 15°C; 100Vh

2- Aplicação : 400V; 1 mA; 2,5W; 15°C; 3Vh

3- Corrida : 400V; 10mA; 2,5W; 15°C; 300Vh

7- Extração de DNA de sangue do grupo controle para o SSCP, e para o seqüenciamento do codon 295

Para a lise das hemácias utiliza-se uma solução de Cloreto de Amônia (MERCK) 100 ml + Bicarbonato de Amônia (MERCK) 10ml.

1. Centrifugar a 1200rpm por 10 minutos o sangue coletado (tubo de hemograma-EDTA);
2. Retirar a papa leucocitária e passar para um tubo cônico, contendo a solução de Cloreto de Amônia + Bicarbonato de Amônia;

3. Homogeneizar por inversão de 5min em 5 minutos por 15 minutos;
4. Centrifugar por 15min a 3000 rpm;
5. Retirar o sobrenadante e repetir o procedimento até que o “pellet” esteja branco e sem hemácias;
6. A este “pellet”, adicionar 10ml de tampão de lise leucócitos (10ml de NaCl 5M; 25ml de EDTA 0,2M; 2,5ml de Tris-HCl 2M pH7,5 e 500ml de água estéril e destilada), 4,2g de uréia + 1ml de SDS 20%;
7. Dissolver o “pellet” e deixar em banho-maria a 37°C “overnight”;
8. Adicionar 1 volume de fenol: clorofórmio 1:1;
9. Agitar 10min lentamente;
10. Centrifugar por 10min a 3000 rpm;
11. Transferir a fase superior para outro tubo com cuidado para não pegar a camada interfásica (proteínas que estão sendo retiradas);
12. Repetir a extração com fenol-clorofórmio;
13. Fazer duas extrações com clorofórmio + álcool isoamílico 24:1;
14. Após a última extração, transferir a fase superior para um novo tubo, adicionar 25µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 e homogeneizar por inversão;
15. Adicionar 2,5 vol de etanol absoluto gelado -20°C e homogeneizar até que o DNA esteja totalmente precipitado;
16. Transferir o DNA para um “eppendorf” e adicionar 1ml de etanol 70%;
17. Centrifugar por 10min a 13000 rpm;
18. Desprezar o sobrenadante e deixar o tubo secar (10 minutos) à temperatura ambiente;
19. Ressuspender o DNA em água estéril.



4. RESULTADOS

Foram obtidas amostras de carcinoma brônquico de 61 pacientes, e em 10 não houve amplificação de DNA. Dos 51 pacientes selecionados, 42 eram portadores de carcinoma de pulmão não pequenas células (82,4%) e 9 de carcinoma de pulmão de pequenas células (17,6%). O carcinoma epidermóide correspondeu a 49% (25/51) dos casos, o adenocarcinoma a 17,6% (9/51), carcinoma indiferenciado de grandes células e carcinoma indiferenciado tiveram a mesma frequência, 7,8% (4/51).

A média de idade foi de 63,8 anos (35-85 anos), para os homens 64,3 anos (40-85 anos) e para as mulheres 60,8 anos (35-76 anos). Houve predomínio do sexo masculino (86,3% 44/51). Em relação à raça, não tivemos pacientes de origem oriental e houve um predomínio de pacientes brancos sobre não brancos (negros e pardos), respectivamente 82,4% (42/51) e 17,6% (9/51). Trinta e seis (70,6%) pacientes eram provenientes de Campinas e região, 9 (17,6%) de outras regiões do estado de São Paulo, e 6 (11,8%) eram provenientes de outros estados da federação.

Com exceção de uma paciente, com carcinoma de pequenas células, todos os outros eram fumantes. A média de tabagismo expressa em anos/maço foi de 64,1. Entre os pacientes com mutação essa média foi de 70,5 anos/maço e entre os sem mutação foi de 62,1 anos/maço ($p=0,7$).

A maioria das lesões ocorreu no pulmão esquerdo (60,8%), enquanto que no pulmão direito as lesões foram encontradas em 35,3% dos casos e em dois pacientes a lesão acometia ambos os pulmões (3,9%). A localização da lesão por lobos pulmonares está detalhada no gráfico 1.

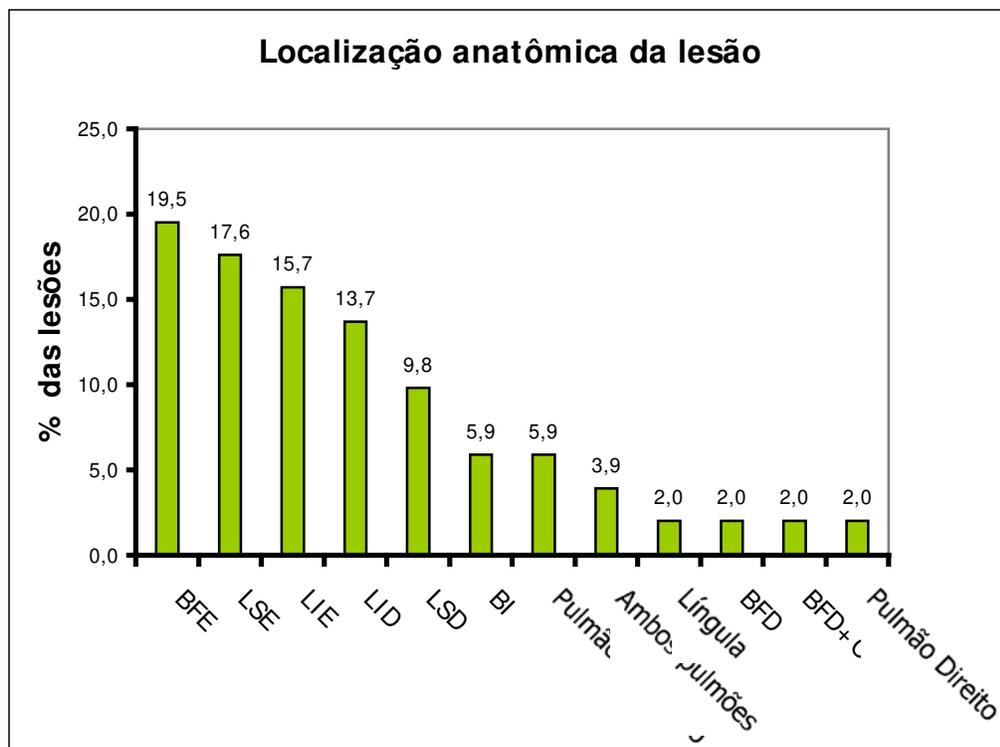


Gráfico 1: Distribuição anatômica das lesões endobrônquicas.(BFE:bronco fonte esquerdo; LSE:lobo superior esquerdo; LIE:lobo inferior esquerdo; LID:lobo inferior direito; LSD:lobo superior direito; BI: Brônquio intermediário; BFD:brônquio fonte direito).

O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 4,8 meses, e não variou quando analisamos todos os pacientes juntos ou separados entre portadores de carcinoma de pequenas células e de carcinoma não pequenas células.

Os sintomas de apresentação estão relacionados no gráfico 2. Neste gráfico, no grupo determinado como “outros” incluímos os seguintes sintomas: dor óssea (3,9%), gânglio periférico (3,9%), síndrome de veia cava superior (2%) e sintoma neurológico por invasão do canal medular (2%). Em relação ao emagrecimento, a média de perda de peso foi de 2792 g/mês (300-15000 g/mês).

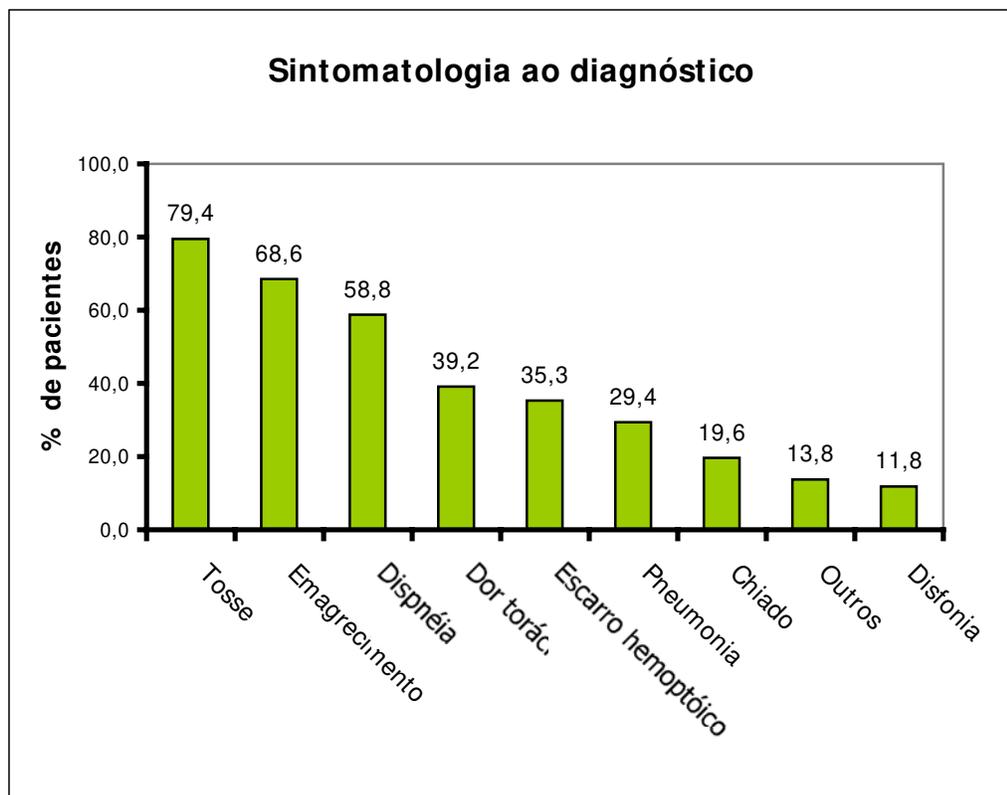


Gráfico 2: Sintomatologia no momento do diagnóstico

As características clínicas dos pacientes estão detalhadas nas tabelas V e VIII.

Tabela V: Características dos pacientes com carcinoma de pequenas células.

	Todos Pacientes	Homens	Mulheres
Sexo		7 (77,8%)	2 (22,2%)
Idade (anos)			
Média	59,5	58,8	61,5
Faixa	40-74	40-74	51-72
Raça			
Branca	7 (77,8%)	7 (100%)	0
Negra	1 (11,1%)	0	1 (50%)
Parda	1 (11,1%)	0	1 (50%)
Fumantes	8 (88,9%)	7 (100%)	1 (50%)
Estadio			
Doença localizada	3 (33,3%)	2 (28,5%)	1 (50%)
Doença disseminada	6 (66,6%)	5 (71,4%)	1 (50%)
Zubrod			
0	1 (11,1%)	1 (14,3%)	0
1	5 (55,6%)	3 (42,9%)	2 (100%)
2	1 (11,1%)	1 (14,3%)	0
3	1 (11,1%)	1 (14,3%)	0
4	1 (11,1%)	1 (14,3%)	0

Tabela VI: Características dos pacientes com carcinoma de pequenas células e com mutação no gene p53. (Todos são do sexo masculino).

Pacientes	
Idade (anos)	
Média	52,6
Faixa	40-74
Raça	
Branca	3 (100%)
Fumantes	3 (100%)
Estadio	
Doença localizada	1 (33,3%)
Doença disseminada	2 (66,6%)
Zubrod	
0	1 (33,3%)
1	1 (33,3%)
3	1 (33,3%)

Tabela VII: Características dos pacientes com carcinoma não pequenas células.

	Todos Pacientes	Homens	Mulheres
Sexo		37 (88%)	5 (11,9%)
Idade (anos)			
Média	64,7	65,3	60
Faixa	35-85	47-85	35-76
Raça			
Branca	35 (83,3%)	31 (83,8%)	4 (80%)
Negra	6 (14,3%)	5 (13,5%)	1 (20%)
Parda	1 (2,4%)	1 (2,7%)	0
Fumantes	42 (100%)	37 (100%)	5 (100%)
Tipo histológico			
Carc. Epidermóide	25 (59,5%)	22 (59,5%)	3 (60%)
Adenocarcinoma	9 (21,4%)	7 (18,9%)	2 (40%)
Grandes células	4 (9,5%)	4 (10,8%)	0
Indiferenciado	4 (9,5%)	4 (10,8%)	0
Estadio			
IA	1 (2,4%)	1 (2,7%)	0
IB	1 (2,4%)	0	1 (20%)
IIB	1 (2,4%)	1 (2,7%)	0
IIIA	3 (7,1%)	3 (8,1%)	0
IIIB	20 (47,6%)	17 (45,9%)	3 (60%)
IV	16 (38%)	15 (40,5%)	1 (20%)
Zubrod			
0	2 (4,8%)	2 (5,4%)	0
1	24 (57,1%)	20 (54,1%)	4 (80%)
2	8 (19%)	8 (21,6%)	0
3	7 (16,7%)	6 (16,2%)	1 (20%)
4	1 (2,4%)	1 (2,7%)	0

Tabela VIII: Características dos pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células e com mutação no gene p53.

	Todos Pacientes	Homens	Mulheres
Sexo		6 (66,6%)	2 (33,3%)
Idade (anos)			
Média	62,2	60	69
Faixa	49-76	49-74	62-76
Raça			
Branca	7 (87,5%)	6 (100%)	1 (50%)
Negra	1 (12,5%)	0	1 (50%)
Fumantes	8 (100%)	6 (100%)	2 (100%)
Tipo histológico			
Carc. Epidermóide	4 (50%)	2 (33,3%)	2 (100%)
Adenocarcinoma	1 (12,5%)	1 (16,6%)	0
Grandes células	2 (25%)	2 (33,3%)	0
Indiferenciado	1 (12,5%)	1 (16,6%)	0
Estadio			
IB	1 (12,5%)	0	1 (50%)
IIIB	3 (37,5%)	3 (50%)	0
IV	4 (50%)	3 (50%)	1 (50%)
Zubrod			
1	5	3	2
2	2	2	0
3	1	1	0

Entre os pacientes com carcinoma de pequenas células, 3 estavam vivos e em tratamento até a data de encerramento do acompanhamento (31/12/2001). Um destes foi submetido à quimioterapia neoadjuvante e pneumectomia direita. Dois pacientes perderam seguimento clínico e não foi possível localizá-los, quatro faleceram e tivemos acesso à data do óbito. A sobrevida destes pacientes foi de 7, 24, 39 e 854 dias.

Entre os pacientes com carcinoma não pequenas células, dez estavam vivos até a data de encerramento do acompanhamento. Destes, quatro estavam em tratamento. Dois pacientes perderam seguimento clínico e não foi possível localizá-los, trinta faleceram e tivemos acesso à data do óbito. A sobrevida média foi de 246 dias (1-850 dias).

A pesquisa de mutação no gene *K-Ras* foi realizada nos codons 12, 13 e 61 de todos os carcinomas indiferenciados de grandes células e em 8 dos nove pacientes com adenocarcinoma. Não encontramos mutações nesse gene.

Em relação ao *p53*, a pesquisa foi feita entre os exons 5 e 10. Para o exon 4 foi possível padronizar a técnica de PCR a partir de amostras de carcinoma brônquico obtidas na cirurgia. Porém, por razões técnicas não identificadas, não ocorreu a amplificação do DNA da biópsia retirada durante a broncoscopia. O tamanho diminuto das amostras que dispúnhamos, impediu que tentássemos descobrir o motivo da falha na amplificação já que, havia o risco de esgotarmos o DNA somente nessas tentativas.

Em cinco pacientes, um ou mais exons do gene *p53* não foram amplificados. O fato de conseguirmos amplificar outros exons indica que havia DNA em quantidade e qualidade suficientes para amplificação por PCR.

