

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**FERNANDA MAGRI DE CARVALHO**

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 NO GENE *TP53* EM  
PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE  
HEPÁTICA SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR  
DIAGNOSTICADOS EM VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO**

**VITÓRIA  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FERNANDA MAGRI DE CARVALHO**

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 NO GENE *TP53* EM  
PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE  
HEPÁTICA SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR  
DIAGNOSTICADOS EM VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

**VITÓRIA  
2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C331p Carvalho, Fernanda Magri de, 1983-  
Prevalência da mutação ser-249 no gene *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular diagnosticados em Vitória, Espírito Santo /  
Fernanda Magri de Carvalho. – 2009.  
101 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Co-Orientador: Iuri Drumond Louro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Fígado - Câncer. 2. Cirrose hepática. 3. Aflatoxina. 4. Hepatite B. 5. Mutação. I. Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Louro, Iuri Drumond. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

À minha família amada, por me apoiarem em todas as minhas decisões e acreditarem em mim incondicionalmente.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pela paciência e dedicação com que me orientou e pelo exemplo que foi para mim de um profissional ético e dedicado; pretendo tê-lo como modelo por toda a minha vida. A convivência com o senhor e seus ensinamentos foram fundamentais para meu amadurecimento e aprendizado.

Ao prof. Dr. Lúri Drumond Louro, por acreditar em mim e me orientar desde a iniciação científica. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e pelo incentivo à produção científica.

Ao prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho e a prof. Dra. Liliana Cruz Spano, por aceitarem participar da minha banca examinadora e a prof. Dra. Flávia de Paula, por aceitar participar da minha banca como membro suplente e por todo auxílio durante a minha formação acadêmica.

À Dr. Patrícia Lofego Gonçalves, médica do serviço de Gastroenterologia, por se disponibilizar prontamente a ajudar na coleta das amostras dos pacientes.

Ao Dr. Robson, residente da Patologia e demais funcionários do Serviço de Patologia do HUCAM que me auxiliaram na obtenção das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC), pela bolsa de estudo e apoio financeiro neste trabalho.

Aos colegas do mestrado, por dividirem comigo cada sensação experimentada nestes dois anos.

Ao Thiago de Almeida Pereira, que além de se aventurar junto comigo neste projeto, participando de todas as etapas, ainda teve uma paciência e dedicação imensuráveis em todos os momentos. Obrigada por sua ajuda, sem ela o trabalho teria sido muito mais difícil e menos gratificante!

À Eldamária de Vargas Wolfgramm, companheira-irmã de laboratório desde a iniciação científica, que muito me ajudou nas atividades e também com os seus conselhos.

À Mariana P. De Nadai Sartori, pelo seu carinho e apoio nos momentos difíceis do projeto. Com suas palavras meigas e sua dose de otimismo e alegria não me deixou desanimar e ainda me presenteou com a sua banca.

Aos demais amigos do NGHM, em especial, às biólogas Ângela e Vera, à Dra. Regina, à Rosana, aos alunos (as) Bruno, Amanda, Lívia, Clara, Vitor, Márcio, Marcos, Elaine, Leonardo, Beatriz, Júlia, Geise, por tornarem os dias nos laboratórios mais agradáveis. Muito obrigada a todos!

Às minhas grandes amigas Juliana e Talita, pela amizade verdadeira de anos. Saber que posso contar com vocês me fortalece muito. Obrigada pela amizade e por compreenderem o pouco tempo dedicado a vocês por causa da dissertação.

Ao Gabriel, pelo amor, companheirismo, preocupação, carinho, cuidado, dedicação e, neste período, obrigada pela paciência e por abdicar de tantas coisas para me permitir concluir este trabalho. Obrigada por estar sempre comigo e me fazer uma pessoa muito mais feliz e realizada!

A todos os meus parentes que torceram e oraram por mim, principalmente minha mãe, minha irmã e ao Márcio. Vocês são meu porto seguro e é de vocês que vem a minha força, o meu alicerce e é para vocês que eu dedico todas as minhas vitórias.

A Deus, para Quem não tenho nem palavras para agradecer todas as bênçãos que concede a mim. Muito obrigada Senhor pela vida e por estar sempre comigo!

## RESUMO

A incidência do carcinoma hepatocelular (CHC) apresenta grandes variações geográficas associadas a diferentes prevalências dos seus fatores etiológicos mais comuns. Embora não se conheça a sua real incidência no Espírito Santo, o CHC é freqüentemente diagnosticado no estado, associado à infecção com os vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite C. No entanto, cerca de 40% dos casos não apresentam evidências destes fatores etiológicos. Por essa razão, buscou-se verificar se outro fator – aflatoxinas – poderia estar envolvido na etiologia do CHC no ES. Nas regiões tropicais, as aflatoxinas são consideradas um importante fator etiológico do CHC, especialmente quando associadas à infecção com o VHB. O objetivo da presente investigação foi estudar a prevalência da mutação específica ser-249 no gene *TP53*, cuja presença é um indicador indireto de contaminação alimentar com estas micotoxinas e sua relação com a infecção pelo VHB. Foram investigadas 41 amostras de CHC e 74 amostras de cirrose hepática sem CHC, utilizando-se a metodologia de PCR-RFLP e sequenciamento. O DNA do VHB foi pesquisado com iniciadores específicos para seis diferentes regiões do seu genoma. Os iniciadores utilizados foram escolhidos considerando as regiões mais conservadas do genoma viral e englobando os oito genótipos já identificados do VHB. A presença do DNA do VHB foi observada em 46% (19/41) dos casos de carcinoma hepatocelular estudados. A mutação ser-249 *TP53* foi observada em 15% (6/41) e 1,5% (1/69) dos casos de CHC e de cirrose hepática sem CHC associado, respectivamente, não havendo correlação estatisticamente significativa com a presença do DNA do VHB. Foram encontradas outras quatro mutações no códon 250 do gene *TP53*. A prevalência total de 24% (10/41) de mutações ser-249 e mutações no códon 250 nos pacientes com carcinoma hepatocelular – possivelmente também associadas à contaminação com aflatoxinas – pode indicar a provável exposição alimentar às aflatoxinas no Espírito Santo.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular. Cirrose hepática. Aflatoxina. Vírus da hepatite B. Mutação ser-249 *TP53*.



## ABSTRACT

The hepatocellular carcinoma (HCC) incidence has large geographic variation, which is associated with the different prevalences of its most common etiological factors. Although its real incidence in the Espírito Santo State is not known, the HCC is frequently diagnosed in ES associated with hepatitis B (HBV) and C virus infections. However, approximately 40% of the cases do not present known etiological factors. Therefore, it was the purpose of this study to verify if another factor - aflatoxins - could be involved in the HCC etiology in ES. In tropical areas, the aflatoxins are considered an important etiological factor of HCC, especially when associated with HBV infection. The aim of this investigation was to study the prevalence of the specific ser-249 mutation in the *TP53* gene was studied, that indicates indirect food contamination with aflatoxins and its association with HBV infection. Forty-one HCC samples and seventy-four hepatic cirrhosis samples were investigated, using PCR-RFLP methodology and sequencing. The HBV DNA was amplified with specific primers targeting six different regions of its genome. Primers were chosen considering the most conserved regions of the viral genome and encompassing the eight known genotypes of HBV. Presence of HBV DNA was observed in 46% (19/41) of the hepatocellular carcinoma cases studied. The ser-249 *TP53* mutation was observed in 15% (6/41) and 1,5% (1/69) of the HCC and cirrhosis cases respectively, not having statistical correlation with the presence of HBV DNA. Other four mutations in *TP53* codon 250 were found, yielding a total mutation prevalence of 24% (10/41), considering both ser-249 and codon 250 mutations, possibly also associated with food contamination by aflatoxins, and suggesting an alimentary exposition to aflatoxins in Espírito Santo.

Key words: Hepatocellular carcinoma. Hepatic Cirrhosis. Aflatoxin. Hepatitis B virus. Ser-249 *TP53* mutation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Variação mundial da incidência do câncer de fígado entre homens por 100.000 habitantes .....	21
<b>Figura 2</b> - Representação da proteína p53 .....	24
<b>Figura 3</b> - Mutações no gene <i>TP53</i> .....	25
<b>Figura 4</b> - Incidência mundial do CHC e o padrão de mutação encontrado no <i>TP53</i> .....	26
<b>Figura 5</b> - Via de ativação metabólica da AFB1 .....	30
<b>Figura 6</b> - Partícula viral e estrutura genômica do VHB .....	39
<b>Figura 7</b> - Mecanismos da hepatocarcinogênese mediada pelo VHB .....	43
<b>Figura 8</b> - Detecção da mutação ser-249 .....	53
<b>Figura 9</b> - Genoma viral evidenciando as regiões amplificadas pelos iniciadores virais ..	56
<b>Figura 10</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida do <i>amplicon</i> de 179 pb do <i>TP53</i> .....	62
<b>Figura 11</b> - Eletroforese em géis de poliacrilamida dos produtos da restrição enzimática ..	63
<b>Figura 12</b> - Sequenciamento do éxon 7 do gene <i>TP53</i> .....	64
<b>Figura 13</b> - Sequenciamento do éxon 7 do gene <i>TP53</i> .....	66
<b>Figura 14</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR dos seis pares de iniciadores virais .....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas .....	37
<b>Tabela 2</b> - Informações obtidas de trabalhos que investigaram a presença de aflatoxinas ou do fungo <i>Aspergillus</i> em amostras alimentícias provenientes de diferentes regiões do Brasil .....	37
<b>Tabela 3</b> - Padrão global da infecção crônica pelo vírus da hepatite B .....	40
<b>Tabela 4</b> - Dados epidemiológicos da infecção pelo vírus da hepatite B em diferentes populações do Brasil .....	41
<b>Tabela 5</b> - Dados demográficos e fatores etiológicos de 41 casos de carcinoma hepatocelular .....	59
<b>Tabela 6</b> - Dados demográficos e fatores etiológicos de 74 casos de cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular .....	60
<b>Tabela 7</b> - Resultados sobre a presença das mutações no éxon 7 do <i>TP53</i> nas amostras de CHC e de cirrose hepática .....	65
<b>Tabela 8</b> - Distribuição das mutações em relação à etiologia do carcinoma hepatocelular .....	67
<b>Tabela 9</b> - Presença da mutação nos casos de carcinoma hepatocelular com ou sem cirrose associada .....	67
<b>Tabela 10</b> - Prevalência da infecção pelo VHB em pacientes com carcinoma hepatocelular em diferentes regiões do mundo .....	96
<b>Tabela 11</b> - Prevalência da mutação ser-249 <i>TP53</i> em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática provenientes de regiões expostas a diferentes níveis de aflatoxina .....	97

## LISTA DE SIGLAS

A	base nitrogenada adenina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFB	aflatoxina B
AFM	aflatoxina M
Anti-VHC	anticorpos contra o antígeno do vírus da hepatite C
ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
APS	persulfato de amônio
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	base nitrogenada citosina
CH	cirrose hepática
CHC	carcinoma hepatocelular
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
G	base nitrogenada guanina
HBcAg	antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite B
HBeAg	antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg	antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HEMOES	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Espírito Santo
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
leu	aminoácido leucina
min	minuto
NH <sub>4</sub> OAc	acetato de amônio
nt	nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORF	<i>open reading frame</i>
PA	para análise
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucléico
SAME	serviço de arquivo médico e estatística
SDS	dodecil sulfato de sódio
seg	segundos
ser	aminoácido serina
T	base nitrogenada timina
TA	temperatura ambiente
TBE	tris borato EDTA
TE9	tris EDTA pH 9
TEMED	N', N', N', N'- Tetrametiletilenodiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
g	grama
°C	grau Celsius
Xg	gravidade
h	hora
∞	infinito
®	marca registrada
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
ng	nanograma
pb	pares de base
ppb	partes por bilhão
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
U	unidade
X	vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	20
<b>2.1.1 Carcinoma hepatocelular no Brasil</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.2 Fatores etiológicos relacionados com o CHC</b> .....	<b>23</b>
2.2 GENE <i>TP53</i> .....	23
2.3 MUTAÇÃO DO GENE <i>TP53</i> .....	25
2.4 AFLATOXINAS .....	28
<b>2.4.1 Metabolismo das aflatoxinas e formação do aduto AFB1- DNA</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4.2 Reatividade da AFB1 com as seqüências de DNA</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4.3 Efeitos carcinogênicos das aflatoxinas em diferentes espécies</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4.4 Evidências da associação de aflatoxinas com o carcinoma hepatocelular</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4.5 Aflatoxinas no Brasil</b> .....	<b>36</b>
2.5 VÍRUS DA HEPATITE B .....	38
<b>2.5.1 Epidemiologia do vírus da hepatite B</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5.2 Mecanismos da hepatocarcinogênese pelo vírus da hepatite B</b> .....	<b>42</b>
2.6 AÇÃO SINÉRGICA DE AFLATOXINAS E VÍRUS DA HEPATITE B NA HEPATOCARCINOGENESE .....	44
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO .....	48
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	48
4.3 AMOSTRAS ESTUDADAS .....	48
<b>4.3.1 Amostras de fígado de pacientes com carcinoma hepatocelular</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3.2 Amostras de plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular</b> .....	<b>49</b>
<b>4.3.3 Amostras de fígado de pacientes com cirrose hepática</b> .....	<b>49</b>
<b>4.3.4 Amostras de plasma de pacientes com cirrose hepática</b> .....	<b>49</b>
4.4 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO SER-249 <i>TP53</i> .....	50
<b>4.4.1 Extração do DNA</b> .....	<b>50</b>

4.4.1.1 Amostras de fígado .....	50
4.4.1.2 Amostras de plasma .....	50
<b>4.4.2 Detecção da mutação ser-249 no gene <i>TP53</i> pelo método PCR- RFLP .....</b>	<b>50</b>
4.4.2.1 Reação de PCR .....	51
4.4.2.2 Digestão dos fragmentos pelo método de RFLP .....	52
4.4.2.3 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida .....	52
4.4.2.4 Método de impregnação pela prata .....	52
4.4.2.5 Interpretação dos resultados obtidos pelo método PCR-RFLP .....	53
<b>4.4.3 Detecção da mutação ser-249 no gene <i>TP53</i> pelo sequenciamento .....</b>	<b>54</b>
4.4.3.1 Extração de DNA do fragmento com a mutação a partir do gel de poliacrilamida .	54
4.4.3.2 Amplificação dos fragmentos com a mutação .....	54
4.4.3.3 Purificação do produto de PCR .....	55
4.4.3.4 Análise dos resultados de sequenciamento .....	55
4.5 PESQUISA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B .....	55
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS UTILIZADAS .....	59
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	60
<b>5.2.1 Amostras de fígado .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.2 Amostras de plasma .....</b>	<b>61</b>
5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>TP53</i> .....	62
5.4 RESULTADOS DE RFLP .....	62
5.5 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO .....	64
5.6 MUTAÇÕES DETECTADAS .....	64
<b>5.6.1 Mutação ser- 249 <i>TP53</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>5.6.2 Outras mutações no éxon 7 do gene <i>TP53</i> .....</b>	<b>66</b>
5.7 DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B .....	68
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
6.1 FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 <i>TP53</i> NOS CASOS DE CHC .....	71
<b>6.1.1 Frequência da mutação ser-249 <i>TP53</i> e presença do DNA do VHB .....</b>	<b>73</b>
6.2 FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 <i>TP53</i> NOS CASOS DE CH .....	74
6.3 COMENTÁRIOS SOBRE PESQUISA DA MUTAÇÃO SER-249 <i>TP53</i> NO DNA EXTRAÍDO DO PLASMA .....	75
6.4 OUTRAS MUTAÇÕES OBSERVADAS NO EXON 7 DO GENE <i>TP53</i> .....	76
6.5 COMENTÁRIOS SOBRE O MÉTODO RFLP NA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO	



SER-249 <i>TP53</i> .....	77
6.6 COMENTÁRIOS SOBRE OS INICIADORES UTILIZADOS PARA DETECTAR O DNA DO VHB NAS AMOSTRAS DE CHC .....	78
6.7 COMENTÁRIOS SOBRE O MÉTODO DE EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO .....	79
6.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>101</b>

# ***1 INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor maligno freqüentemente associado a fatores ambientais, cuja incidência tem grandes variações geográficas, inclusive no Brasil, variações estas associadas a diferentes prevalências dos fatores etiológicos mais comuns (SHERMAN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2006; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007). Embora não se conheça a sua real incidência no Espírito Santo, o CHC é freqüentemente diagnosticado no Estado, associado à infecção com os vírus B e C da hepatite e alcoolismo crônico, mas cerca de 40% dos casos não apresentam evidências desses fatores etiológicos (PEREIRA; GONÇALVES; BONI, 1981; GONÇALVES et al., 1986, GONÇALVES, PEREIRA; GAYOTTO, 1997). Por essa razão, suspeita-se que outros fatores, especialmente aflatoxinas, possam estar envolvidos na etiologia do CHC no Estado do Espírito Santo.