Nos pacientes com carcinoma de pequenas células, somente no paciente 59T não ocorreu a amplificação do exon 10. Nos demais pacientes não encontramos nenhuma mutação nesse exon. Por esse motivo optamos por analisar os exons 5 a 9 nesse grupo, e encontramos 3 mutações em nove pacientes ou seja, uma frequência de 33,3%. As mutações ocorreram nos codons 152, 153 e 173. No codon 153 ocorreu uma mutação do tipo *frameshift* por inserção de uma timina e, provavelmente, deleção do alelo correspondente levando à perda da heterozigose (LOH). Nos outros dois ocorreu uma mutação do tipo *missense*, no codon 152 houve uma transversão C→A e no codon 173 uma transversão G→T (tabela VII).

No grupo do carcinoma não pequenas células, ocorreram as seguintes falhas na amplificação do DNA para pesquisa de mutações no gene *p53*: nos pacientes 2T e 19T só ocorreu a amplificação do exon 5; no 60T somente os exons 5 e 10 foram amplificados; e no paciente 23T o exon 9 não foi amplificado (veja o mapa de pacientes – ANEXO 4). Portanto, analisando somente os pacientes que tiveram amplificação dos exons 5 a10, encontramos 8 mutações em 38 pacientes (21%).

Tabela IX: Mutações encontradas no gene *p53*.

Paciente	Tipo histológico	Exon	Codon	Antigo	Novo	Troca	AA	Tipo de mutação
2T	CPPC	5	173	GTG	TTG	G>T	Val>Leu	Missense
5T	CPPC	5	153	CCC	CCT	insT	Pro>Pro	Frameshift + (LOH)
56T	CPPC	5	152	CCG	ACG	C>A	Pro>Thr	Missense
15T	CEC	7	237	ATG	AAG	T>A	Met>Lys	Missense
22T	CEC	5	159	GCC	CCC	G>C	Ala>Pro	Missense
30T	Indiferenciado	8	295	CCT	CCC	T>C	Pro>Pro	Missense/Silenciosa
35T	Adenocarcinoma	7	249	AGG	ATG	G>T	Arg>Val	Missense

***CPPC**:carcinoma de pequenas células, **CEC**:carcinoma epidermóide, **Antigo**:codon normal, **Novo**:codon mutado, **AA**:aminoácido, **LOH**:perda da heterozigose, **insT**:inserção de timina.

Ao verificar a frequência de mutações por exon, considerando o número total de pacientes que tiveram o exon amplificado, chegaremos às seguintes frequências:

- exon 5: 2,3% (1/42);
- exon 6: 0% (0/39);
- exon 7: 5,1% (2/39);
- exon 8: 7,7% (3/39);
- exon 9: 0% (0/38);
- exon 10: 5% (2/40).

As mutações ocorreram nos codons 159, 237, 249, 275, 285, 295 e 337. Duas mutações foram identificadas no codon 337. No codon 295 foi encontrada uma mutação silenciosa (CCT→CCC). Todas elas foram do tipo *missense* com predomínio de transições (62,5%), G→A (50% - 4/8) e T→C (12,5% - 1/8); as transversões encontradas foram T→A (12,5% - 1/8), G→C (12,5%) e G→T (12,5%).

Devido ao pequeno número de pacientes com carcinoma não pequenas células, não foi possível realizar uma análise estatística detalhada. Observamos que a presença de mutação não interferiu na sobrevida ($p=0,53$), no estadiamento anatômico ($p=0,67$) e no tempo de sintomatologia ($p=0,15$). Não houve diferença na sobrevida entre os pacientes com carcinoma epidermóide e adenocarcinoma ($p=0,42$). Como o número de pacientes com carcinoma de pequenas células foi pequeno, não realizamos qualquer análise estatística.

Encontramos também, polimorfismo no codon 213 (CGA→CGG) em dois pacientes, um com carcinoma epidermóide (50T) e outro com carcinoma indiferenciado (26T).

Conseguimos realizar o exame anatomo-patológico em apenas 16 amostras de mucosa. Os achados foram os seguintes: traquéia normal em oito amostras; três com processo inflamatório; metaplasia em uma amostra e displasia leve em outra; carcinoma *in situ* em duas amostras e carcinoma epidermóide em um fragmento.

Não encontramos alterações na mobilidade eletroforética ou no seqüenciamento, do gene *K-ras* nos codon 12,13 e 61 em 28 amostras de mucosa; em 23 amostras não conseguimos amplificar o DNA para realizar a pesquisa. Na análise do gene *p53*, conseguimos analisar todos os exons do 5 ao 10 em 23 pacientes, em outros 23 a análise foi incompleta e em 5 não ocorreu a amplificação do DNA (ANEXO 5).

Na amostra 49M que é normal na histologia, encontramos uma mutação no exon 10, codon 337 (CGC→CAC), semelhante à encontrada no tecido neoplásico. No fragmento 50M encontramos o mesmo polimorfismo visto na biópsia do tumor, no codon 213 (CGA→CGG), e a histologia da mucosa é normal. Na biópsia 30M encontramos a mutação silenciosa no codon 295 (CCT→CCC), porém não temos a análise histológica.

Para confirmar se a alteração no codon 295 era uma mutação silenciosa ou um polimorfismo, realizamos o seqüenciamento automático do exon 8 em 50 amostras de DNA obtido de sangue (linfócitos) de doadores, que constituíram o grupo controle. Como a alteração não foi encontrada nesse grupo, concluímos que se trata de uma mutação silenciosa.

As fotos dos géis de SSCP e os eletroferogramas das mutações encontradas, estão representados nas figuras a seguir (Figuras 7-18).

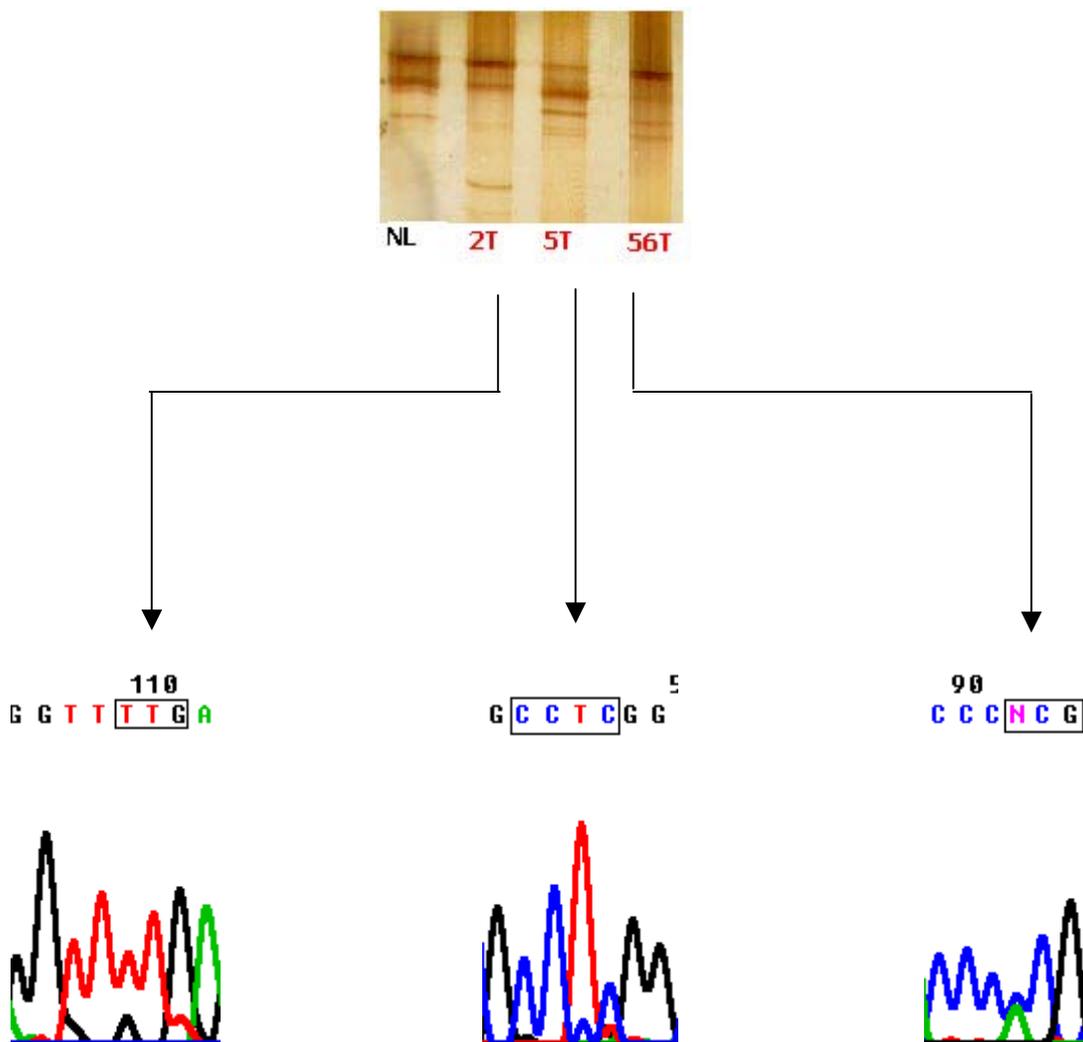


Figura 7: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 5 do gene *p53* em amostras de tumor de pacientes com carcinoma de pequenas células. NL: controle da normalidade. Pacientes 2T, 5T e 56 T apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. Abaixo estão representados os seqüenciamentos de DNA. Paciente 2T: mutação no codon 173, resíduo 13196, levando à troca do aminoácido Valina por Leucina (GTG→TTG) em heterozigose. Paciente 5T: mutação no codon 153, por inserção de uma Timina entre os resíduos 13137 e 13138, e deleção do alelo. Paciente 56T: mutação no codon 152, resíduo 13133, levando à troca do aminoácido Prolina por Treonina (CCG→ACG) em heterozigose.

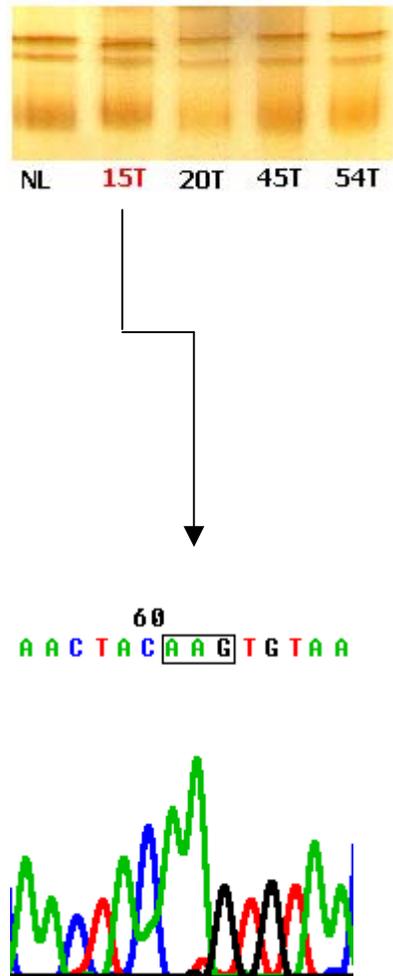


Figura 8: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 7 do gene *p53* em amostras de carcinoma de não pequenas células . NL: controle da normalidade. Pacientes 20T, 45T e 54T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 15T apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 237, resíduo 14037, levando à troca do aminoácido Metionina por Lisina (ATG→AAG) em homozigose.

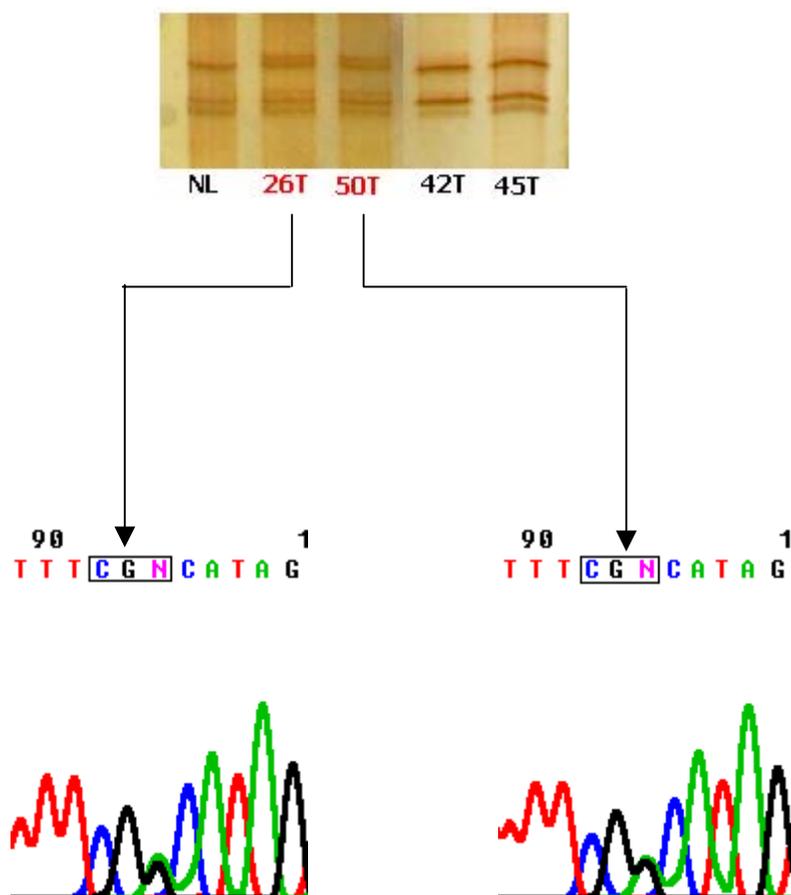


Figura 9: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 6 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Pacientes 42T e 45T: mobilidade eletroforética normal. Pacientes 26T e 50T apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com polimorfismo no codon 213, resíduo 13399, CGA→CGG.

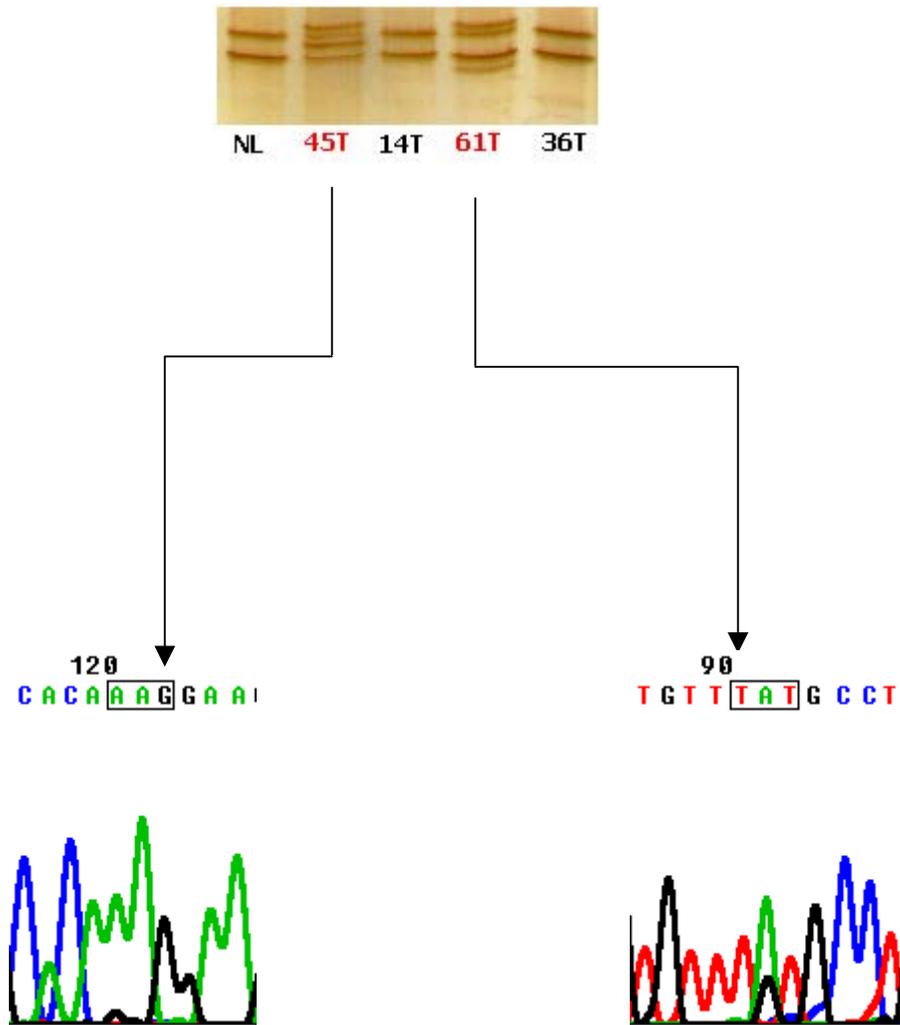


Figura 10: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 8 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Pacientes 14T e 36T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 45T e 61T apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento. Paciente 45T apresenta mutação no codon 285, resíduo 14522, levando à troca do aminoácido Glutamina por Lisina (GAG→AAG) em homozigose. Paciente 61T apresenta mutação no codon 275, resíduo 14493, levando à troca do aminoácido Cisteína por Tirosina (TGT→TAT) em heterozigose.