Mutações no gene supressor de tumor *TP53*, considerado um guardião da integridade do genoma celular, têm sido identificadas em vários cânceres humanos. Nos casos de CHC, particularmente, tem sido identificado um sítio 'hotspot' que apresenta uma mutação no códon 249 do éxon 7 deste gene. A mutação é uma transversão de uma base guanina para uma timina na terceira base do códon 249 (AGG para AGT), resultando em substituição de aminoácidos, uma arginina por uma serina (mutação ser-249 *TP53*). Hsu e colaboradores (1991) e Bressac e colaboradores (1991) demonstraram que essa mutação nos pacientes com CHC é especificamente associada à exposição às aflatoxinas. Em regiões onde a contaminação é alta, a mutação ser-249 *TP53* é encontrada com freqüência nos casos de CHC (SCORSONE et al., 1992; COURSAGET et al., 1993; YANG et al., 1997; KIRK et al., 2005), enquanto em regiões onde a exposição é baixa, um número reduzido ou mesmo a ausência dessas mutações é observada (ODA et al., 1992; KAZACHKOV et al., 1996; KIRK et al., 2000).

As aflatoxinas são toxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, os quais se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros. A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais prevalente e carcinogênica dentre as aflatoxinas (IARC, 2002).

Há evidências experimentais e epidemiológicas mostrando a interação sinérgica entre as aflatoxinas e o vírus da hepatite B. Alguns estudos de coorte mostraram que a presença dos dois fatores etiológicos pode aumentar consideravelmente o risco para o câncer e/ou a diminuição na idade do aparecimento do tumor (ROSS et al., 1992; CHEN et al., 1992; LUNN et al., 1997; YU et al., 1997; SUN et al., 1999).

Como existem observações mostrando que não é rara a contaminação de produtos alimentícios para consumo humano e animal com aflatoxinas no Brasil (OLIVEIRA, G.R., et al., 2006; CAMPOS et al., 2008; GONÇALEZ et al., 2008), pode-se suspeitar que essas toxinas estejam relacionadas com a etiologia do CHC no nosso meio (GONÇALVES et al., 2006).

No Estado do Espírito Santo, não há nenhum relato publicado sobre a presença de aflatoxinas contaminando alimentos ou rações animais e nem sobre a mutação ser-249 *TP53* em casos de carcinoma hepatocelular ou de cirrose hepática (CH). O levantamento da literatura pelo PUBMED não mostrou nenhuma publicação sobre a ocorrência dessa mutação no Brasil. A investigação da mutação ser-249 *TP53* pode representar um indicativo indireto de exposição às aflatoxinas no Estado, já que essa mutação é considerada um marcador biológico de exposição a essas toxinas (KIRK et al., 2000). Por essas razões foi planejada a presente investigação, com a finalidade de avaliar a prevalência da mutação ser-249 *TP53* em casos de carcinoma hepatocelular e de cirrose hepática diagnosticados no Espírito Santo.

Esta dissertação foi redigida de acordo com as normas da ABNT, exceto as referências bibliográficas que serão listadas conforme aparecem no PUBMED, sem a indicação do dia e mês da publicação.

## ***2 REVISÃO DE LITERATURA***

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores malignos de órgãos internos mais freqüentes na espécie humana (GONÇALVES et al., 2006; HUSSAIN et al., 2007). Tem prognóstico ruim, com mortalidade semelhante à incidência (mortalidade/incidência de 0,98:1), sendo, mundialmente, a terceira causa mais comum de morte por câncer no sexo masculino, depois do câncer de pulmão e do estômago (PISANI et al., 1999; PARKIN et al., 2005).

Um aspecto peculiar do CHC é a grande variação geográfica em sua incidência: muito freqüente em algumas regiões – como África sub-Saariana, Sudeste Asiático (em maior destaque a China) e Melanésia – e rara em outras, como América do Norte (em especial o Canadá e os Estados Unidos), Norte Europeu e Oceania (SHERMAN et al., 2005; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007). A Figura 1 mostra a distribuição da incidência do CHC no mundo.

Universalmente, o CHC predomina no sexo masculino. A relação masculino/feminino varia de 1,5 a 3:1 nas regiões de baixa incidência do tumor, podendo chegar até 8:1 nas regiões de maior incidência (GONÇALVES et al., 2006).

A idade do aparecimento do CHC é variável, sendo mais baixa em regiões de maior incidência (especialmente na África) e mais alta nas regiões de menor incidência. A associação de fatores etiológicos influencia na idade do aparecimento do tumor: a ingestão abusiva do etanol em pacientes infectados com os vírus B ou C da hepatite reduz significativamente a idade na qual o tumor é diagnosticado (PEREIRA; GONÇALVES; ZAGO, 1994).

Os aspectos anatomopatológicos do tumor têm pouca variação geográfica: são tumores nodulares, únicos ou múltiplos, com freqüência pseudo-encapsulados, que invadem precocemente a veia porta. O aspecto histológico mais comum é a variedade trabecular, mas formas adenocísticas e formas anaplásicas são descritas.

O grau de diferenciação é também variável, de tumores trabeculares bem diferenciados ou moderadamente diferenciados – os mais comuns – até formas indiferenciadas. O tumor forma metástases precocemente no próprio fígado, nos linfonodos regionais, nos pulmões e nos ossos (GONÇALVES et al., 2006).

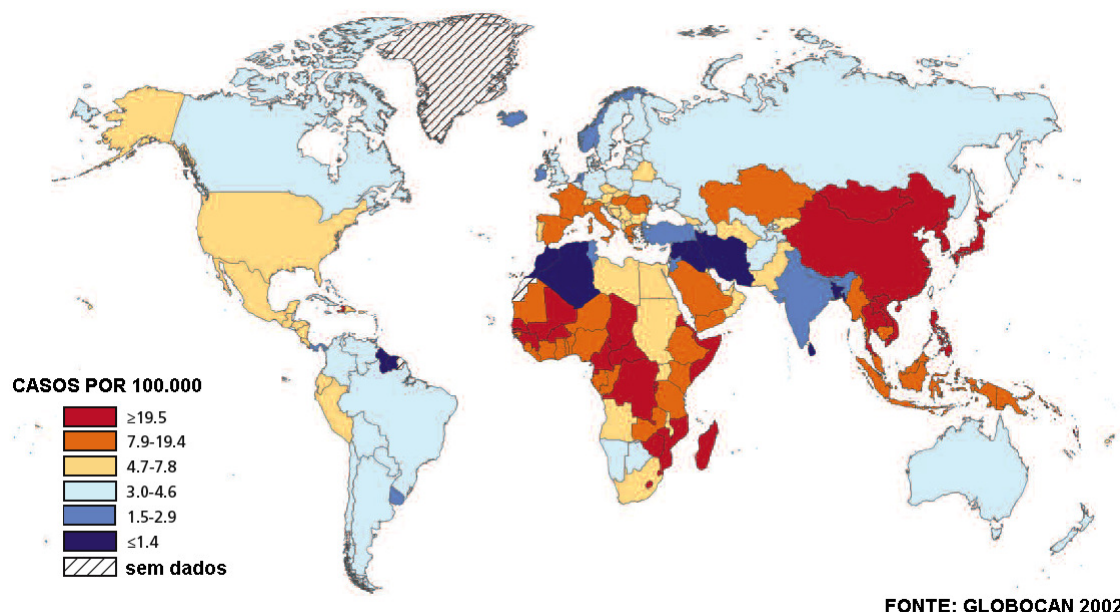


Figura 1 - Variação mundial da incidência (padronizada por idade) do câncer de fígado entre homens por 100.000 habitantes.

Fonte: Garcia (2007).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

O estudo histológico de fígados cirróticos com e sem o CHC possibilitou a caracterização de algumas lesões precursoras do tumor. São nódulos displásicos, considerados em dois grupos: displasia de grandes células e displasia de pequenas células, esta última considerada de maior risco para o desenvolvimento do tumor (GONÇALVES et al., 2006).

Os mecanismos da carcinogênese induzidos pelos diversos agentes etiológicos são comuns e estão relacionados com alterações celulares que comprometem diretamente o genoma e/ou os mecanismos de sua regulação, possibilitando o surgimento de clones de hepatócitos imortalizados e com capacidade de invadir os tecidos e metastatizar em órgãos distantes. Seja monoclonal ou policlonal na origem, o clone que inicia o tumor continua a sofrer alterações genéticas, com propriedades progressivamente mais agressivas na capacidade de invadir e metastatizar (GONÇALVES et al., 2006).

Os eventos moleculares que levam a transformação maligna dos hepatócitos conduzem às mesmas alterações básicas: imortalização, capacidade de sobrevivência assegurada pela angiogênese e capacidade de invadir e infiltrar os tecidos, podendo formar metástases. A imortalização (capacidade indefinida de proliferar) é conseguida principalmente através da ativação de oncogenes, da inativação ou deleção de genes supressores de tumor e de alterações nos genes que regulam a apoptose e nos genes da telomerase (GONÇALVES et al., 2006).

### **2.1.1 Carcinoma hepatocelular no Brasil**

Não existem estudos epidemiológicos adequados sobre o CHC no Brasil. Existem somente publicações sobre relatos de série de casos diagnosticados em alguns estados (PEREIRA et al., 1977). Segundo dados de 1999 sobre mortalidade por câncer no Brasil, do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer primário de fígado e vias biliares ocupava a sétima posição, sendo responsável por 4.682 óbitos naquele ano. No entanto, esse dado não informa a real mortalidade pelo CHC, já que inclui os carcinomas colangiocelulares. Atualmente, o CHC não consta entre os dez cânceres mais incidentes no Brasil, segundo dados obtidos dos registros de base populacional existentes (INCA, acesso em 20 nov. 2008).

Quanto aos fatores etiológicos relacionados ao CHC no Brasil, um inquérito nacional realizado em 1995, mostrou que há tendência de maior participação do vírus da hepatite C nos grandes centros urbanos do Sul e do Sudeste, enquanto que a participação do vírus da hepatite B decresce da região norte para a região sul (GONÇALVES, PEREIRA; GAYOTTO, 1997; GONÇALVES et al., 2006)

Embora não se conheça a sua real incidência no Espírito Santo, o CHC é freqüentemente diagnosticado no Estado - observado em 1,9% das necrópsias realizadas no HUCAM (PEREIRA et al., 1977) -, associado à infecção com os vírus B e C da hepatite (identificados pela presença do antígeno HBsAg e do anti-VHC) e ao alcoolismo crônico, mas cerca de 40% dos casos não apresentam evidências desses fatores etiológicos (PEREIRA; GONÇALVES; BONI, 1981; GONÇALVES et al., 1986, GONÇALVES, PEREIRA; GAYOTTO, 1997). Por essa razão, suspeita-se



que outros fatores, especialmente aflatoxinas, possam estar envolvidos na etiologia do CHC no Espírito Santo.

### **2.1.2 Fatores etiológicos relacionados com o CHC**

Um aspecto comum do CHC em diferentes regiões do mundo é a sua associação com cirrose hepática: 70 a 90% dos casos se desenvolvem em fígado cirrótico. É variável o tempo decorrido entre o desenvolvimento da cirrose e o aparecimento do tumor, variando de 10 a 40 anos, dependendo da etiologia. O risco de desenvolver o CHC no fígado cirrótico é tão grande que se admite ser a cirrose hepática uma lesão pré-cancerosa (SHERMAN et al., 2005; LAURENT-PUIG; ZUCMAN-ROSSI, 2006; GONÇALVES et al., 2006; HUSSAIN et al., 2007; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007).

Os fatores etiológicos mais conhecidos do CHC – vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, etanol e aflatoxinas – têm prevalência geográfica variável, o que contribui, em grande parte, para a variação geográfica na incidência do tumor (SHERMAN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2006; FARAZI; DePINHO, 2006; HUSSAIN et al., 2007; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007).

Outros fatores etiológicos são menos freqüentes: hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, uso de anabolizantes hormonais e doenças metabólicas diversas que comprometem o fígado, incluindo a síndrome metabólica com ou sem diabetes do tipo 2 (GONÇALVES et al., 2006).

Dentre os fatores etiológicos associados ao CHC citados acima, daremos maior enfoque às aflatoxinas e ao vírus da hepatite B (tópicos 2.4, 2.5 e 2.6), por estarem relacionadas à mutação de interesse na presente investigação.

## **2.2 GENE *TP53***

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13.1, é um gene supressor de tumor que possui 11 éxons e codifica a proteína p53. Esta proteína apresenta 393

aminoácidos com domínios funcionais, domínios conservados e regiões consideradas 'hotspots' de mutações (Figura 2) (LEVINE, 1997; PETITJEAN et al., 2007).



Figura 2 - Representação da proteína p53. As regiões conservadas estão representadas em rosa e incluem as seqüências de aminoácidos de 17-29, 97-292 e 324-352. As regiões funcionais incluem a região de transativação (retângulo amarelo), região de ligação da proteína com o DNA (aminoácidos 100-293), a seqüência de localização nuclear (aminoácidos 316-325, retângulo verde escuro) e a região de oligomerização (aminoácidos 319-360, retângulo verde claro). Sete sítios 'hotspots' de mutações foram identificados dentro do maior domínio conservado (retângulos azuis). N=extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica. C= extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica.

Fonte: Hussain (2007).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

A proteína p53 é constitutivamente expressa nas células e, na sua forma nativa, apresenta meia vida curta de 20-30 minutos. Após sua síntese, desloca-se para o núcleo, onde é inibida pela ligação com a proteína mdm2 que facilita o retorno da p53 ao citoplasma, sua ubiquitinação e posterior degradação nos proteassomos. (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2004).

A proteína p53 regula o ciclo celular, interfere na apoptose e atua no reparo do DNA (LEVINE et al., 1997; OLIVIER et al., 2009). A ação reguladora da p53 sobre o ciclo celular se manifesta em resposta a danos ao DNA. Em resposta a uma lesão no DNA, a p53 é fosforilada, desligando-se da proteína mdm2, torna-se mais estável, permanece no núcleo e ativa vários genes que levam a parada do ciclo celular ou a apoptose. A parada do ciclo celular na fase G1 se faz pela ativação da transcrição da proteína p21, inibidora do complexo ciclina/CDK. A interrupção do ciclo celular possibilita que os sistemas de reparo do DNA corrijam as alterações genéticas, impedindo que elas se propaguem pelas futuras gerações celulares.

Dependendo da intensidade da lesão, a p53 induz apoptose pela ativação de genes pró-apoptóticos, como o gene *BAX*, ou por ação direta sobre as mitocôndrias. Se ocorrer o reparo da lesão do DNA, a p53 regula negativamente sua própria função.

Para isso, ela ativa a transcrição do gene *MDM2*, cujo produto inibe a ação da p53, permitindo o retorno do ciclo celular e passagem da fase G1 para a fase S (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2004).

### 2.3 MUTAÇÃO NO GENE *TP53*

Mutações no gene *TP53* estão entre as lesões genéticas mais comuns nos cânceres humanos, presentes em mais de 50% de todos os casos da doença. A distribuição das mutações ao longo dos 11 éxons do *TP53* não ocorre de maneira randômica, existindo os chamados sítios 'hotspots', regiões de maior predileção para ocorrência de mutações (Figura 3).