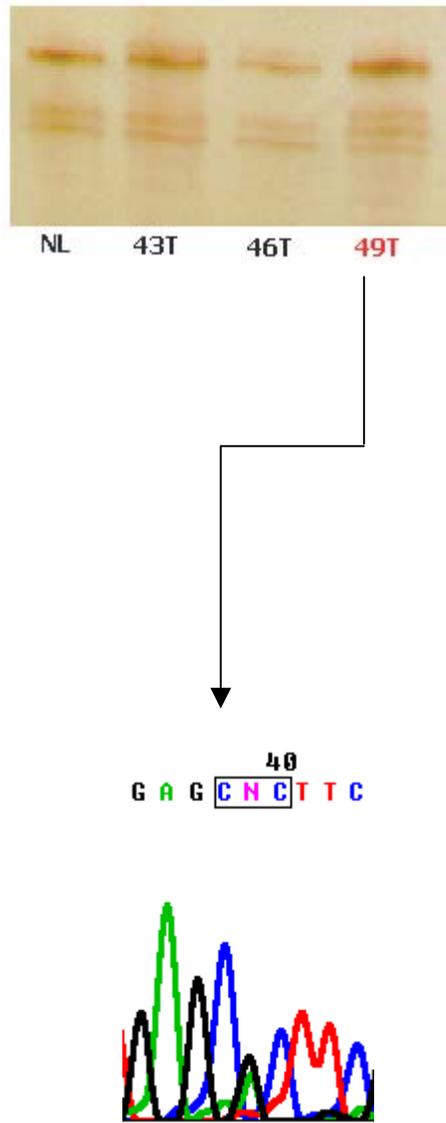


Figura 11: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 10 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Pacientes 43T e 46T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 49T apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 337, resíduo 17588, levando à troca do aminoácido Arginina por Histidina (CGC→CAC) em heterozigose.

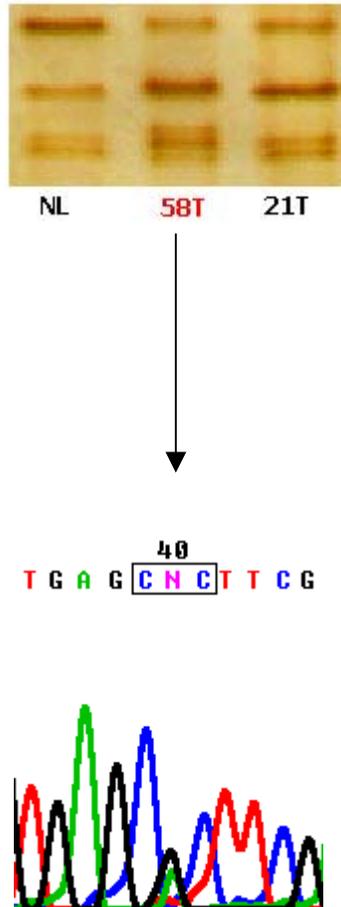


Figura 12: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 10 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Paciente 21T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 58T apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 337, resíduo 17588, levando à troca do aminoácido Arginina por Histidina (CGC→CAC) em heterozigose.

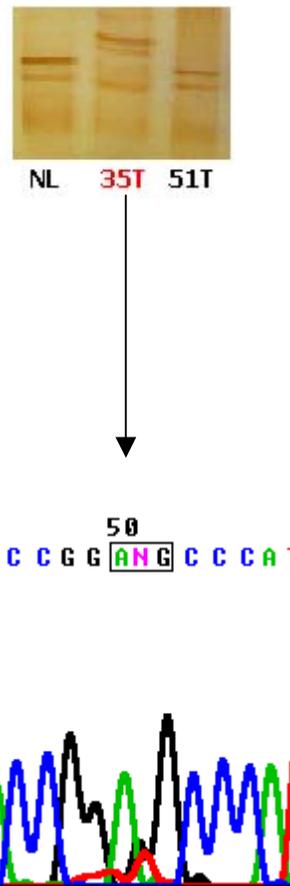


Figura 13: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 7 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Paciente 51T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 35T apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 249, resíduo 14073, levando à troca do aminoácido Arginina por Valina (AGG→ATG) em heterozigose.

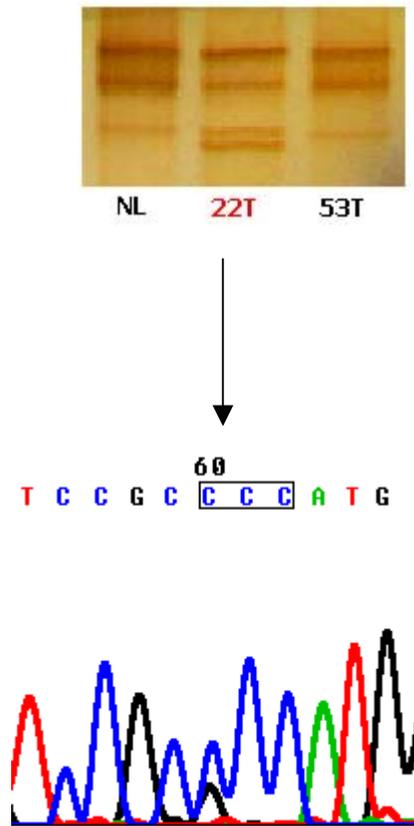


Figura 14: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 5 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Paciente 53T: mobilidade eletroforética normal. Paciente 22T apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 159, resíduo 13154, levando à troca do aminoácido Alanina por Prolina (GCC→CCC) em heterozigose.

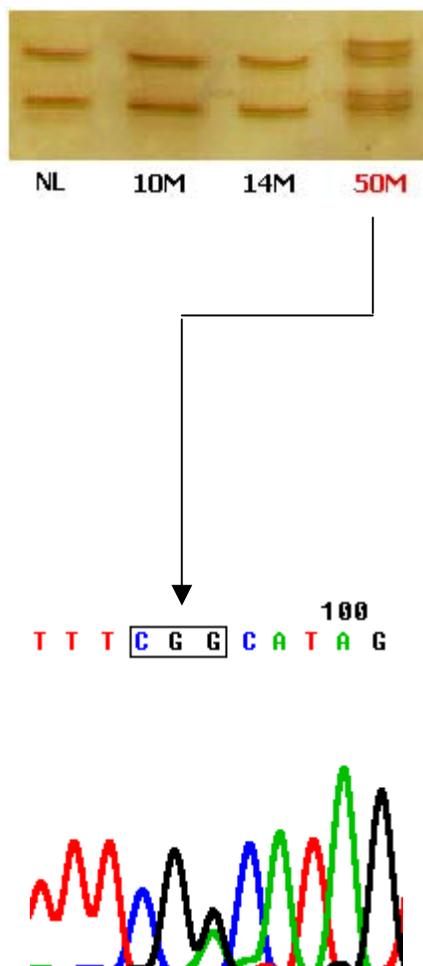


Figura 15: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 6 do gene *p53* em mucosa brônquica. NL: controle da normalidade. Paciente 10M e 14M: mobilidade eletroforética normal. Paciente 50 apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com polimorfismo no codon 213, resíduo 13199, CGA→CGG, em heterozigose.

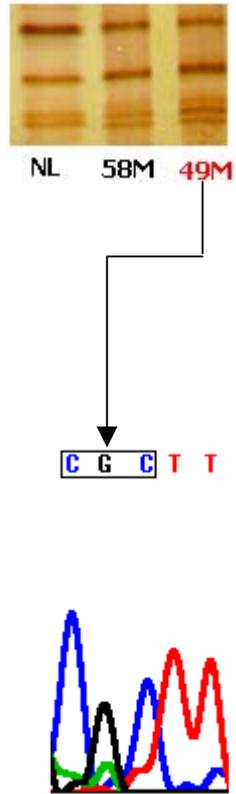


Figura 16: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 10 do gene *p53* em mucosa brônquica. NL: controle da normalidade. Paciente 58M: mobilidade eletroforética normal. Paciente 49M apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 337, resíduo 17588, levando à troca do aminoácido Arginina por Histidina (CGC→CAC) em heterozigose.

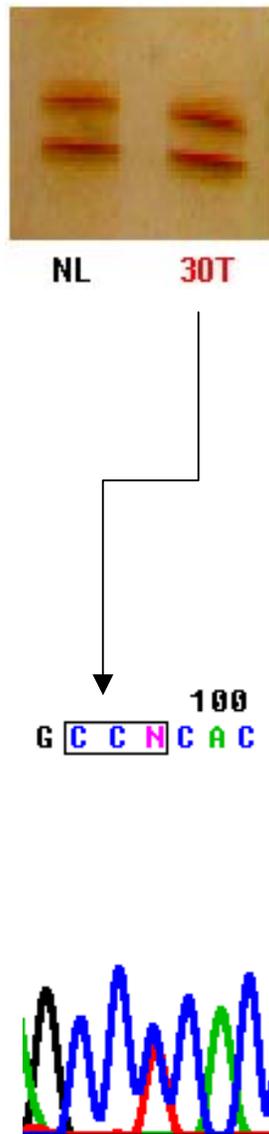


Figura 17: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 8 do gene *p53* em amostras de tumor. NL: controle da normalidade. Paciente 30T: apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 295, resíduo 14552, mutação silenciosa (Pro>Pro), em heterozigose.

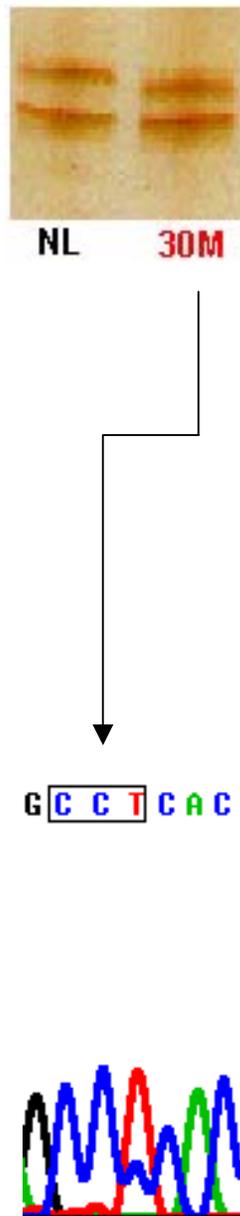


Figura 18: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto da PCR contendo o exon 8 do gene *p53* em amostras de mucosa. NL: controle da normalidade. Paciente 30M: apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada à normalidade. Abaixo, análise por seqüenciamento consistente com mutação no codon 295, resíduo 14552, mutação silenciosa em heterozigose (Pro>Pro).



5. DISCUSSÃO

No período de março/1999 a outubro/2001, selecionamos pacientes submetidos a broncoscopia para diagnóstico de carcinoma brônquico com a intenção de correlacionar os achados clínicos com as alterações moleculares. Neste período obtivemos biópsias de 61 pacientes, porém 10 foram excluídos porque não houve amplificação do DNA. É importante salientar que nos 32 meses de duração do estudo, o Serviço de Oncopneumologia FCM – UNICAMP atendeu um número muito maior de pacientes no setor de broncoscopia e que foram encaminhados para diagnóstico de neoplasia de pulmão. Como o nosso universo de estudo era composto por pacientes com lesão endobrônquica visível ao fibrobroncoscópio, ficamos limitados aos pacientes que apresentavam lesão neoplásica central. Além disso, deixamos de obter biópsias de vários pacientes que apresentaram alguma intercorrência durante o procedimento, tais como hemoptise, hipóxia ou acessos de tosse. Por esses motivos, a população do nosso estudo pode não corresponder sob alguns aspectos às características descritas para os pacientes com carcinoma de pulmão.

Dos 51 pacientes selecionados, 42 eram portadores de carcinoma não pequenas células (82,35%) e 9 de carcinoma de pequenas células (17,6%), proporção semelhante à descrita na literatura (TRAVIS et al, 1995). O carcinoma epidermóide correspondeu a 49% (25/51) dos tipos histológicos, uma incidência bem acima da descrita na literatura que é em torno de 30%. A incidência de adenocarcinoma foi de 17,6% (9/51), e a média descrita na literatura é um pouco abaixo de 30% (TRAVIS et al, 1995). Estas diferenças podem ser explicadas por incluirmos no estudo somente pacientes com lesões acessíveis ao fibrobroncoscópio ou seja, lesões centrais. Como cerca de dois terços dos carcinomas epidermóides estão localizados na porção central, era esperado que encontrássemos uma maior incidência desse tipo histológico na população estudada. O carcinoma de grandes células correspondeu a 7,8% dos nossos pacientes, incidência semelhante à da literatura, cerca de 9% (TRAVIS et al, 1995).

A localização central da lesão neoplásica também explica a frequência dos sintomas, pois a maioria dos pacientes apresentou tosse (79,4%) e dispnéia (58,8%). Emagrecimento foi uma queixa frequente, e já foi descrito como sintoma importante em outros trabalhos realizados no nosso serviço (BARBEIRO, 2001; ZAMBON, 1994).

Houve um predomínio de pacientes do sexo masculino (86,3%) e da raça branca (82,4%). Comparando a incidência de câncer de pulmão entre homens e mulheres, esta relação é de 1,12:1,0 na população norte-americana e de 2,6:1,0 na população brasileira (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2002; INCA, 2001). Como a maioria dos carcinomas epidermóides está localizada na região central e tem uma maior incidência no sexo masculino, enquanto que os adenocarcinomas são mais freqüentes na periferia do pulmão e no sexo feminino, era esperado que no estudo houvesse um número maior de homens. Nos Estados Unidos a incidência de câncer de pulmão na população negra é bem maior do que na branca, respectivamente 71,6/100.000 e 54,7/100.000; além disso, a taxa de mortalidade também é maior nos negros – 59,1/100.000 *versus* 48,8/100.000 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2002). Encontramos um predomínio da raça branca entre os pacientes incluídos no estudo, fato que já ocorreu em outros trabalhos desenvolvidos no nosso serviço (BARBEIRO, 2001; TORO, 2000; ZAMBON, 1994). Uma possível explicação para esse fato é que a miscigenação é muito grande no nosso país levando à dificuldade em definir quem não é branco, e pacientes que são mulatos acabam classificados como brancos. Na população brasileira aparentemente não há nenhum estudo mostrando maior incidência ou mortalidade segundo a raça (MAHARI, 2002).

O carcinoma brônquico é dividido em dois grupos, chamados de carcinoma de pulmão não pequenas células (CPNPC) e carcinoma de pulmão pequenas células (CPPC). Esta diferenciação ocorre devido às características patológicas peculiares do CPPC, que possui um comportamento biológico diferente, exigindo uma abordagem terapêutica diferenciada em relação ao CPNPC.

Por este motivo a discussão será feita em tópicos distintos.

A- Carcinoma de pulmão não pequenas células

1. Gene *p53*

Mais de 50% de todos os tumores humanos possuem uma mutação no gene *p53* (GREENBLATT et al, 1994), e provavelmente é a alteração mais freqüente em todas as neoplasias humanas (HARRIS, 1996).

Não está estabelecido se no carcinoma de pulmão não pequenas células há diferença na freqüência de mutações no gene *p53* entre homens e mulheres. Murakami e colaboradores não encontraram relação entre a presença de mutações e o sexo, porém a amostra do estudo era pequena ($n=70$) (MURAKAMI et al, 2000). Dois estudos de meta-análise não fazem referência sobre a influência do sexo na freqüência de mutações no gene *p53* (HUNCHAREK et al, 2000; STEELS et al, 2001). Entretanto, um estudo escandinavo relatou-se que mulheres têm um nível maior, mais ou menos o dobro, de ligação de policíclicos aromáticos ao DNA do que os homens, e também apresentam mais transversões G→T, apesar de consumirem uma quantidade menor de cigarro e de terem uma freqüência mais baixa de mutações no gene *p53* (RYBERG et al, 1994b; KURE et al, 1996). Outros estudos confirmaram a maior incidência de transversões G→T em mulheres (GUINEE et al, 1995; BENNETT et al, 1999).

Entretanto, a freqüência da mutação no carcinoma brônquico varia conforme o tipo histológico. No carcinoma não pequenas células a incidência varia de 18 a 71%, sendo que a maioria dos trabalhos relata em torno de 43 a 55%. A freqüência da mutação é maior no carcinoma epidermóide (55 a 71%) do que no adenocarcinoma (26 a 52%) (JASSEM et al, 2001; KISHIMOTO et al, 1992; LEE et al, 1994; MARCHETTI et al, 1993; MILLER et al, 1992; NUORVA et al, 1993; RYBERG et al, 1994; SHIPMAN et al, 1995; SUZUKI et al, 1992; WANG et al, 1998b; ZHENG et al, 1994).

Uma explicação para esta grande variação na incidência de mutações no gene *p53* em carcinoma não pequenas células é a influência de fatores étnicos. Em um estudo realizado em Hong Kong, foi encontrada uma diferença significativa na incidência de mutações entre mulheres chinesas e japonesas, 20 e 31% respectivamente (TAKAGI et al,

1995). Porém na meta-análise realizada por Huncharek e colaboradores, não ficou claro se há influência da raça (HUNCHAREK et al, 2000). Em um outro estudo conduzido no sul da Polônia em uma população próxima a uma mina de carvão, 55% dos pacientes apresentavam mutação no *p53*, uma frequência duas vezes maior que no norte do país. Estas duas regiões são áreas de grande incidência de neoplasia de pulmão, ao sul há exposição à poeira de carvão e ao norte há exposição ao asbesto nas cidades próximas à região costeira do Mar Báltico (JASSEM et al, 2001). Neste caso não há diferença étnica, e entre as várias explicações possíveis para esta diferença na frequência de mutações em uma mesma população, devemos considerar os fatores ambientais e geográficos.

Outro fator que pode contribuir para a diferença na frequência de mutações no *p53*, é a diversidade de métodos utilizados para análise molecular. A maioria dos autores utiliza a técnica de PCR/SSCP para rastreamento de mutações e realiza o seqüenciamento somente das amostras positivas, outros realizam o seqüenciamento direto. Devemos considerar que fatores técnicos, como temperatura, reação de pH, método de preservação das amostras (frescas ou em parafina), *primers* utilizados, para citar somente alguns, podem influenciar o resultado final (JASSEM, 2001).

A técnica da SSCP foi descrita em 1989 (ORITA et al, 1989), e Scheider e colaboradores relatam que esse método tem a sensibilidade de detectar uma célula tumoral em dez células normais (SCHNEIDER et al, 1996; SCHNEIDER et al; 2000). Como a técnica de seqüenciamento do DNA é cara e exige uma rotina laboratorial intensa, a técnica do SSCP é muito utilizada para rastreamento de mutações.

Em 1995, foi desenvolvido um novo método para detecção de mutações no gene *p53* baseado no fato de que, o *p53* normal quando expresso no *Saccharomyces cerevisiae* ativa a transcrição do gene *ADE2*. As células que contêm esse gene inativado, acumulam um produto intermediário do metabolismo da adenina, e adquirem uma cor vermelha. Conseqüentemente, as colônias contendo o *p53* normal são de cor branca, e as com o *p53* mutante são vermelhas. Por avaliar a função biológica do gene, esse método permite distinguir entre mutações que inativam o *p53* e as que não interferem nas funções do gene (FLAMAN et al, 1995). Em um estudo com carcinoma de cólon, a sensibilidade desse método foi superior pois, 45% de 20 espécimes negativas ao SSCP foram positivas no teste

funcional (LEUNG & LUNG, 1999). Enquanto o SSCP não distingue polimorfismos, mutações funcionalmente silenciosas e mutações inativadoras, o método funcional não detecta grandes deleções (FLAMAN et al, 1995). Portanto, novos estudos deverão ser realizados para elucidar a importância das alterações no gene *p53* detectadas por esse método (NIKLIINSKI et al, 2001a).

Além disso, há diferenças quanto aos exons analisados em cada estudo. A maioria dos trabalhos analisa os exons 5 a 8 ou 5 a 9, onde existe a maioria das mutações. Entretanto, cerca de 17% das mutações são encontradas fora destes exons (CASEY et al, 1996).

A frequência de mutações entre os nossos pacientes foi de 21% (8/38), considerando somente os pacientes que tiveram o seqüenciamento completo dos exons 5 a 10. Se tivéssemos optado por seqüenciar somente os exons 5 a 8, conforme é feito na maioria dos trabalhos, teríamos uma frequência de 15,3% (6/39) pois, duas das mutações encontradas estão no exon 10. Com isso pudemos comprovar a importância da pesquisa de mutações em todos os exons codificantes ou seja, do 2 ao 11. Em cinco pacientes não foi possível amplificar todos os exons, isto pode ter ocorrido devido à deleção de parte do gene *p53* ou ainda, mutação ou deleção no sítio de ligação do *primer* (VÄHÄKANGAS et al, 2001).

Todos os introns começam com uma seqüência GT e terminam com uma seqüência AG, as quais fazem a ligação do intron com o exon, e são chamados de *splice sites*. A presença de mutações nos *splice sites*, pode levar à falha no reconhecimento do exon durante o processamento do RNA, e conseqüentemente à alteração da proteína (Figura 19). Portanto, é importante que na pesquisa de mutações esta região seja incluída no seqüenciamento.

A maioria das mutações no gene *p53* é do tipo *missense*, na qual a proteína codificada contém substituições de aminoácidos. Estas mutações não são encontradas com frequência em outros genes supressores de tumores, nos quais predominam as mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* (BENNETT et al, 1999; JASSEM et al, 2001; PFEIFER, 2000). Curiosamente, as mutações *frameshift* são relativamente mais comuns nos codons que apresentam poucas mutações *missense* (JASSEM et al, 2001; PFEIFER, 2000). As mutações do tipo *missense* podem causar tanto a perda de função do gene supressor de tumor, quanto a

indução de uma função oncogênica através da alteração na função dos genes que tem sua expressão controlada pela p53 (BENNETT et al, 1999; HUSSAIN et al, 2001). Esta dualidade pode explicar a alta frequência de mutações do tipo missense em neoplasia humana (HUSSAIN et al, 2001). Todas as mutações encontradas nos nossos pacientes foram do tipo *missense*. Entretanto, em mulheres chinesas residentes em Taiwan foi encontrado um predomínio de deleções (64% do total). Novamente, fatores genéticos e/ou ambientais poderiam explicar essa diferença (WANG et al, 1998b). Uma das hipóteses para explicar este fenômeno é a associação entre a exposição a um carcinógeno, endógeno ou exógeno, e a indução de mutações específicas (HUSSAIN et al, 2001).

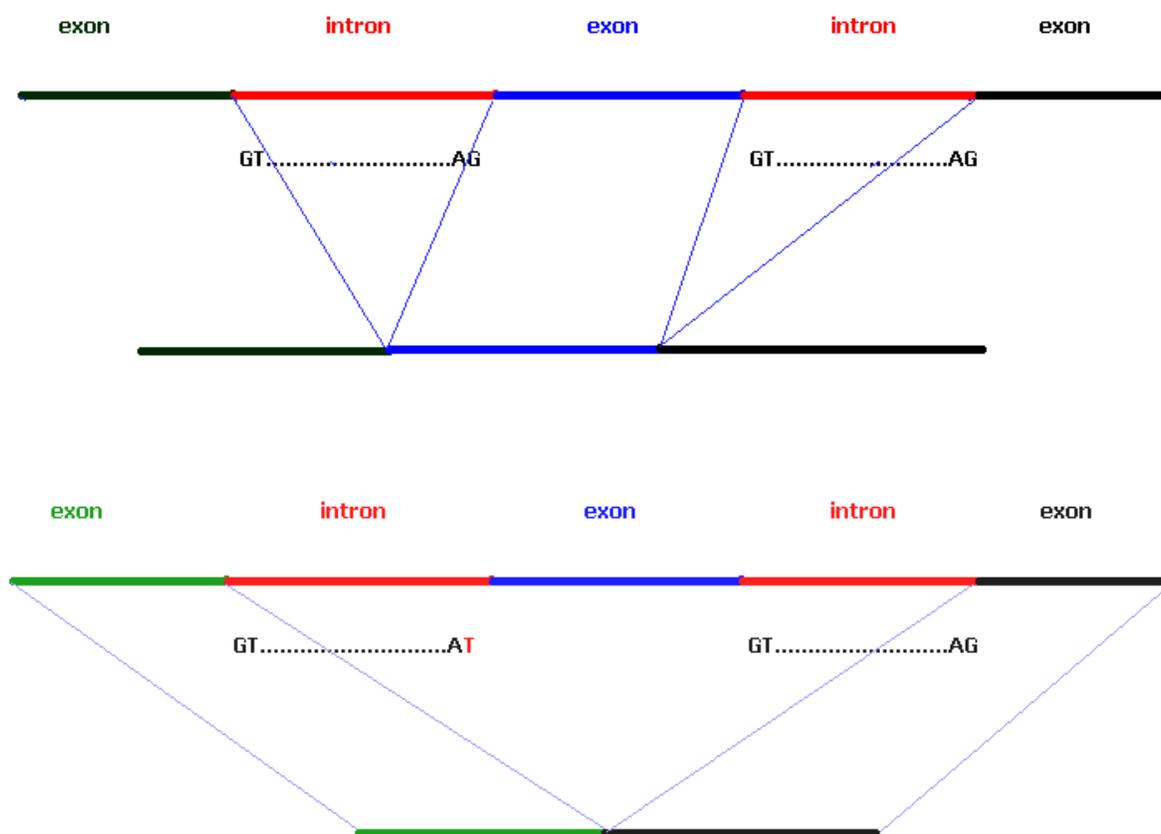


Figura 19: Acima, não há mutação nos *splice sites* e a abaixo há uma mutação G→T no dinucleotídeo final do primeiro intron. Ocorre a perda do exon representado em azul pois, a leitura do intron começará na seqüência GT do primeiro intron e terminará somente no dinucleotídeo final do segundo intron.

O risco de desenvolvimento de câncer está associado com a exposição ambiental a carcinógenos. Câncer é um processo com várias etapas, que envolve a inativação de genes supressores de tumor e a ativação de protooncogenes (HUSSAIN et al, 2001). Cada substância mutagênica tem, mais ou menos, um padrão mutacional específico, características próprias quanto à razão de transições, transversões, deleções, que causam em sistemas experimentais usados para análise do espectro mutacional. Se através do perfeito entendimento do processo de mutagênese for possível prever, exatamente, em qual local do *p53* um agente mutagênico pode produzir estas mutações específicas, poderemos fazer algumas ligações sugestivas entre os agentes genotóxicos e o câncer (PFEIFER, 2000). O processo de carcinogênese seleciona células com *p53* mutante que, presumivelmente, têm um crescimento mais intenso devido a mecanismos pouco conhecidos que envolvem perda dos pontos de restrição do ciclo celular, apoptose, deficiências no reparo do DNA ou na manutenção da estabilidade genômica. O processo de mutagênese age produzindo uma mutação no *p53* que envolve dano no DNA, reparo, erro de leitura, fixação da mutação e seleção. A frequência destes processos pode variar, drasticamente, de uma base para outra e depende não só das bases envolvidas mas também, da sequência em questão. O resultado final é um espectro mutacional, um mapa de cada tipo de mutação produzida ao longo da sequência do DNA (PFEIFER, 2000).

Diferentes carcinógenos têm sido associados a características mutacionais distintas. Por exemplo, exposição à luz ultravioleta está correlacionada com mutações por transição em sítios de dipirimidina (BRASH et al, 1991); ingestão de aflatoxina B1 relaciona-se com a presença de transversão G:C para T:A no codon 249 em hepatocarcinomas (HSU et al, 1991) e a exposição à fumaça de cigarro está associada à transversão G:C para T:A em carcinoma de pulmão (HERNANDEZ-BOUSSARD & HAINAUT, 1998).

Um grande número de mutações é encontrado nos dinucleotídeos CpGs, que são frequentemente metilados em todos os tecidos humanos. No domínio de ligação ao DNA há 23 CpGs metilados, o que representa 8% do domínio. Entretanto, considerando todos os tipos de neoplasias, 33% de todas as mutações deste domínio ocorrem nestes sítios, e os seis codons com maior número de mutações (*hotspots*) possuem CpGs metilados (codons 175, 213, 245, 248, 273 e 282) (PFEIFER, 2000).

Aparentemente, mutações em seqüências CpGs têm um grande impacto pois, muitas dessas seqüências foram perdidas durante a evolução. Uma freqüência normal foi mantida apenas em ilhas de CpG, ou seja, em pontos isolados e que não são metilados nas células germinativas. Pode-se dizer que o processo de seleção manteve a freqüência de CpG intacta nessas ilhas mas, é mais provável que a presença de CpG metilados tenha contribuído para aumentar a freqüência de mutações. A metilação tem forte influência na formação de lesões no DNA visto que, carcinógenos, como o benzopireno, possuem maior afinidade por CpGs metilados do que pelos não metilados (PFEIFER, 2000). No tecido pulmonar normal, todas as seqüências CpG do gene *p53* são metiladas (TORNALETTI & PFEIFER, 1995).

Entre os 3800 agentes com potencial mutagênico encontrados na fumaça do tabaco (VINEIS & CAPORASO, 1995), o principal responsável por induzir mutações no *p53* e câncer de pulmão é o epóxido-diol-benzo[a]pireno (BPDE), metabólito do benzo[a]pireno que é um dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) encontrados na fumaça do cigarro. O BPDE liga-se ao DNA na posição N₂ das guaninas (RODIN & RODIN, 2000). Se os pontos de ligação entre o DNA e o BPDE não forem reparados, haverá erro de leitura pela DNA polimerase durante a replicação resultando, predominantemente, em transversões G→T (RUGGERI et al, 1993); que são consideradas como uma assinatura do BPDE (RODIN & RODIN, 2000). Transversões G→T são freqüentes no carcinoma de pulmão, cerca de 35%, mas são incomuns em outros tipos de câncer (~10%), indicando uma ligação entre BPDE e o carcinoma de pulmão (RUGGERI et al, 1993; GREENBLATT et al, 1994).