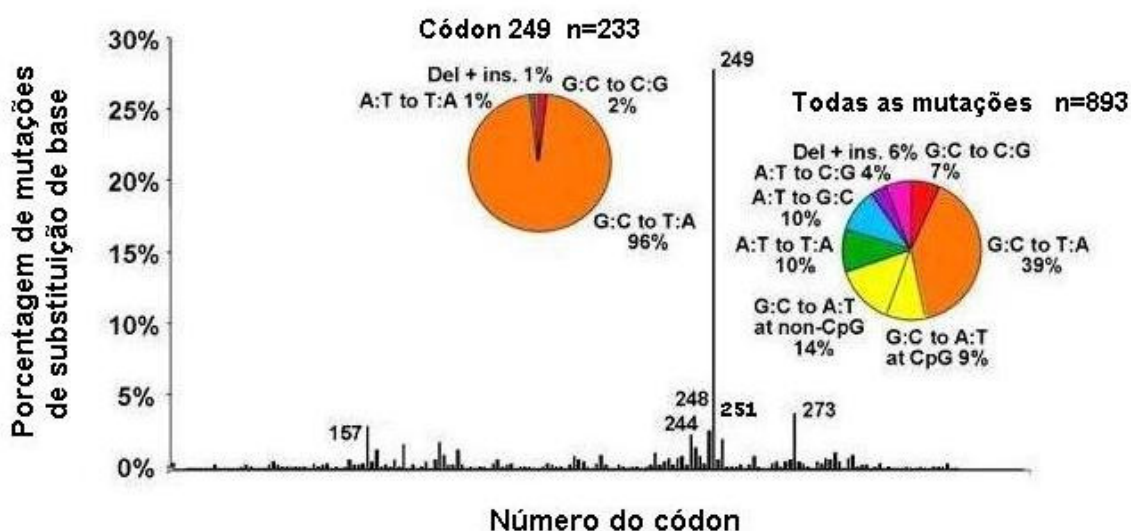


Figura 3 - Mutações no gene *TP53*. Nas linhas verticais da figura estão representadas as principais mutações pontuais do tipo substituição de base. A grande maioria destas mutações encontra-se na região conservada da proteína, a qual é requerida para a ligação sequência-específica com o DNA. Os outros tipos de mutação: mutações sem sentido, mudanças do quadro de leitura e mutações silenciosas estão distribuídas ao longo do gene, enquanto as deleções e inserções são mais comuns nas seqüências N- e C- terminais do *TP53*. O gráfico de pizza da esquerda mostra o padrão mutacional específico para o códon 249 e o gráfico da direita inclui todas as mutações no gene *TP53* em pacientes com CHC. Em ambos os casos, n = número de casos investigados no estudo original.

Fonte: Hussain (2007).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

Uma mutação no gene *TP53* apresenta certa particularidade no CHC: é a mutação conhecida como "ser-249 *TP53*" no éxon 7 desse gene, que tem a peculiaridade de ser mais prevalente em algumas regiões, especialmente tropicais e subtropicais

(Figura 4). Esta mutação é uma transversão de uma base G para uma base T (G:C→T:A), responsável pela alteração no códon 249 do gene *TP53* (AGG para AGT), resultando em uma substituição de aminoácidos: uma arginina por uma serina (HSU et al., 1991; MONTESANO; HAINAUT; WILD, 1997; FARAZI; DePINHO, 2006; LAURENT-PUIG; ZUCMAN-ROSSI, 2006; HUSSAIN et al., 2007).

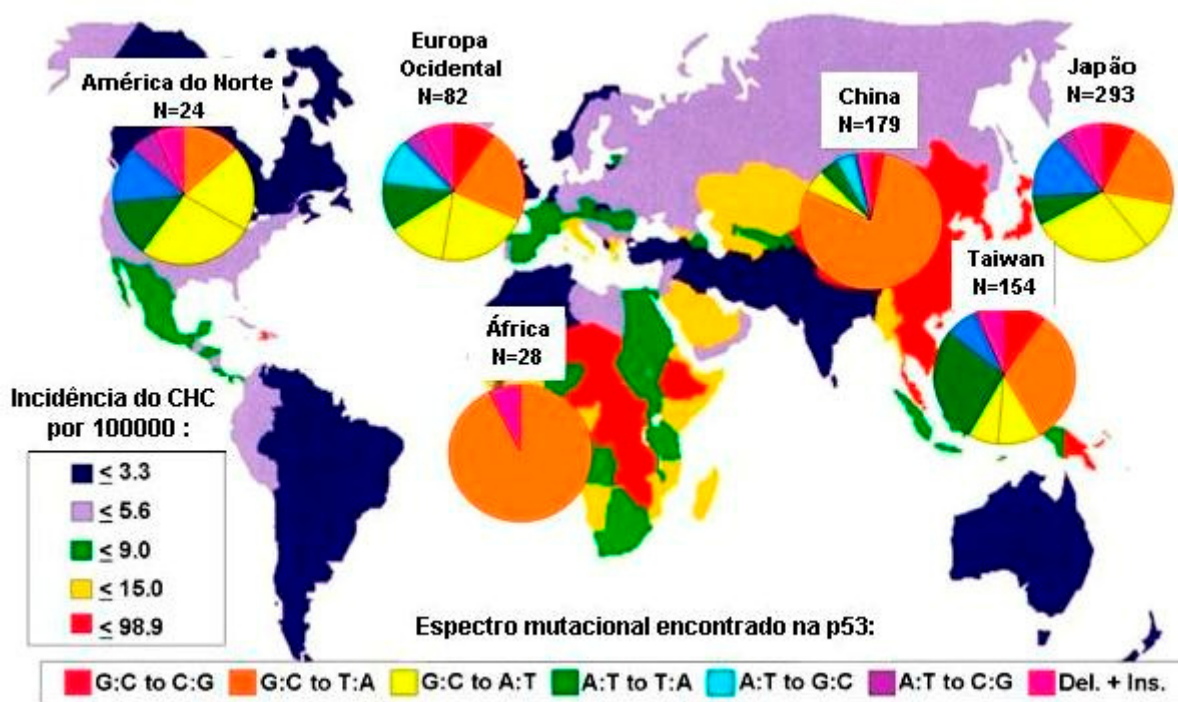


Figura 4 - Incidência mundial do CHC e o padrão de mutação encontrado no gene *TP53*, evidenciado nos gráficos de pizza. Uma alta incidência de mutações G:C→T:A é encontrada em regiões com alta incidência tanto da infecção pelo vírus da hepatite B quanto da exposição alimentar às aflatoxinas.

Fonte: Hussain (2007).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

Hsu e colaboradores (1991) e Bressac e colaboradores (1991) demonstraram que a mutação ser-249 *TP53* nos pacientes com CHC é especificamente associada à exposição às aflatoxinas. Estudos em bactérias, cultura de células e em animais suportam esta associação (STAIB et al., 2003). Além disso, a mutação foi investigada através da análise de tecidos não-neoplásicos de pacientes com CHC dos EUA, Tailândia e região de Qidong (China), onde a exposição às aflatoxinas é baixa, moderada e alta, respectivamente, e observou-se que a frequência da mutação ser-249 foi proporcional ao nível estimado de exposição a estas micotoxinas (AGUILAR; HUSSAIN e CERUTTI, 1993).

Os estudos da mutação ser-249 *TP53* revelaram que a sua freqüência varia significativamente de acordo com a região geográfica. De fato, a análise de publicações sobre a ocorrência dessa mutação em CHC de diferentes regiões do mundo mostra ampla variação, especialmente em relação à presença de aflatoxinas contaminando alimentos (MONTESANO; HAINAUT; WILD, 1997; LASKY; MAGDER, 1997; STERN et al., 2001). Em regiões onde a contaminação é alta, como Qidong e Tongan (China), Gâmbia e Senegal, a mutação é encontrada com freqüência nos casos de CHC (SCORSONE et al., 1992; COURSAGET et al., 1993; YANG et al., 1997; KIRK et al., 2005), enquanto em regiões onde a exposição é baixa, como Europa, Japão e EUA, um baixo número ou mesmo a ausência de mutações é observada (ODA et al., 1992; KAZACHKOV et al., 1996; KIRK et al., 2000).

De modo geral, os autores admitem que esta mutação é exclusiva dos casos de CHC relacionados com aflatoxinas, visto que tumores associados a outros fatores etiológicos não a apresentam (HSU et al., 1991; BRESSAC et al., 1991; DENISSENKO et al., 1998; SOHN et al., 2000).

As mutações neste códon foram também detectadas no DNA presente no plasma/soro de pacientes com CHC em diferentes regiões, especialmente na África e no Sudeste Asiático (JACKSON et al., 2001; JACKSON et al., 2003; HUANG et al., 2003; KIRK et al., 2005; KIMBI et al., 2005; HOSNY et al., 2008).

O aminoácido especificado pelo códon 249 do gene *TP53* é uma arginina, que tem um papel estrutural essencial na formação de uma das dobras do domínio de ligação da p53 com o DNA. Este aminoácido não tem contato direto com as bases do DNA, mas pertence a mais crítica das fendas (*loop 3* ou L3) e, além disso, é adjacente à arginina do códon 248 que tem contato direto com o DNA na porção do menor encaixe entre a molécula de DNA e a proteína p53. A arginina do códon 249 tem contato com outros quatro resíduos de aminoácidos distribuídos pela estrutura secundária da proteína. Análises da estrutura terciária da p53 indicam que estes contatos contribuem para a estabilização da fenda L3 e para a sua correta orientação em relação à superfície de ligação ao DNA (CHO et al., 1994). Se a mutação no códon 249 prejudica as funções da proteína p53, ela confere às células vantagem seletiva de crescimento celular (SMELA et al., 2001).