A transversão G→T tem sido chamada de “assinatura molecular” dos agentes cancerígenos do tabaco no carcinoma de pulmão devido aos seguintes fatos: (1) PAHs por serem formados durante a combustão de qualquer material orgânico, estão presentes em concentrações notáveis no nosso meio ambiente. Entretanto, a maior parte da concentração de PAHs inaladas está no fluxo central da fumaça do cigarro e podem produzir, predominantemente, esta mutação; (2) PAHs são encontrados no DNA extraído de tecidos humanos expostos à fumaça do tabaco. O BPDE liga-se à guanina nos codons *hotspots*, incluindo os codons 157, 248 e 273, de células epiteliais da mucosa brônquica normal; (3) há uma freqüência maior de transversões G→T em carcinoma de pulmão de tabagistas quando comparado com não fumantes e com outros tipos de neoplasias; (4) a propensão para

transversão G→T na fita não transcrita pode ser atribuída à preferência de reparo dos locais de adução de PAHs na fita transcrita. Os pontos de ligação do BPDE na fita não transcrita do *p53* são reparados cerca de 2 a 4 vezes mais lentamente, do que os da fita transcrita e (5) existe uma correspondência entre os codons que mais freqüentemente exibem mutações (*codons hotspots*) no câncer de pulmão e os codons que têm maior adução de PAHs. (HAINAUT & PFEIFER, 2001; SMITH et al, 2000).

Enquanto a ligação entre o BPDE e o DNA produz predominantemente transversões G→T, mutações espontâneas tendem a ser transições do tipo G→A originadas, provavelmente, a partir da desaminação espontânea de citosinas metiladas (JONES, 1996) (ANEXO 6). O espectro de mutações no *p53* observado no carcinoma brônquico de tabagistas é dominado pela presença de transversões G→T, aproximadamente 30 a 40%. Este tipo de mutação é mais raro em outros tipos de câncer, exceto o carcinoma hepatocelular (SMITH et al, 2000). De todas as transversões G→T que ocorrem nos tumores de pulmão, 95% ocorrem na fita não transcrita (BENNETT et al, 1999; HERNANDEZ-BOUSSARD & HAINAUT, 1998). Em contraste, o espectro de mutações em não fumantes demonstra poucos codons *hotspots* e uma freqüência muito menor de transversões G→T (BENNETT et al, 1999; HERNANDEZ-BOUSSARD & HAINAUT, 1998).

Dados obtidos por Smith et al, sugerem que a presença de citosinas metiladas pode contribuir para a ligação com PAHs e nenhum outro fator determinante, além da preferência por seqüências CpG metiladas, pôde ser identificado (SMITH et al, 2000).

Dados obtidos de animais demonstraram que a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) é um forte carcinógeno específico para pulmão (HOFFMANN et al, 1996) que induz, predominantemente, transições G:C para A:T em sítios não CpGs em animais e em outros sistemas experimentais (BÔER et al, 1999; JIAO et al, 1991; JIAO et al, 1993; OHGAKI et al, 1992). NNK é um componente específico da fumaça do tabaco, e não existe de outra forma no ambiente em que vivemos (CLOUTIER et al, 2001). Nitrosaminas de outras fontes ambientais e a NNK, provavelmente, contribuem para a indução de câncer de pulmão, pois transições G:C para A:T em sítios não CpG são comuns em carcinoma brônquico de fumantes e não fumantes (VÄHÄKANGAS et al, 2001).

Apesar de todos os nossos pacientes com mutação serem fumantes, encontramos apenas uma transversão G→T que ocorreu no codon 249. Entre os seis codons com maior frequência de mutação no câncer de pulmão isto é, codons 157, 158, 245, 248, 249 e 273, apenas o codon 249 não tem afinidade de ligação ao PAHs. Além disso, é o único que não possui sítio CpG e a presença de mutações pode ser freqüente devido a um forte processo de seleção (SMITH et al, 2000), já que também é um codon *hotspot* em não fumantes (HAINAUT & PFEIFER, 2001). O codon 249 faz parte do *loop 3*, e a presença de mutação nesta região está relacionada com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (BORRESEN et al, 1995) e pulmão (SKAUG et al, 2000). O fato de ser um *hotspot* em fumantes e não fumantes, além de predispor a um prognóstico desfavorável, pode ser explicado pela importância do *loop 3* na ligação da p53 ao DNA.

As outras transversões encontradas foram uma G→C e outra T→A. A frequência de transversões G→C é de 13% tanto em fumantes, quanto em não fumantes, e a T→A é pouco freqüente em ambos os grupos (HAINAUT & PFEIFER, 2001; VÄHÄKANGAS, 2001).

A transição G→A foi encontrada em quatro pacientes, sendo que duas foram no codon 337. Este codon é um sítio CpG metilado, e esta mutação pode ter sido induzida por PAHs ou por mutação espontânea. O codon 337 está localizado no domínio de tetramerização, região importante na transativação e na supressão do crescimento de células carcinomatosas e portanto, mutações nesse codon podem, em teoria, predispor a um pior prognóstico. As outras duas transições ocorreram nos codons 275 e 285 que não possuem seqüência CpG; portanto, a transição nestes codons pode ter ocorrido por ligação de nitrosaminas. Cigarros feitos com mistura de fumos contêm uma maior quantidade de talos do que folhas do tabaco, e por isso liberam uma maior quantidade de nitrosaminas (ROM et al, 2000). Além disso, vários fatores influenciam na quantidade de nitrosaminas liberadas pelo cigarro; há influência do tipo de tabaco (Burley > Virginia > Oriente) e dos métodos de cultivo, secagem, processamento, estocagem e empacotamento do cigarro (FINSTER, 1986). Os cigarros vendidos no Brasil são feitos por mistura de fumos. Entretanto, não sabemos se há diferença na composição dos cigarros produzidos aqui e no exterior; se houver diferença na composição, teremos um espectro mutacional diferente do relatado em outros trabalhos.

No nosso estudo encontramos mutações nos codons 159, 237, 249, 275, 285 e 337. Destes, como já citado acima, apenas o codon 249 é considerado *hotspot* para o câncer de pulmão. Por serem codons com baixa frequência de mutações decidimos compará-los com os dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002). Selecionamos no banco de dados o codon e o tipo histológico correspondentes aos dos nossos pacientes, e verificamos a frequência de mutações. Depois de obter a frequência de mutações no grupo todo, dividimos os pacientes em dois grupos; um com os catalogados como fumantes (“smokers”) e o outro com os catalogados como não fumantes (“non smokers”). Devemos salientar que, (1) como cerca de 90% dos carcinomas de pulmão estão relacionados ao tabagismo, é esperado que o padrão de mutação encontrado no grupo geral, que inclui fumantes e não fumantes, seja semelhante ao grupo de fumantes; (2) ao analisarmos os pacientes catalogados como fumantes separadamente dos não-fumantes, o número total de pacientes poderá ser menor do que o grupo geral, uma vez que algum paciente pode ter sido incluído no banco de dados como ex-tabagista.

Para o codon 159 e carcinoma epidermóide encontramos 4 mutações no total, sendo que uma é igual à encontrada por nós ou seja, G:C>C:G. Quando separamos os pacientes em fumantes e não-fumantes, encontramos 3 mutações e a transversão G→C não aparece. Na correlação entre codon 275 e carcinoma epidermóide foram encontradas 5 mutações no total, e três são transições G→A semelhante ao nosso dado; entre não-fumantes não há descrição de mutações. Para o codon 285 e carcinoma epidermóide há 2 entradas, ambas são transição G→A (GAG→AAG e GAG→GAA), e são descritas somente em fumantes.

Correlacionamos o codon 237 com todos os tipos histológicos e não encontramos a transversão T→A documentada. No codon 337 encontramos uma transição G→A em adenocarcinoma e em carcinoma de grandes células não há qualquer registro de mutações. Portanto, considerando que o banco de dados da IARC foi atualizado em março/2002 (16285 entradas), provavelmente somos o primeiro grupo a descrever a mutação no codon 237 (ATG→AAG) em carcinoma brônquico, independentemente do tipo histológico; além da mutação no codon 337 (CGC→CAC) em carcinoma de grandes células (IARC, 2002).

1.1. Polimorfismos e mutações silenciosas no gene *p53*

A presença em uma população de dois ou mais alelos diferentes é chamada de polimorfismo. Pode ser estável, no qual nenhuma das formas tem qualquer vantagem ou pode ser transitente, quando uma variante está substituindo a outra. Nem todas as mutações levam a uma mudança detectável no fenótipo. Mutações sem efeito aparente são chamadas de mutações silenciosas, que podem ser de dois tipos. Algumas envolvem a substituição de base(s) que não causam qualquer troca de aminoácido na proteína correspondente. Em outras há troca de aminoácidos, porém sem repercussão na atividade da proteína, essas são chamadas de substituições neutras. Apesar das mutações silenciosas serem neutras em relação à proteína, elas podem afetar a expressão do gene através da alteração na sequência do RNA (LEWIN, 1996b).

O polimorfismo no codon 213 foi descrito em 1991 (CARBONE et al, 1991). Desde então foi relatado em vários tipos de tumores tais como pulmão, tireóide e mama. A prevalência do polimorfismo no codon 213 é de 11% (IARC, 2002). As maiores frequências foram relatadas entre pacientes que desenvolveram câncer após exposição à radiação. Em um estudo com trabalhadores de mina de urânio que desenvolveram carcinoma de pulmão, 19% apresentavam polimorfismo no codon 213 (POPP et al, 1999). Em outro trabalho cerca de 20% das crianças com carcinoma de tireóide e que tiveram exposição à radiação, apresentavam o polimorfismo no codon 213 (SMIDA et al, 1997).

Não encontramos relato na literatura ou registro no banco de dados do IARC de alteração semelhante à encontrada no codon 295. Por isso acreditamos que somos o primeiro grupo a relatar tal mutação. Como dito anteriormente, esta mutação pode ser uma substituição neutra ou pode ter um papel seletivo no desenvolvimento da neoplasia por influir na expressão do gene, ao alterar a sequência do RNA.

2. Gene *K-ras*

Por razões desconhecidas existe uma associação entre mutação no gene *ras* e certas neoplasias (RODENHUIS & SLEBOS, 1992). O *N-ras* é encontrado nas desordens mieloproliferativas e linfomas, o *K-ras* está associado a adenocarcinomas (SLEBOS et al,

1991; SMIT et al, 1996; RODENHUIS & SLEBOS, 1992). A mutação no gene *H-ras* é rara, e ocorre principalmente nos carcinomas de tireóide (RODENHUIS & SLEBOS, 1990; RODENHUIS & SLEBOS, 1992).

A ativação do oncogene *K-ras* tem sido considerada um evento precoce em alguns modelos de carcinogênese (BARBACID, 1987). No cólon, a mutação encontrada em pólipos adenomatosos foi semelhante à mutação existente no carcinoma de cólon (FEARON & VOGELSTEIN, 1990). A mutação também foi encontrada em áreas de hiperplasia alveolar atípica, lesão considerada como sendo precursora do adenocarcinoma de pulmão (COOPER et al, 1997; WESTRA et al, 1996).

Por outro lado, Mills e colaboradores acreditam que a mutação *ras* seja um evento tardio, porque o oncogene é encontrado em uma pequena porcentagem das células neoplásicas e está relacionado à progressão da neoplasia (invasão e metástase) (MILLS et al, 1995b).

No carcinoma brônquico o oncogene *K-ras* foi encontrado em 15 a 56% dos adenocarcinomas (LI et al, 1994; MILLS et al, 1995b; SUGIO et al, 1992; WESTRA et al, 1993). Uma possível explicação para essa discrepância de resultados é o uso de um método pouco sensível em alguns estudos, associado a dois fatores que podem ter dificultado a detecção da mutação. Primeiro, em alguns casos, somente uma pequena fração das células tumorais apresenta a mutação estudada. Segundo, as amostras de tecido analisadas contêm células tumorais e células geneticamente normais, portanto o DNA isolado é derivado de ambas populações. Podemos concluir que a presença da mutação no gene *K-ras* em uma minoria das células tumorais, e a mistura de células normais com células malignas, pode resultar em uma amostra de DNA purificado na qual a porcentagem de alelos mutantes é menor que o limiar de detecção do método usado (MILLS, 1995b).

Em relação aos outros tipos histológicos de carcinoma brônquico, nenhuma mutação no gene *K-ras* foi encontrada em carcinoma epidermóide (MILLS et al, 1995b; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; RODENHUIS & SLEBOS, 1992; SUGIO et al, 1992) e em tumores de linhagem neuroendócrina (MILLS et al, 1995b; PRZYGODZKI et al, 1996; RODENHUIS & SLEBOS, 1992).

Nos adenocarcinomas de pulmão foi observada uma relação entre a presença da mutação *K-ras* e o tabagismo (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; RODENHUIS & SLEBOS, 1992; SLEBOS et al, 1991; SUGIO et al, 1992; WESTRA et al, 1993). Em alguns estudos, o oncogene foi encontrado em 20 a 30% dos pacientes fumantes ou ex-fumantes, e em apenas 5 a 9% dos não fumantes (SLEBOS et al, 1991; SUGIO et al, 1992; WESTRA et al, 1993; GEALY et al, 1999; VÄHÄKANGAS, 2001). Nesses casos a mutação encontrada com maior frequência entre os fumantes é a troca de guanina por timina (SLEBOS et al, 1991; WESTRA et al, 1993) enquanto que, nos não fumantes há predomínio de transição G→A (GEALY et al, 1999; VÄHÄKANGAS, 2001). Entretanto, nos dados obtidos por Kobayashi et al não houve correlação entre a presença do oncogene *K-ras* e tabagismo (KOBAYASHI et al, 1990).

Em relação ao gene *K-ras*, optamos por realizar a pesquisa somente nos adenocarcinomas e nos carcinomas de grandes células, já que a frequência de mutações no carcinoma epidermóide é extremamente baixa, e nula nos tumores de linhagem neuroendócrina. Não encontramos mutação nos tumores estudados provavelmente, devido ao pequeno número de pacientes ($n=12$).

3. Influência de mutações no *p53* e *K-ras* no prognóstico:

Alguns fatores são bem conhecidos como determinantes de pior prognóstico no carcinoma de não pequenas células. Entre eles podemos citar o estadió TNM, a perda de peso, estadió clínico e presença de sintomas sistêmicos (GRAZIANO, 1997). Alguns estudos relatam um possível impacto da idade, tipo histológico - epidermóide e não epidermóide (GAIL et al, 1984; BARBEIRO, 2001), grau de diferenciação e invasão vascular (TAKISE et al, 1988).

Os resultados publicados sobre a influência dos genes *p53* e *K-ras* no prognóstico dos pacientes com carcinoma de não pequenas células são controversos. Vários fatores podem influenciar os resultados, e dificultar a comparação dos resultados entre os estudos. Além das diferenças quanto à população estudada e à técnica empregada na pesquisa de mutações, pode haver um *bias* de publicação pois, os trabalhos com resultados positivos têm uma tendência a serem publicados na língua inglesa e os com resultados negativos são relatados, mais frequentemente, no idioma nativo (EGGER et al, 1997).

Os trabalhos com imuno-histoquímica utilizam diferentes anticorpos na reação e os níveis considerados como positivos variam de pouco a mais de 50%. Além disso, as mutações que levam à perda da expressão da proteína não são detectadas pela imuno-histoquímica. Em relação aos trabalhos que utilizam a técnica de PCR, a maioria não analisa todos os exons, e como foi dito anteriormente, com a concentração da pesquisa nos exons 5 a 8 cerca de 17% das mutações deixariam de ser detectadas. Devemos ressaltar que, os estudos de mutações genéticas ou de expressão de proteínas em tecidos neoplásicos têm sido feitos, principalmente, em peças cirúrgicas devido às limitações técnicas na análise de pequenos fragmentos de biópsia ou de citologia. Portanto, a maioria dos estudos sobre mutações no gene *p53* é limitada a grupos de pacientes submetidos à cirurgia. Este *bias* é significativo e pode obscurecer parcialmente, ou totalmente, os efeitos biológicos da mutação do gene *p53* na taxa de progressão do tumor (MURAKAMI et al, 2000). Outros autores argumentam que, limitar o estudo a um grupo com doença limitada é importante pois, a utilidade como marcador de prognóstico é maior em um grupo de pacientes tratados com uma terapia potencialmente curativa (GRAZIANO et al, 1999).