## 2.4 AFLATOXINAS

As aflatoxinas representam um grupo diverso de substâncias tóxicas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, que podem ser encontradas em alimentos derivados de vegetais – como amendoim, cereais (trigo) e grãos (milho, arroz) – e também em derivados de animais alimentados com rações contaminadas. Entre as várias micotoxinas, as aflatoxinas são as mais estudadas devido ao seu comprovado potencial tóxico e hepatocarcinogênico (PITT, 2000).

O estudo das aflatoxinas iniciou por volta da década de 60, quando aves de todo o mundo estavam apresentando hepatopatias atribuídas à contaminação alimentar com *Aspergillus* (BEDARD; MASSEY, 2006). Elas foram isoladas em 1961, a partir de produtos contendo amendoim, durante a investigação epidemiológica de uma epizootia chamada de “doença X dos perus” na Inglaterra, que matou mais de 100 mil perus e outros 20 mil patos, faisões e perdizes. Os testes revelaram que o agente causador da doença X dos perus era uma toxina presente na ração à base de farinha de amendoim e que estas toxinas eram metabólitos produzidos pelo fungo *Aspergillus flavus* (SARGEANT et al., 1961; NEWBERNE; BUTLER, 1969).

Ainda na década de 60, Newberne e Butler (1969) e Wogan (1968) relataram que amostras alimentícias coletadas a partir de várias partes do mundo apresentam altas taxas de contaminação com aflatoxinas.

A palavra aflatoxina – *Aspergillus flavus toxina* – é utilizada para indicar os metabólitos tóxicos do *Aspergillus*, incluídos em quatro frações principais: aflatoxina B1, B2, G1 e G2, das quais apenas as formas B1 e G1 têm atividade carcinogênica. As letras B e G se referem às cores fluorescentes (*Blue* e *Green*, respectivamente) produzidas por estes compostos quando submetidos à luz UV. Os números 1 e 2 indicam o maior e menor peso molecular do composto (PITT, 2000). Um metabólito hidroxilado da aflatoxina B1, denominado aflatoxina M1, também é carcinogênico e pode ser encontrado no leite de vacas que consomem alimentos contaminados (SASSAHARA; PONTES NETTO; YANAKA, 2005).

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais prevalente e carcinogênica dentre as aflatoxinas, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo I dos carcinógenos, que engloba os agentes carcinogênicos para os humanos (IARC, 2002).

### **Metabolismo das aflatoxinas e formação do aduto AFB1- DNA**

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e metabolizadas primariamente no fígado, por enzimas pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450 (CYP), que constituem parte do sistema de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (SMELA et al., 2001; BEDARD; MASSEY, 2006).

A AFB1 é, na realidade, um pró-carcinógeno, que requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos carcinogênicos. A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como exo- 8,9- epóxido da aflatoxina ou AFB1-epóxido. Este composto é capaz de reagir rapidamente e formar ligações covalentes com macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. Estas ligações determinam a formação de adutos<sup>1</sup>, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (BAILEY et al., 1996; SMELA et al., 2001; BEDARD; MASSEY, 2006). A Figura 5 mostra os processos de metabolização da AFB1 com posterior formação dos adutos.

A AFB1-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathiona reduzida, através de glutathiona-S-transferases, e posteriormente eliminada na urina (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

---

<sup>1</sup> A palavra aduto se origina da contração das palavras **adição** e **produto** (no espanhol, *aducto* = *adición* e *producto* e no inglês, *aduct* = *addition* e *product*) e se refere a uma entidade química que se forma a partir da união de moléculas mediante ligações covalentes (MONCADA, 2002).

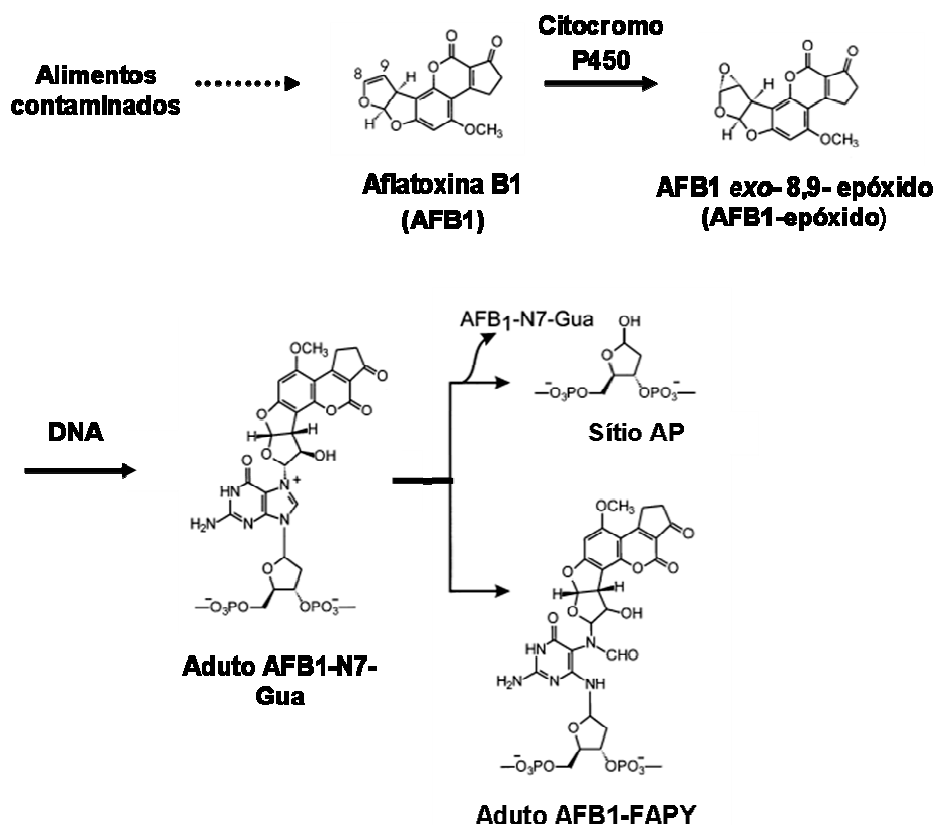


Figura 5 - Via de ativação metabólica da AFB1, levando à formação dos adutos com o DNA. Fonte: Smela (2001).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1. A formação de adutos ocorre preferencialmente através da ligação com as bases guaninas da molécula de DNA, mais precisamente na posição N<sub>7</sub> da guanina (CROY; WOGAN, 1981). Assim, entre os vários adutos que podem ser formados, o mais abundante tanto *in vitro* quanto *in vivo* é o aduto 8,9-dihidro-8-(N<sub>7</sub>-guanyl)-9-hidroxi aflatoxina B1 ou AFB1-N<sub>7</sub>-Gua (SMELA et al., 2001).

Experimentos com ratos demonstraram que os adutos AFB1-N<sub>7</sub>-Gua podem ser retirados após a sua formação (depurinação), deixando sítios apurínicos (sítios AP) na molécula de DNA. Estes sítios representam a principal estrutura química responsável pelo efeito genotóxico da AFB1 (BAILEY et al., 1996; OLIVEIRA; GERMANO, 1997; SMELA et al., 2001; BEDARD; MASSEY, 2006).



Em bactérias, os sítios vagos (AP) tendem a ser preenchidos com a base adenina pelo sistema de reparo SOS, o que gera uma transversão de guanina para timina nesses sítios (LAWRENCE et al., 1990; BEDARD; MASSEY, 2006).

Embora alguns estudos com células de mamíferos mostrem diferenças na preferência pela base inserida no sítio AP (BEDARD; MASSEY, 2006), nos sistemas biológicos avaliados em diversos estudos, incluindo muitos estudos em células de mamíferos, a mutação induzida pela AFB1 mais freqüentemente observada também é a transversão de uma guanina para uma timina (G:C→T:A) (CROY; WOGAN, 1981; SMELA et al., 2001; BEDARD; MASSEY, 2006).

Uma outra alteração observada nas análises de DNA é o aduto AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY), resultante da abertura do anel imidazólico presente no aduto AFB1-N<sub>7</sub>-Gua (CROY; WOGAN, 1981; BAILEY et al., 1996).