Alguns autores encontraram uma relação entre a presença de mutação no gene *p53* com um prognóstico desfavorável (FUJINO et al, 1995a; MARCHETTI et al, 1993; PRZYGODZKI et al, 1996; QUINLAN et al, 1992; LAUDANSKI et al, 2001). Entretanto, Miyake et al e Reinmuth et al, não encontraram qualquer relação (MIYAKE et al, 1999; REINMUTH et al, 2000).

Em uma meta-análise realizada por Mitsudomi e colaboradores, a presença de mutação no *p53* teve correlação com pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma, mas não nos portadores de carcinoma epidermóide (MITSUDOMI et al, 2000). Analisando somente pacientes com estadió avançado (IIIa, IIIb e IV) que não foram submetidos à cirurgia, Murakami e colaboradores encontraram uma correlação positiva entre a presença de mutação no gene *p53* e prognóstico desfavorável (MURAKAMI et al, 2000). Outra meta-análise, sugeriu um pior prognóstico nos pacientes com alteração no gene *p53* (STEELS et al, 2001).

Recentemente, alguns autores consideraram que diferentes tipos de mutações no gene *p53* têm diferentes impactos na sobrevida do paciente. A presença de mutações que levam à ausência de expressão da proteína *p53* foi correlacionada com pior prognóstico por de Anta e colaboradores, fato não observado na presença de mutação *missense* (de ANTA et al, 1997). Entretanto, Tomizawa e colaboradores relacionam a presença de mutações *missense* com uma menor sobrevida nos pacientes com estadio I (TOMIZAWA et al, 1999). Alguns estudos correlacionam o prognóstico com o exon alterado, Huang e colaboradores encontram uma sobrevida menor entre os pacientes com mutação nos exons 7 e 8 enquanto que, Vega e colaboradores relacionam a presença de mutação no exon 5 com pior prognóstico (HUANG et al, 1998; VEGA et al, 1997).

Como as diferentes regiões da proteína *p53* possuem funções biológicas distintas, o prognóstico tem sido correlacionado com o local da mutação. Skaug e colaboradores encontraram uma sobrevida menor entre os pacientes com mutação nos codons responsáveis pela ligação com o átomo de zinco, e nos codons envolvidos na formação do *loop 2* (SKAUG et al, 2000).

Alguns autores encontraram uma associação entre a presença da mutação *K-ras* e um prognóstico desfavorável (ANDERSON & SPANDIDOS, 1993; BIRRER & BROWN, 1992; GIANCONNE, 1996; KWIATKOWSKI et al, 1998; MIYAKE et al, 1999; RODENHUIS & SLEBOS, 1990; RODENHUIS & SLEBOS, 1992; SUGIO et al, 1992; SZABO et al, 1993). Graziano e colaboradores encontraram uma associação entre a presença de mutação no gene *K-ras* e prognóstico desfavorável somente nos pacientes com carcinoma de não pequenas células e estadio II (GRAZIANO et al, 1999). Quando analisaram todos os pacientes, independentemente do estadio, não houve qualquer correlação.

Huncharek e colaboradores em um trabalho de meta-análise com 881 pacientes com carcinoma de não pequenas células, a presença de mutação no gene *K-ras* esteve associada com menor sobrevida (HUNCHAREK et al, 1999).

Em um estudo com 136 pacientes com carcinoma de não pequenas células, não houve diferença significativa na sobrevida em cinco anos quando analisada a presença isolada da mutação nos genes *p53*, *K-ras* e *c-erbB-2*. Porém houve diferença significativa

na sobrevida em cinco anos, quando os pacientes com mutação nos três genes foram comparados com os que não tinham qualquer mutação; a taxa de sobrevida foi de 40,2% e 82,6% respectivamente (SCHNEIDER et al, 2000).

A relação entre sobrevida e as diferentes mutações presentes no carcinoma de pulmão, ainda não está bem estabelecida. É necessário que seja realizado um estudo prospectivo onde, o valor exato das alterações genéticas deve ser determinado por uma análise multivariada que considere os fatores prognósticos já conhecidos. É pouco provável e seria até inocência pensar que apenas uma mutação seria suficiente para predizer vários aspectos da evolução clínica de um paciente com câncer de pulmão. É mais provável que um conjunto de alterações genéticas envolvendo vários genes tenha, associado a fatores clínicos, uma influência no prognóstico.

4. Genes *p53* e *K-ras* e diagnóstico precoce

Nos últimos dez anos, apesar de todo o investimento em pesquisa, não houve melhora significativa no tratamento do carcinoma brônquico, visto que a maioria dos pacientes apresenta doença disseminada no momento do diagnóstico. Utilizando os métodos atuais de diagnóstico e tratamento, menos de 15% dos pacientes irão sobreviver. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de procedimentos capazes de realizar o diagnóstico precoce (KERSTING et al., 2000).

A pesquisa de mutações genéticas em escarro e lavado brônquico pode contribuir para o diagnóstico precoce do carcinoma brônquico. Para tal, é necessário que se procure por uma alteração genética que ocorra precocemente durante o processo de carcinogênese.

A mutação no gene *p53* e a hipermetilação no gene *p16^{INK4a}* são alterações genéticas precoces (KERSTING et al, 2000; SEIKE et al, 2000). Entretanto há dúvidas se a mutação no oncogene *K-ras* ocorre precocemente na carcinogênese ou se é um evento tardio (KERSTING et al, 2000; MAO et al, 1994; SAGAWA et al, 1998; SCOTT et al, 1997; SOMERS et al, 1998).

Mao e colaboradores encontraram mutações no gene *K-ras* em escarro obtido 13 meses antes do diagnóstico da neoplasia (MAO et al, 1994). Em estudo semelhante conduzido por Somers e colaboradores, a presença de mutações no gene *K-ras* no escarro precedeu o diagnóstico da neoplasia, em um período que variou de 1 mês a 4 anos (SOMERS et al, 1998). Somers e colaboradores também demonstraram que a pesquisa de mutações no lavado brônquico pode auxiliar no diagnóstico de lesões pulmonares periféricas (SOMERS et al, 1999).

Kersting e colaboradores, pesquisando mutações em escarro e lavado brônquico de pacientes com neoplasia de pulmão e em tabagistas sem evidência de neoplasia, encontraram mutações no gene *p53* e *p16^{INK4a}* em ambos os grupos, enquanto que alterações no gene *K-ras* só foram encontradas nos pacientes com neoplasia (KERSTING et al, 2000).

Assim como na determinação do prognóstico, o papel da biologia molecular no diagnóstico precoce ainda não foi, e está longe de ser, definido. A busca por uma mutação com objetivo de auxiliar o diagnóstico precoce pode ser frustrante; se considerarmos que 50% dos carcinomas de não pequenas células têm mutação no gene *p53*, deixaríamos de realizar o diagnóstico em metade dos pacientes considerando que a mutação tenha ocorrido precocemente em todos. O primeiro passo é definir um conjunto de alterações genéticas precoces que poderiam ser úteis na busca por lesões pré neoplásicas (veja a revisão feita por NIKLINSKI et al, 2001b), e utilizá-las em associação a outros métodos como a tomografia computadorizada helical e a broncoscopia com material imunofluorescente. Desta forma, teríamos estes métodos agindo de forma sinérgica e talvez, aumentando a probabilidade de realizarmos o diagnóstico precoce.

B- Carcinoma de pulmão pequenas células

O carcinoma de pulmão pequenas células corresponde à cerca de 20% dos carcinomas brônquicos (TRAVIS et al, 1995). Recentemente foi relatada uma maior proporção de mulheres com CPPC do que homens, principalmente na população mais jovem; abaixo dos 65 anos de idade 34% das mulheres com carcinoma brônquico tinham CPPC comparado com 18% dos homens (THOMPSON, 1998).

Nas neoplasias neuroendócrinas, cerca de 70% dos carcinomas de pequenas células apresentam mutação no gene *p53*; enquanto que nas demais ela é rara, variando de 0 a 20% nos carcinóides típicos, e ausente nos tumores carcinóides atípicos (LOHMANN et al, 1993; MILLER et al, 1992; PRZYGODZKI et al, 1996; TAKAHASHI et al, 1991).

Em um estudo mais recente Tseng e colaboradores, analisando 65 pacientes com CPPC, encontraram mutação no *p53* em 57%. A justificativa para esta frequência mais baixa foi o tamanho reduzido da amostra em outros estudos (normalmente menor do que 28 pacientes), a análise somente dos codons 5-9 na maioria dos trabalhos e inclusão de linhagens celulares (TSENG et al, 1999).

Tseng e colaboradores encontraram mutação em 46% das mulheres e 65% dos homens, com predomínio de mutações do tipo *missense* (74%). A maioria das alterações genéticas (81%) estava localizada nos exons 5-7, valor que corresponde ao banco de dados do IARC (73,1%) (IARC, 2002). Neste mesmo estudo, não houve associação significativa entre a presença de mutações e a sobrevida, idade, raça e tempo de exposição ao tabaco. No CPPC não há descrição de codons *hotspot* (TSENG et al, 1999). Na meta-análise realizada por Steels et al, não foi possível analisar a influência da mutação no *p53* na sobrevida dos pacientes com CPPC porque havia um número pequeno de pacientes ($n=28$); e a conclusão da meta-análise é que novos estudos precisam ser realizados para determinar o impacto da mutação no gene *p53* no CPPC (STEELS et al, 2001). O tamanho da nossa amostra foi pequeno e não permitiu a análise estatística.

Comparamos as mutações encontradas no nosso estudo com as descritas no banco de dados do IARC (IARC, 2002), utilizando as amostras classificadas como “oat cell carcinoma”, “small cell carcinoma” e “small cell carcinoma, intermediate cell”. Não há mutação descrita no codon 152, e para os codons 153 e 173 há relatos de mutações, porém diferentes das encontradas neste estudo. No codon 153 há relato de três mutações, todas G:C>A:T em sítios CpG. Já no codon 173, há referência a uma mutação G:C>A:T.

Na literatura há diversos trabalhos sobre o gene *p53* no carcinoma de pulmão não pequenas células; entretanto, estudos semelhantes em carcinoma de pequenas células são raros. Uma possível explicação é a dificuldade de conseguir amostras de tumor para realizar o

estudo. Nos CPNPC, a maioria dos trabalhos é realizada em pacientes submetidos à cirurgia e como o CPPC raramente é operado, há dificuldade para obter material para estudo. Pudemos provar que é possível estudar as alterações genéticas no CPPC a partir da biópsia endobrônquica, e talvez esta seja atualmente a única forma de aumentar a casuística nos estudos com pacientes virgens de tratamento, pois a análise de peças obtidas de necropsias (fonte de alguns casos estudados por TSENG et al) pode falsear o padrão mutacional devido à exposição a agentes quimioterápicos e radiação ionizante durante o tratamento.

C- Avaliação anatomopatológica da carina traqueal

Nos primeiros pacientes, houve dificuldade em realizar a biópsia da mucosa normal devido à qualidade das pinças disponíveis. Somente a partir do paciente 49 a biópsia foi realizada com pinças novas. Por esse motivo, o rastreamento de mutações foi realizado em amostras de carina traqueal de todos os pacientes, porém o exame histológico está disponível em apenas 16 mucosas. Da lesão tumoral foram obtidas amostras suficientes para realizar o exame histopatológico e a extração de DNA.

Separámos os 16 pacientes dos quais obtivemos a mucosa da carina principal para exame anatomopatológico, e comparamos os resultados obtidos com os dados da literatura (ANEXO 5).

A invasão da carina principal pela neoplasia é um fator importante para o estadiamento, e conseqüentemente para a decisão terapêutica e avaliação do prognóstico. O acometimento da carina é classificado, no sistema TMN como T4 (estadio IIIB) (MOUNTAIN,1997), o que torna o tratamento cirúrgico pouco provável. A carina pode ser acometida pelo tumor através da disseminação pela mucosa ou submucosa, ou a partir de tecidos peribrônquicos, ou secundariamente por invasão tumoral proveniente de linfonodos do ângulo traqueobrônquico ou do espaço subcarinal (WARREN & FABER, 2000).

Rotineiramente, a avaliação da carina traqueal é feita durante a broncoscopia flexível. Esta avaliação é baseada no aspecto macroscópico, se há ou não invasão direta do tumor, ou alargamento e/ou fixação da carina. Entretanto, ela pode estar acometida mesmo

quando o seu aspecto anatômico é normal (WALTNER, 1961). A biópsia de carina com aspecto normal, ou biópsia a cegas, foi realizada pela primeira vez em 1952 por Rabin, que avaliou 124 pacientes por broncoscopia rígida e encontrou invasão da carina pela neoplasia em 12,9% (RABIN et al, 1952). A frequência no nosso estudo foi de 18,75% (3/16), média acima da relatada em outros estudos onde a frequência variou de 4,7 a 13,8% (GUNEN et al, 2001; ROBBINS et al, 1979; SHURE et al, 1985; VERSTEEGH & SWIERENGA, 1963) . Gunen e colaboradores argumentam que esta variação pode ser devido à diferença no número de biópsias realizadas e às técnicas e instrumentais utilizados (GUNEN et al, 2001). Como nossa amostra é pequena, a frequência acima da descrita na literatura pode ser obra do acaso.

Segundo a teoria do “campo de cancerização” (*field cancerization*), o epitélio respiratório por estar exposto à ação de agentes carcinógenos pode desenvolver um câncer em qualquer local, pois o processo de carcinogênese (hiperplasia→displasia leve→displasia moderada→displasia severa→carcinoma *in situ*) ocorre em vários pontos e em tempos diferentes. Por isso, mesmo que a carina não seja acometida por invasão direta, ela pode apresentar um tumor sincrônico ao tumor em investigação. Como a carina é o sítio de maior impactação de contaminantes, como os compostos do tabaco (KNUDSON, 1960; AUERBACH et al, 1979), podemos supor que se há um local mais provável para encontrarmos uma lesão pré-neoplásica, ou mesmo tumoral, este local seja a carina principal ou secundária. Gunen e colaboradores realizaram biópsias da carina traqueal e da carina do lobo superior ipsilateral ao tumor e 25% dos pacientes que eram considerados como operáveis tiveram a cirurgia contra-indicada, além de ter havido alteração no planejamento cirúrgico em outros 11,1% (GUNEN et al, 2001).

Entre os nossos pacientes, em um foi feito o diagnóstico de carcinoma epidermóide na carina. Como o tumor estava localizado no brônquio fonte esquerdo, podemos supor que a carina foi acometida por extensão direta pela mucosa ou submucosa. Em outros dois foi encontrado carcinoma *in situ*, que sugere o diagnóstico de tumor sincrônico. Resultados ainda escassos sugerem que pequenos sítios de lesões pré neoplásicas ou carcinoma *in situ* podem ser removidos por biópsia (KENNEDY et al, 2000b; LAM et al, 2000).

A biópsia de carina é fácil de ser realizada, não aumenta o custo da broncoscopia e possui um baixo risco de complicações. Sua análise histológica pode contra indicar um procedimento cirúrgico ou outros exames de estadiamento, diminuindo riscos e mortalidade, e otimizando recursos. Entretanto, antes de ser adotado como um procedimento de rotina, a técnica tem que ser padronizada para que os resultados entre serviços distintos possam ser comparados e avaliados.