É provável que o aduto inicial AFB1-N<sub>7</sub>-Gua, o sítio AP e o aduto AFB1-FAPY, individualmente ou coletivamente, representem os precursores dos efeitos causados pela AFB1. Outras lesões ao DNA são também formadas, mas em menor proporção (SMELA et al., 2001).

A suposição para a hepatocarcinogênese mediada pela AFB1 é de que os adutos ou danos secundários ao DNA derivados deles gerem alterações genéticas herdáveis que modifiquem as vias de regulação e induzam à transformação maligna dos hepatócitos (SMELA et al., 2001).

#### **2.4.2 Reatividade da AFB1 com as seqüências de DNA**

A reatividade da AFB1 com o gene *TP53* não parece ser randômica, admitindo-se uma predileção por sítios ricos em guaninas (GG), especialmente, mas não exclusivamente, no códon 249 do éxon 7 do *TP53*. Como será descrito a seguir, outros códons podem ser comprometidos.

Denissenko e colaboradores (1999) descreveram duas técnicas para detectar os adutos no DNA induzidos pela AFB1 dentro do gene *TP53* de hepatócitos humanos expostos ao epóxido sintético da aflatoxina. Eles quantificaram e mapearam os adutos formados no éxon 7 deste gene e observaram adutos apenas nos resíduos de guanina. Na maioria dos casos, os adutos foram detectados preferencialmente nas seqüências de dinucleotídeos GG, sendo a segunda guanina o sítio de maior ligação da AFB1. Geralmente, as seqüências contendo os dinucleotídeos CG também são um alvo significativo para a ligação da AFB1. Encontraram também que nas seqüências senso os danos mais significativos foram observados no códon 249 (terceira base da seqüência AGG). Já nas seqüências anti-senso, os sítios de maior ligação da AFB1 foram os códons 250, 248, 247, 244 e em menor proporção os códons 253 e 245.

Benasutti e colaboradores (1988) mostraram que a reatividade da AFB1 com resíduos de guanina é altamente dependente das bases 5' e 3' imediatamente adjacentes à guanina central, sendo as seqüências de três guaninas a mais favorável de todas. Na posição 5', a reatividade segue a ordem: G (1,0) > C (0,8) > A (0,4) > T (0,3), e para a posição 3' tem-se a seguinte ordem de reatividade: G (1,0) > T (0,8) > C (0,3) > A (0,2). Os valores entre parênteses representam um valor numérico da reatividade relativa e o valor de 3' pode ser multiplicado pelo valor de 5' para originar um valor que pode ser usado para comparar as reatividades das seqüências que flanqueiam uma guanina central. Esses valores denotam a reatividade relativa (RR) da seqüência (BENASUTTI et al., 1988). A especificidade da seqüência para o grau de reatividade com AFB1 é dividida em três classes: fraca (RR ~ 0,23), intermediária (RR ~ 0,44) e forte (RR ~ 0,5) (SMELA et al., 2001).

A guanina da terceira posição do códon 249 do éxon 7 do *TP53* (AGGC) possui uma reatividade relativa de 0,3, o que lhe coloca entre a classe de reatividade fraca e intermediária. Já a segunda posição do códon 249 (AGGC) possui uma reatividade relativa de 0,4, sendo mais reativa à AFB1 do que a terceira base, segundo Benassutti e colaboradores (1988). No entanto, a grande maioria dos estudos observa que a terceira base do códon 249 é o alvo preferencial da formação do aduto AFB1-DNA (AGUILAR; HUSSAIN e CERUTTI, 1993; MONTESANO;

HAINAUT; WILD, 1997; STERN et al., 2001; LAURENT-PUIG; ZUCMAN-ROSSI, 2006; HUSSAIN et al., 2007)

Dycaico e colaboradores (1996) realizaram estudos *in vivo* com o gene *Lacl* de ratos e camundongos transgênicos para examinar as seqüências adjacentes às guaninas que sofreram mutação após a administração de AFB1. A finalidade do estudo era determinar se as mutações observadas são dependentes do contexto da seqüência de bases onde a guanina está inserida. Assim como encontrado por Benasutti e colaboradores (1988), eles observaram que a presença de guaninas e citosinas do lado 5' e a presença de guaninas e timinas do lado 3' [5'-(G/C)G(G/T)-3'] é o padrão que exerce a maior influência sobre a reatividade entre a base guanina e a AFB1. Estes dados estão de acordo com Misra, Muench e Humayun (1983) e Bailey e colaboradores (1996) que observaram em seus experimentos que as guaninas flanqueadas por A:T foram seqüências-alvo fracas para a indução de lesões pela AFB1.

Nota-se que as regras empíricas de Benasutti e colaboradores (1988), principalmente a da preferência de ligação da AFB1 com regiões ricas em GG, são corroboradas por vários trabalhos (SMELA et al., 2001).

Outros fatores, como a estrutura secundária do DNA, podem estar envolvidos com as modificações causadas pela AFB1 ao DNA. As diferentes seqüências nucleotídicas levam às diferentes estruturas secundárias que podem ser mais ou menos acessíveis a maquinaria de reparo do DNA. Este fator pode explicar os casos onde a reação entre a seqüência de DNA e a AFB1 ocorre em regiões de reatividade fraca ou intermediária ou não ocorre naquelas regiões de reatividade forte (SMELA et al., 2001).

O mecanismo para a formação diferencial de adutos DNA-AFB1 em resíduos de guanina específicos requer ainda maiores investigações para o seu esclarecimento.

### **2.4.3 Efeitos carcinogênicos das aflatoxinas em diferentes espécies**

Há grande diferença de resposta às aflatoxinas em diferentes modelos experimentais. A hepatocarcinogenicidade é bem demonstrada em várias espécies como peixes (trutas, peixe japonês), aves, roedores (furão, rato) e primatas não-humanos (MONTESANO; HAINAUT; WILD, 1997). Camundongos são altamente resistentes à ação hepatocarcinogênica da AFB1 (MONROE; EATON, 1988). Doses alimentares de até 10000 ppb falharam em desenvolver câncer de fígado nestes animais. No entanto, em ratos, doses menores que 15 ppb já foram suficientes para aumentar o aparecimento de tumores no fígado (WOGAN; PAGLIALUNGA; NEWBERNE, 1974).

Nos experimentos realizados por Adamson e colaboradores (1976) com macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*), 7% (3/42) desenvolveram neoplasia primária do fígado após dois anos de ingestão de aflatoxinas.

As diferenças de resposta às aflatoxinas parecem estar relacionadas às diferenças de expressão da molécula citocromo P-450 e de uma isoforma de glutathione S-transferase (mGSTA3-3) que desempenha atividade catalítica sobre o epóxido carcinogênico da aflatoxina. Estudos na expressão destas moléculas mostram diferenças que podem explicar a susceptibilidade de humanos e outros animais aos efeitos carcinogênicos da AFB1 (EATON; GALLAGHER, 1994).

No citosol de hepatócitos de camundongos, encontrou-se uma atividade da glutathione S-transferase 52 vezes maior sobre o epóxido da aflatoxina, comparada com a atividade desta mesma enzima em hepatócitos de ratos. Experimentos induzindo a depleção da glutathione presente no fígado de camundongos mostraram um aumento de 30 vezes na ligação covalente da AFB1 com o DNA. Esses resultados sustentam a hipótese de que a glutathione S-transferase é o principal determinante nas diferenças de susceptibilidade à AFB1 entre as diferentes espécies (MONROE; EATON, 1988).

Células humanas imortalizadas pelo SV40 expressando diferentes tipos de citocromo P-450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 ou CYP3A4), originaram diferentes padrões de mutação após exposição a AFB1. O balanço entre estas enzimas nos

diferentes organismos, pode ser um outro fator que explica as diferentes respostas a essa micotoxina (HARRIS et al., 1998).

#### **2.4.4 Evidências da associação de aflatoxinas com o carcinoma hepatocelular**

Observações epidemiológicas indicam o efeito carcinogênico das aflatoxinas em humanos. Correlação entre exposição às aflatoxinas e incidência do CHC tem sido demonstrada na África e em algumas regiões da Ásia (STERN et al., 2001; FARAZI; DePINHO, 2006; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007; HUSSAIN et al., 2007).

Admite-se que o efeito carcinogênico da AFB1 na espécie humana esteja relacionado com a indução da mutação ser-249 *TP53* (detalhada no tópico 2.3). O Quadro 1 apresenta as evidências que corroboram para a associação entre a mutação ser-249 *TP53* e a exposição alimentar à AFB1.