6. CONCLUSÕES

1. A frequência de mutação no gene *p53* em carcinoma de pulmão não pequenas células foi de 21%, valor dentro da faixa descrita na literatura (18 a 71%).
2. A frequência de mutação no gene *p53* em carcinoma de pulmão de pequenas células foi de 33,3%, valor abaixo da faixa descrita na literatura (57 a 70%) que pode ser devido ao tamanho da nossa amostra ($n = 9$).
3. Se tivéssemos estudado somente os exons 5 a 8 a frequência de mutações cairia para 15,7%, tornando importante a análise de todos os exons codificantes (2 ao 11).
4. Nos pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células todas as mutações foram do tipo *missense*, semelhante ao descrito na literatura.
5. Era esperado que a maioria das mutações fossem transversões G→T porém, houve predomínio da transição G→A. Este fato pode estar relacionado ao espectro mutacional do gene *p53* na nossa população, ou ser obra do acaso em decorrência do n do estudo. São necessários novos estudos para determinar o espectro mutacional.
6. Quatro alterações encontradas são inéditas: mutação silenciosa no codon 295, mutação no codon 337 em carcinoma de grandes células, transversão T→A no codon 237 e mutação no codon 152 em carcinoma de pulmão de pequenas células.
7. A pesquisa na mucosa da carina traqueal revelou duas mutações no gene *p53*, que podem estar relacionadas à hipótese de que esta alteração seja um evento precoce na carcinogênese.
8. Não encontramos mutação no gene *K-ras* em amostras de tumor e em mucosa de aspecto normal. Este resultado pode estar relacionado ao fato da mutação no gene *K-ras* ser um evento tardio no processo de carcinogênese.

9. Entre os 12 pacientes com CPNPC nos quais foi possível realizar o exame histológico da carina traqueal, três apresentaram acometimento por células neoplásicas. A biópsia da carina com aspecto normal pode ser um procedimento importante no estadiamento; principalmente em pacientes potencialmente cirúrgicos, por evidenciar a invasão neoplásica dessa estrutura ou por permitir o diagnóstico de um tumor sincrônico.
10. Não houve relação entre a presença de mutação no gene *p53* e o tempo de tabagismo (anos/maço), estadiamento ou prognóstico. Porém, o *n* é pequeno para maiores conclusões.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Cancer Society, 2002. <http://www.cancer.org>

Anderson MLM; Spandidos DA. Oncogenes and onco-suppressor genes in lung cancer. *Respiratory Medicine* 1993, 87(6):413-420.

Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999, 18(53):7637-7643.

Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking, 1955-1960 vs. 1970-1977. *N Engl J Med* 1979; 300(8):381-386.

Bálint É, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. *Br J Cancer* 2001, 85(12):1813-1823.

Barbacid M. ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:779-827.

Barbeiro AS. Análise de uma série de 87 pacientes com câncer de pulmão não pequenas células operados nos estádios I e II. *Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas*. 2001.

Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13(6):738-747.

Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, Khan MA, Shields PG, Harris CC. Molecular Epidemiology of Human Cancer Risk: Gene-Environment Interactions and p53 Mutation Spectrum in Human Lung Cancer. *J Pathology* 1999; 187(1):8-18.

Birrer MJ, Brown PH. Application of molecular genetics to the early diagnosis and screening of lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52 (9 Suppl):2658_s-2664_s.

Bôer JG, Mirsalis JC, Glickman BW. Mutation Spectrum of Dimethylnitrosamine in the liver of 3- and 6-Week-Old *lacI* Transgenic Mice. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3):80-83.

Borresen AL, Andersen TI, Eyfjord JE, Cornelis RS, Thorlacius S, Borg A, Johansson U, Theillet C, Scherneck S, Hartman S, et al. TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14(1):71-75.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ and Ponten J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88(22):10124-10128.

Cadwell C, Zambetti, GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001; 277(1-2):15-30.

Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991; 6(9):1691-1692.

Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, Karlan B, Slamon DJ. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996, 13(9):1971-1981.

Cloutier JF, Drouin R, Weinfeld M, O'Connor TR, Castonguay A. Characterization and Mapping of DNA Damage Induced by Reactive Metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) at Nucleotide Resolution in Human Genomic DNA. *J Mol Biol* 2001; 313(3):539-557.

de Anta JM, Jassem E, Rosell R, Martinez-Roca M, Jassem J, Martinez-Lopez E, Monzo M, Sanchez-Hernandez JJ, Moreno I, Sanchez-Cespedes M. TP53 mutational pattern in Spanish and Polish non-small cell lung cancer patients: null mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 1997; 15(24):2951-2958.

Egger M, Zellweger-Zahner T, Schneider M, Junker C, Lengeler C, Antes G. Language bias in randomized controlled trials published in English and German. *Lancet* 1997; 350(9074):326-329.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-767.

Finney R, Bishop M. Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-ras1. *Science* 1993; 260(5113):1524-1527.

Finster, P. FE – Report Nr. 101 E. Literature Study. N-Nitrosamines in Tobacco Products. BAT Co LTD – Minnesota Tobacco Litigation. September 1986. <http://www.cdc.gov/tobacco>.

Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher IM, Bron L, Benhattar J, et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Sci USA* 1995; 92(9):3963-3967.

Fujino M, Dosaka-Akita H, Harada M, Hiroumi H, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y.

Prognostic Significance of p53 and ras p21 expression in nonsmall lung cancer. *Cancer* 1995a;76(12):2457-2463.

Fujino M, Dosaka-Akita H, Kato M, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y. Simultaneous use of PCR-SSCP method and immunohistochemistry for increasing the detection efficacy of p53 abnormalities in human lung cancer. *AJCP* 1995b,104(3):319-324.

Gail MH, Eagan RT, Feld R, Ginsberg R, Goodell B, Hill L, Holmes EC, Lukeman JM, Mountain CF, Oldham RK, et al. Prognostic factors in patients with resected stage I non-small cell lung cancer: A report from the Lung Cancer Study Group. *Cancer* 1984; 54(9):1802-1813.

Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Comparison of Mutations in the p53 and K-ras Genes in Lung Carcinomas from Smoking and Nonsmoking Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(4 pt 1):297-302.

Giaccone, G. Oncogenes and antioncologenes in lung tumorigenesis. *Chest* 1996; 109(5 Suppl):130_s-135_s.

Graziano SL. Non-small lung cancer: Clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer* 1997; 17(Suppl 1):S37-S58.

Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, Poiesz BJ. Prognostic Significance of K-ras Codon 12 Mutations in Patients With Resected Stage I and II Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2):668-675.

Greenblatt MS; Bennett WP, Hoollstein M and Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(18):4855-4875.

Guinee DG Jr, Travis WD, Trivers GE, De Benedetti VM, Cawley H, Welsh JA, Bennett WP, Jett J, Colby TV, Tazelaar H, et al. Gender comparasions in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and C-erB-2 expression. *Carcinogenesis* 1995; 16(5): 993-1002.

Gunen H, Kizkin O, Tahaoglu C, Aktas O. Utility of Blind Fórceps Biopsy of the Main Carina and Upper-Lobe Carina in Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2001; 119(2):632-637.

Gupta AK, Harris EER, Bernhard EJ, Muschel RJ, McKenna WG. Overview of Cell Cycle and Apoptosis. In: Lung Cancer Principles and Practice 2000, Ed. Pass H I, Mitchell J B, Johnson D H, Turrisi A T and Minna, J D. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 67-81.

Harris CC. p53 Tumor supressor gene: from the basic research laboratory to the clinic – an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996,17(6):1187-1198.

Hainaut P and Pfeifer GP. Patterns of p53 gene G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001, 22(3):367-374.

Hernandez-Boussard TM and Hainaut P. A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database (Published erratum in *Environ Health Perspect* 1998, 106(9):A421). *Environ Health Perspect* 1998, 106(7):385-391.

Hoffmann D, Rivenson A, Hecht SS. The biological significance of tobacco-specific N-nitrosamines:smoking and adenocarcinoma of the lung. *Crit Ver Toxicol* 1996, 26(2):199-211.

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ and Harris CC. Mutational hotspots in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991, 350(6317):427-428.

Huang C, Taki T, Adachi M, Konishi T, Higashiyama M, Miyake M. Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1998; 16(19):2469-2477.

Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999; 20(8): 1507-1510.

Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 2000, 352(pt 1):1-17.

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 2000, 462(2-3):311-322.

Hussain SP; Hofseth LJ; Harris CC. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer* 2001; 34(Suppl 2):S7-S15.

IARC. International Agency for Research on Cancer. TP53 Mutational Database. World Health Organization, 2002. <http://www.iarc.fr/p53>.

Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde, 2001. <http://www.inca.org.br>

Jassem E, Niklinski J, Rosell R, Niklinska W, Jakobkiewicz J, Monzo M, Chyczewski L, Kobierska G, Skokowski J, Zylicz M, Jassem J. Types and localisation of p53 gene mutations A report on 332 non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2001, 34(Suppl 2):S47-S51.

Jiao JL, Zielenska M, Anderson MW, Glickman BW. Mutational specificities of environmental carcinogens in the lacI gene of Escherichia coli: IV. The tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone. *Carcinogenesis* 1991; 12(2):221-4.

Jiao J, Guttenplan JB, Glickman BW, Anderson MW, Xin LY, Zielenska M. Mutational specificities of environmental carcinogens in the lac 1 gene of Escherichia coli, VII: The host-mediated assay and its comparison with in vitro mutagenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone. *Mol Carcinog* 1993; 8(3):127-131.

Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996; 56(11):2463-2467.

Kahn S, Yamamoto F, Almoguera C, Winter E, Forrester K, Jordano J, Perucho M. The c-K-ras gene and human cancer (review). *Anticancer Res* 1987; 7(4A):639-52.

Kennedy TC, Hirsch FR, Miller YE, Prindiville S, Murphy JR, Dempsey E, Proudfoot S, Bunn PA, Franklin WA. A randomized study of fluorescence bronchoscopy versus white light bronchoscopy for early detection of lung cancer in high risk patients. *Lung Cancer* 2000; 29(11001):244-245.

Kennedy TC, Miller Y, Prindiville, S. Screening for Lung Cancer Revisited and the Role of Sputum Cytology and Fluorescence Bronchoscopy in a High-Risk Group. *Chest* 2000b; 117(Suppl 1):72S-79S.

Kern JA, Slebos RJ, Top B, Rodenhuis S, Lager D, Robinson RA, Weiner D, Schwartz DA. C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 1994; 93(2):516-520.

Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential Frequencies of *p16^{INK4a}* Promoter Hypermethylation, *p53* Mutation, and *K-ras* Mutation in Exfoliative Material Mark the Development of Lung Cancer in Symptomatic Chronic Smokers. *J Clin Oncol* 2000; 18(18):3221-3229.

Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1992; 52(17):4799-4804.

Kobayashi T, Tsuda H, Noguchi M, Hirohashi S, Shimosato Y, Goya T, Hayata Y. Association of point mutation in c-Ki-ras oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytologic subtypes. *Cancer* 1990; 66(2):289-294.

Knudson KP. The pathologic effects of smoking tobacco in the trachea and bronchial mucosa. *Am J Clin Path* 1960; 33:310-317.

Kure EH, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Skaug V, Baera R, Haugen A. p53 mutations in lung tumours: relationship to gender and lung DNA adduct levels. *Carcinogenesis* 1996; 17(10):2201-2205.

Kwiatkowski DJ, Harpole DH Jr, Godleski J, Herndon JE 2nd, Shieh DB, Richards W, Blanco R, Xu HJ, Strauss GM, Sugarbaker DJ. Molecular Pathologic Substaging in 244 Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer Patients: Clinical Implications. *J Clin Oncol* 1998; 16(7):2468-2477.

Lam S, MacAulay C, leRiche JC, Palcic B. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 2000; 89(11 Suppl):2468-2473.

Laudanski J, Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2001; 17(4):660-666.

Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999, 18 (53):7644-7655.

Lee JM, Bernstein A. P53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(12):5742-5746.

Lee LN, Shew JY, Sheu JC, Lee YC, Lee WC, Fang MT, Chang HF, Yu CJ, Yang PC, Luh KT. Exon 8 mutation of p53 gene associated with nodal metastasis in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(6 pt 1):1667-71.

Leung CS, Lung ML. Detection of p53 mutations in Hong Kong colorectal carcinomas by conventional PCR-SSCP analysis versus p53 yeast functional assay. *Anticancer Res* 1999; 19(1A):625-628.

Lewin B. Cell cycle and growth regulation. In: *Genes VI* 1996, Oxford University Press, New York. 1089-1130.

Lewin B. Gene numbers. In: Genes VI 1996b, Oxford University Press, New York. 687-711.

Li ZH, Zheng J, Weiss LM, Shibata D. c-K-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol* 1994; 144(2):303-309.

Lohmann DR, Fessler B, Putz B, Reich U, Bohm J, Prauer H, Wunsch PH, Hofler H. Infrequent mutations of the p53 gene in pulmonary carcinoid tumors. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5797-5801.

Mahari N. Registro de Câncer de Base Populacional de Campinas. In: International Agency for Research on Cancer. Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII, 2002. (aguarda publicação).

Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of Oncogene Mutations in Sputum Precedes Diagnosis of Lung Cancer. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1634-1637.

Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R, et al. p53 Alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 1993; 53(12):2846-2851.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999, 18(53):7621-7636.

De Melo MB, Lorand-Metze I, Lima CS, Saad ST, Costa FF. N-ras gene point mutations in brazilian acute myelogenous leukemia patients correlate with a poor prognosis. *Leuk Lymphoma* 1997; 24(3-4):309-137.

Melo MB. Mutações nos genes supressores de tumores p53 e RB1 em leucemias agudas. *Tese de doutorado Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia*. 1998.

Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CH, Terada M, Koeffler HP. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 1992; 52(7):1695-1698.

Mills NE, Fishman CL, Scholes J, Anderson SE, Rom WN, Jacobson DR. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 1995a; 87(14):1056-1060.

Mills NE, Fishman CL, Rom WN, Dubin N, Jacobson DR. Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995b; 55(7):1444-1447.

Mitsudomi T, Lam S, Shirakusa T, Gazdar AF. Detection and sequencing of p53 gene mutations in bronchial biopsy sample in patients with lung cancer. *Chest* 1993; 104(2):362-65.

Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic Significance of p53 Alterations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):4055-4063.

Miyake M, Adachi M, Huang C, Higashiyama M, Kodama K, Taki T. A Novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18(14):2397-2404.

Mohabeer AJ, Hiti AL & Martin WJ. Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia PhastSystem. *Nucleic Acids Res* 19(11):3154, 1991.

Moreira JS, et al. Carcinoma brônquico. In: Tarantino AB. Doenças Pulmonares. Ed. Guanabara Koogan S.A., 1990; 3ª ed:397-411.

Mountain, CF. Revisions in the internacional system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111(6):1711-1717.

Murakami I, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M, Kasagi F, Yokosaki Y. p53 Gene Mutations Are Associated with Shortened Survival in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: An Analysis of Medically Patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):526-530.

Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H, Nakayama H. Implications of staging in lung cancer. *Chest* 1997; 112(4 Suppl):242S-248S.

Niklinski J, Niklinsk W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001a; 34(Suppl 2):S53-58.

Niklinski J, Niklinska W, Chyczewski L, Becker HD, Pluygers E. Molecular genetic abnormalities in premalignant lung lesions: biological and clinical implications. *Eur J Cancer Prev* 2001b; 10(3):213-226.

Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Autio-Harmanen H, Risteli L, Risteli J, Vahakangas K, Paakko P. Concurrent p53 expression in bronchial dysplasias and squamous cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 142(2):725-732.

Ohgaki H, Hard GC, Hirota N, Maekawa A, Takahashi M, Kleihues P. Selective mutation of codons 204 and 213 of the p53 gene in rat tumors induced by alkylating N-nitroso compounds. *Cancer Res* 1992; 52(10):2995-2998.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Sci USA* 1989; 86(8):2766-2770.

Pairolero PC, Williams DE, Bergstralh EJ, Piehler JM, Bernatz PE, Payne WS. Postsurgical stage I bronchogenic carcinoma: morbid implications of recurrent disease. *Ann Thorac Surg* 1984; 38(4):331-338.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49(1):33-64.

Peto R, et al. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull* 1996; 52(1):12-21.

Pfeifer GP. p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res* 2000, 450(1-2):155-166.

Popp W, Vahrenholz C, Schuster H, Wiesner B, Bauer P, Tauscher F, Plogmann H, Morgenroth K, Konietzko N, Norpoth K. p53 mutations and codon 213 polymorphism of p53 in lung cancers of former uranium miners. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(5):309-312.

Przygodzki RM, Finkelstein SD, Langer JC, Swalsky PA, Fishback N, Bakker A, Guinee DG, Koss M, Travis WD. Analysis of p53, K-ras-2, and C-raf-1 in pulmonary neuroendocrine tumors. Coorelation with histologycal subtype and clinical outcome. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1531-1541.

Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52(17):4828-4831.

Rabin CB, Selikoff IJ, Kramer R. Paracarinal biopsy in evaluation of operability of carcinoma of the lung. *Arch Surg* 1952; 65:822-830.

Reinmuth N, Brandt B, Kunze WP, Junker K, Thomas M, Achatzy R, Scheld HH, Semik M. Ploidy, expression of *erbB1*, *erbB2*, p53 and amplification fo *erbB1*, *erbB2* and *erbB3* in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2000; 16(5):991-996.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK (eds). SEER cancer statistics review, 1973-1997, *National Cancer Institute*. Bethesda, MD, 2000.

Robbins HM, Morrison DA, Sweet ME, Solomon DA, Goldman AL. Biopsy of the main carina: staging lung cancer with the fiberoptic broncho-scope. *Chest* 1979; 75(4):484-486

Rodenhuis S, Slebos RGC. The ras oncogenes in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(6 pt 2): S27-S30.

Rodenhuis S, Slebos RGC. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52(9 Suppl): 2665_s-2669_s.

Rodin SN and Rodin AS. Human lung cancer and p53: The interplay between mutagenesis and selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(22):12244-12249.

Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161(4 pt 1):1355-1367.

Ruggeri B, DiRado M, Zhang SY, Bauer B, Goodrow T and Klein-Szanto AJ. Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibits frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(3):1013-1017.

Ryberg D, Kure E, Lystad S, Skaug V, Stangeland L, Mercy I, Borresen AL, Haugen A. p53 mutations in lung tumors: Relationship to putative susceptibility markers for cancer. *Cancer Res* 1994a; 54(6):1555-1555.

Ryberg D, Hewan-Lowe A, Phillips DH, Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res* 1994b; 54(22):5801-03.

Sagawa M, Saito Y, Fujimura S, Linnoila RI. K-ras point mutation occurs in the early stage of carcinogenesis in lung cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(5): 720-723.

Scott FM, Modali R, Lehman TA, Seddon M, Kelly K, Dempsey EC, Wilson V, Tockman MS, Mulshine JL. High Frequency of K-ras Codon 12 Mutations in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients at High Risk for Second Primary Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3(3):479-482.

Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K, Dittler HJ, Cleary KR, Troster M, Siewert JR, Roth JA. Mutations of p53 in Barrett's Esophagus and Barrett's Cancer: A Prospective Study of Ninety-eight Cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111(2):323-333.

Schneider PM, Praeuer HW, Stoeltzing O, Boehm J, Manning J, Metzger R, Fink U, Wegerer S, Hoelscher AH, Roth JA. Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erb-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000; 83(4):473-479.

Seike M, Gemma A, Hosoya Y, Hemmi S, Taniguchi Y, Fukuda Y, Yamanaka N, Kudoh S. Increase in the Frequency of *p16^{INK4}* Gene Inactivation by Hypermethylation in Lung Cancer during the Process of Metastasis and Its Relation to the Status of *p53*. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11):4307-4313.

Sheikh MS, Fornace Jr AJ. Role of p53 Family Members in Apoptosis. *J Cell Physiol* 2000, 182(2):171-181.

Shipman R, Schraml P, Colombi M, Raefle G, Dalquen P, Ludwig C. Frequent TP53 gene alterations (mutation, allelic loss, nuclear accumulation) in primary non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A(2) 335-341.

Shure D, Fedullo PF, Plummer M. Carinal forceps biopsy via the fiberoptic bronchoscopy in the routine staging of lung cancer. *West J Med* 1985;142(4):511–513.

Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18(45):6145-6157.

Skaug V, Ryberg D, Kure EH, Arab MO, Stangeland L, Myking AO, Haugen A. p53 Mutations in Define Structural and Functional Domains Are Related to Poor Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1031-1037.

Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship Between K-ras oncogene activation and smoking adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(14):1024-1027.

Smida J, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Lehmann L, Minkus G, Negele T, Spelsberg F, Hieber L, Demidchik EP, Lengfelder E, Bauchinger M. p53 mutations in childhood thyroid tumors from Belarus and in thyroid tumors without radiation history. *Int J Cancer* 1997; 73(6):802-807.

Smit EF, Groen HJ, Splinter TA, Ebels T, Postmus PE. New prognostic factors in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* 1996; 51(6): 638-646.

Smith RA, Glynn TJ. Early Lung Câncer Detection – Current and Ongoing Challenges. *Cancer* 2000; 89 (11): 2327-2328 Suppl.

Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP. Targetin of Lung Cancer Mutational Hotspots by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92(10):803-811.

Somers VA, Pietersen AM, Theunissen PH, Thunnissen FB. Detection of K-ras Point Mutation in Sputum From Patients With Adenocarcinoma of the Lung by Point-EXACCT. *J Clin Oncol* 1998; 16(9):3061

Somers VA, van Henten AM, ten Velde GP, Arends JW, Thunnissen FB. Additional value of *K-ras* point mutations in bronchial wash fluids for diagnosis of peripheral lung tumors. *Eur Respir J* 1999; 13(5):1120-1124.

Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, Meert AP, Vallot F, Lafitte JJ, Sculier JP. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J* 2001; 18(4):705-719.

Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T. ras Gene mutations as a prognosis marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res* 1992; 52(10):2903-2906.

Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: Association between mutations and smoking. *Cancer Res* 1992, 52(3):734-736.

Szabo E, Birrer MJ, Mulshine JL. Early detection of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20(4): 374-382.

Takagi Y, Koo LC, Osada H, Ueda R, Kyaw K, Ma CC, Suyama M, Saji S, Takahashi T, Tominaga S, et al. Distinct mutational spectrum of the p53 gene in lung cancers from Chinese women in Hong Kong. *Cancer Res* 1995, 55(22):5354-5357.

Takahashi T, Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R. The p53 gene is very frequently mutated in small cell lung cancer with distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 1991, 6(10):1775-1778.

Takise A, Kodama T, Shimosato Y, Watanabe S, Suemasu K. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer* 1988; 61(10):2083-2088.

Thompson SPM. Changing patterns of lung cancer histology with age and gender. *Thorax* 1998; 53: P10.

Tornaletti S, Pfeifer GP. Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. *Oncogene* 1995; 10(8):1493-1499.

Tomizawa Y, Kohno T, Fujita T, Kiyama M, Saito R, Noguchi M, Matsuno Y, Hirohashi S, Yamaguchi N, Nakajima T, Yokota J. Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999; 18(4):1007-1014.

Toro IFC. Fatores prognósticos clínicos-cirúrgicos e histológicos de sobrevida em pacientes com carcinoma não pequenas células de pulmão. *Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas*. 2000.

Travis WD, Travis LB, Devessa SS. Lung Cancer [published erratum appears in *Cancer* 1995; 75(12):2979]. *Cancer* 1995; 75(1 Suppl): 191-202.

Tseng JE, Rodriguez M, Ro J, Liu D, Hong WK, Mao L. Gender Differences in p53 Mutational Status in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 1999; 59(22):5666-5670.

Vähäkangas KH, Bennett WP, Castren K, Welsh JA, Khan MA, Blomeke B, Alavanja MC, Harris CC. p53 and K-ras Mutations in Lung Cancers from Former and Never-Smoking Women. *Cancer Res* 2001, 61(11):4350-4356.

Vega FJ, Iniesta P, Caldes T, Sanchez A, Lopez JA, de Juan C, Diaz-Rubio E, Torres A, Balibrea JL, Benito M. p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(1):44-51.

Versteegh RM, Swierenga J. Bronchogenic evaluation of operability of pulmonary carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1963;56:603– 611.

Vineis P, Caporaso N. Tobacco and cancer: epidemiology and laboratory. *Environ Health Perspect* 1995, 103(2):156-160.

Wada H, Tanaka F, Yanagihara K, Ariyasu T, Fukuse T, Yokomise H, Inui K, Mizuno H, Ike O, Hitomi S. Time trends and survival after operations for primary lung cancer from 1976 through 1990. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112(2):349-355.

Waltner JG. Inoperability of carcinoma of the lung established by carinal biopsy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1961; 70:1165.

Wang YC, Lee HS, Chen SK, Yang SC, Chen CY. Analysis of K-ras gene mutations in lung carcinomas: correlation with gender, histological subtypes, and clinical outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998a; 124(9):517-522.

Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res* 1998b, 58(2):328-333.

Warren WH & Faber LP. Extended resections for locally advanced non-small cell lung cancer. In: Lung Cancer Principles and Practice 2000, Ed. Pass H I, Mitchell J B, Johnson D H, Turrisi A T and Minna, J D. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 694-715.

Watanabe Y, et al. Surgical treatment of hilar and peripheral early NSCLC. In: Dominioni L, Strauss GM, editors. Proceedings of the International Conference on Prevention and Early Diagnosis of Lung Cancer, December 9-10, 1998:198-205.

Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, Hruban RH. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1993; 72(2):432-438.

Westra WH, Baas IO, Hruban RH, Askin FB, Wilson K, Offerhaus GJ, Slebos RJ. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res* 1996; 56(9):2224-2228.

Williams DE, Pairolero PC, Davis CS, Bernatz PE, Payne WS, Taylor WF, Uhlenhopp MA, Fontana RS. Survival of patient surgically treated for stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82(1):70-76

Zambon L. Carcinoma brônquico: análise de uma série de casos atendidos no ambulatório de oncopneumologia das disciplinas de pneumologia e cirurgia torácica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. *Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Médicas*. 1994.

Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR, Jacks T, Guan KL, You M. Wildtype *Kras2* can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nature Genetics* 2001; 29(1):25-33.

Zheng J, Shu Q, Li ZH, Tsao JI, Weiss LM, Shibata D. Patterns of p53 mutations in squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Pathol* 1994; 145(6):144-1449.

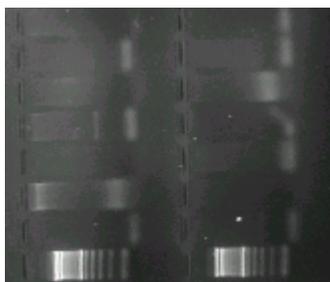
Zubrod CG, Schneiderman M, Frei E, et al. Appraisal of methods for the study of chemotherapy of cancer in man: comparative therapeutic trial of nitrogen mustard and triethyl-enethiophosphoramidate. *J Chronic Dis* 11:7-33, 1960.



8. ANEXOS

Seqüência do gene *p53* (exons 2 a 11). Sítios CpGs estão em vermelho.

1 EXON2 ...ATG GAG GAG CCG CAG TCA GAT CCT AGC GTC GAG CCC CCT CTG AGT 15
16 CAG GAA ACA TTT TCA GAC CTA TGG AAA CT EXON3 A CTT CCT GAA AAC AAC 30
31 GTT CTG EXON4 TCC CCC TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GAT TTG ATG CTG 45
46 TCC CCG GAC GAT ATT GAA CAA TGG TTC ACT GAA GAC CCA GGT CCA 60
61 GAT GAA GCT CCC AGA ATG CCA GAG GCT GCT CCC CGC GTG GCC CCT 75
76 GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC 90
91 TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC 105
106 AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG 120
121 TCT GTG ACT TGC ACG EXON5 TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC 135
136 CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA 150
151 CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG 165
166 TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG 180
181 CGC TGC TCA GAT AGC GAT G EXON6 GT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC 195
196 CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC 210
211 ACT TTT CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG EXON7 GTT 225
226 GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT 240
241 TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC 255
256 ACA CTG GAA GAC TCC AG EXON8 T GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT 270
271 GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG 285
286 GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC 300
301 CCA GGG AGC ACT AAG CGA G EXON9 CA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT 315
316 CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC ACC CTT 330
331 CAG EXON10 ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT 345
346 GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT GGG AAG GAG CCA GGG 360
361 GGG AGC AGG GCT CAC TCC AG EXON11 C CAC CTG AAG TCC AAA AAG GGT CAG 375
376 TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA GAA GGG CCT 390
391 GAC TCA GAC TGA



Exon 4 – 307pb (biópsias tumores)

1ª coluna: Ladder 100pb, CN, CN2, 4, 6, 8, 9, 10

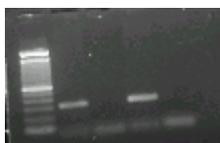
2ª coluna: 11, 12, 13, 17, 20, 24, 27



Exon 4- 307pb (biópsias tumores)

1ª coluna: 26, 34, 35, 36, 37, 39, 42

2ª coluna: 43, 46, 49, 52, 55, 57, 62



Exon 4 –307pb

Ladder 100pb, peça cirúrgica(1µl de DNA), CN(1µl de DNA), peça cirúrgica(2µl de DNA),CN(2µl de DNA).Em todos há um resto de primer e somente a peça cirúrgica foi amplificada.



Exon 4- 307pb

Ladder 100pb, tumor 34, tumor35, peça cirúrgica, peça cirúrgica.

1. Gel de Acrilamida 4,75% (estoque de 100 ml)

→ 36g de uréia (SIGMA);

→ 1g de resina (AMBERLITE MB 150 RESINA);

→ 10 ml de TBE 10X;

→ Acrilamida (4,28g de acrilamida – GIBCO BRL + 0,23g de Bis Aryloyl-Piperazina – SIGMA);

Misturar a uréia + resina + TBE + acrilamida e q.s.p. 100 ml. Homgeinizar tudo e filtrar.

2. TBE 10X concentrado (estoque de 100 ml)

→ 108g Trizma – Base (SIGMA);

→ 55g Ácido Bórico (SIGMA);

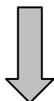
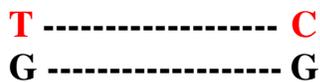
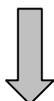
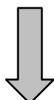
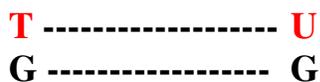
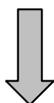
→ 8,3g de EDTA (GIBCO – BRL), pH 8,5.

→ q.s.p. 100 ml

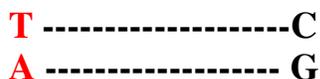
MAPA DOS PACIENTES – AMOSTRAS DE TUMOR

MAPA DOS PACIENTES – AMOSTRA DE MUCOSA

Mutação espontânea em sítios CpG metilados (mCpG)



REPLICAÇÃO



1. Sítio CpG metilado sofre desaminação espontânea e é convertido em timina. O sítio CpG não metilado ao sofrer desaminação é convertido em uracila. A desaminação da metilcitosina é um evento raro, enquanto que a desaminação da citosina é mais comum e por isso existe um sistema protetor.

2. A enzima uracil-DNA-glicosidase remove o resíduo uracila. Isto deixa uma guanina livre e o "sistema de reparo" insere uma citosina.

3. Devido ao sistema protetor da uracil-DNA-glicosidase, o sítio CpG não metilado não sofre mutação. No sítio mCpG ocorre a transição G→A, característica das mutações espontâneas (vide discussão).