Além das evidências epidemiológicas, mostrando relação entre alimentos contaminados com aflatoxina e CHC, a dosagem da toxina ou seus metabólitos também corrobora para essa associação. De fato, aflatoxinas ou seus adutos têm sido demonstrados no soro e em fragmentos hepáticos de pacientes com CHC (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; STERN et al., 2001). Do mesmo modo, adutos de AFB1 com albumina têm sido detectados em crianças e adultos de diferentes países com alta incidência do tumor (Kênia, Senegal, Gâmbia e Uganda) em frequências que variam de 12 a 100%, enquanto que em países com baixa incidência do CHC (Polônia e França), a pesquisa desses adutos no plasma foi negativa (WILD et al., 1990).

<b>PODER DA ASSOCIAÇÃO</b>
<p><b>Consistência</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Correlação dose-resposta positiva entre a exposição alimentar estimada de AFB1 e a frequência da mutação ser-249 em três diferentes etnias de três continentes.</li> <li>- A mutação ser-249 é detectada no soro de indivíduos expostos a AFB1 e infectados com o VHB.</li> <li>- A mutação ser-249 é encontrada em pacientes com CHC expostos a AFB1 e infectados com o VHB, mas não nos pacientes apenas infectados com o VHB.</li> </ul> <p><b>Especificidade</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A mutação ser-249 é incomum em outros tipos de tumores.</li> <li>- A mutação ser-249 detectada em soro/plasma é um marcador de risco para CHC.</li> </ul> <p><b>Temporalidade</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Células com a mutação ser-249 podem ser observadas em fígados não tumorais nas áreas de alta incidência de CHC.</li> </ul>
<b>EVIDÊNCIAS BIOLÓGICAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- AFB1 é um potente agente mutagênico e carcinogênico em estudos laboratoriais.</li> <li>- AFB1 é enzimaticamente ativada pelos hepatócitos humanos e o seu epóxido se liga a terceira base do códon 249.</li> <li>- Exposição <i>in vitro</i> de células hepáticas humanas à AFB1 produz a mutação ser-249.</li> <li>- A proteína viral HBx aumenta a frequência da mutação ser-249 em células expostas a AFB1 <i>in vitro</i>.</li> <li>- A mutação ser-249 inibe a apoptose e a transcrição mediada pela p53, aumentando o crescimento celular dos hepatócitos <i>in vitro</i>.</li> </ul>

Quadro 1 – Evidências que dão suporte à hipótese de que a exposição alimentar à AFB1 pode causar a mutação ser-249 *TP53* durante a hepatocarcinogênese humana. VHB = vírus da hepatite B.

Fonte: Staib (2003).

Nota: Quadro adaptado pelo autor.

#### **2.4.5 Aflatoxinas no Brasil**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o controle sistemático dos níveis de aflatoxinas nos alimentos, principalmente em países de áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis à proliferação do *Aspergillus flavus*.

No Brasil, foi estabelecido em 1976 o limite de 30 µg/kg para as somas das frações da aflatoxina B1 e G1 em qualquer tipo de alimento (Resolução CNNPA nº 34/1976) (BRASIL, 1976). A partir do ano de 2002, os limites máximos admissíveis desta

substância passaram a ser estabelecidos pela resolução RDC n° 274/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas estabelecidos pela resolução 274/2002 da ANVISA

Alimento	Aflatoxina	Limite
Leite fluído ou leite em pó	M1	0,5 µg/L ou 5,0 µg/kg
Milho (em grão ou farinha)	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg
Amendoim ou pastas de amendoim	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg

Vários estudos sobre a contaminação de produtos alimentícios para consumo humano ou animal têm mostrado a ocorrência freqüente de aflatoxinas e em níveis acima dos recomendados (Tabela 2). No entanto, não existem no país estudos epidemiológicos indicando o grau de exposição da população às aflatoxinas, bem como a relação dessa exposição com a incidência do CHC (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Tabela 2 - Informações obtidas de trabalhos que investigaram a presença de aflatoxinas ou do fungo *Aspergillus* em amostras alimentícias provenientes de diferentes regiões do Brasil

(continua)

Local	Amostra	Deteção	Referência
Brasil e Índia	366 amostras de amendoim e derivados	AFB1: média de 71 µg/kg (2 - 750 µg/kg).	STRZELECKI; CADER-STRZELECKA, 1988
Ceará	Castanha de cajú	<i>A. flavus</i> : 25,5%. Aflatoxinas não detectadas.	FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 1999
Distrito Federal	101 amostras comerciais à base de milho	Aflatoxinas não detectadas.	CALDAS et al, 2007 *
Minas Gerais	100 amostras de ração de animais domésticos	AFB1, B2, G1 ou G2: 15 - 374 µg/kg em 12% das amostras.	MAIA et al, 2002 #
Pará	Pimenta	<i>A. flavus</i> : 43,8% das amostras.	FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000
Paraná	42 amostras de leite	AFM1: 24% (7% > 0,5 µg/L).	SASSAHARA; PONTES NETTO; YANAKA, 2005 #
Regiões do Brasil	214 amostras de milho	AFB1, B2, G1 ou G2: 38,3%. AFB1: 0.2 - 129 µg/kg.	VARGAS et al, 2001 #
Regiões do Brasil	328 amostras de milho	AFB1: 10 - 900 µg/kg em 12,3% das amostras.	SABINO et al, 1989 **
Rio de Janeiro	840 amostras de: (1) Grãos e farinha de milho, (2) ração animal	<i>A. flavus</i> : 75% das amostras (1) e 57% das amostras (2). AFB1: 0,1 - 24,5 µg/kg em 70% das amostras.	CAMPOS et al, 2008

Tabela 2 - Informações obtidas de trabalhos que investigaram a presença de aflatoxinas ou do fungo *Aspergillus* em amostras alimentícias provenientes de diferentes regiões do Brasil (conclusão)

Local	Amostra	Deteção	Referência
Rio de Janeiro	480 amostras de ração de galinha	<i>A. flavus</i> : 25%. AFB1: 1.2 - 17.5 µg/kg em 66,7% das amostras.	OLIVEIRA; ROSMANINHO; ROSIM, 2006
Rio Grande do Sul	36 amostras de milho	AFB1, B2, G1 ou G2: 30,5%. AFB1 + G1: 12 - 906 µg/kg.	HENNIGEN; DICK, 1995 #
Santa Catarina	72 amostras de feijão	<i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> : 35,6%.	COSTA; SCUSSEL, 2002
São Paulo	Amendoim (grão e planta)	<i>A. flavus</i> : 17%. AFB1, B2, G1 ou G2: 32%. AFB1: 3,79 - 125,07 µg/kg.	GONÇALEZ et al, 2008
São Paulo	48 amostras de leite UHT	AFM1: 0,011 - 0,251 µg/L em 77,1% das amostras.	OLIVEIRA, G.R., et al, 2006 #
São Paulo	57 amostras de milho	<i>A. flavus</i> : 1% e 5%. Aflatoxinas não detectadas.	ALMEIDA et al, 2002 *
São Paulo	80 amostras de amendoim e derivados (paçoca)	AFB1, B2, G1 ou G2: 51%. AFB1 + B2 + G1 + G2: 43 - 1099 µg/kg.	FREITAS; BRIGIDO, 1998 **

\* A metodologia utilizada para deteção de aflatoxinas foi TLC (*Thin Layer Chromatography*) enquanto nos demais estudos a metodologia utilizada foi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

# Dados obtidos a partir do resumo do trabalho.

## 2.5 VÍRUS DA HEPATITE B

O vírus da hepatite B (VHB) é um membro da família *Hepadnaviridae* (*hepatotropic DNA virus*), que apresenta tropismo pelas células hepáticas e possui um DNA dupla fita circular parcial (fita negativa completa e fita positiva incompleta). O seu genoma possui 3,2 kb com quatro matrizes de leitura aberta (no inglês, ORF) para transcrição dos seus genes que possuem áreas superpostas (Figura 6). A região preS-S (*presurface-surface*) codifica três proteínas virais de superfície (antígenos de superfície, conhecidos como HBsAg ou AgHBs): preS1 (ou L de *Large protein*), preS2 (ou M de *Middle protein*) e a proteína S (S de *Small protein*). O gene pol codifica uma DNA polimerase que também tem ação de transcriptase reversa. A região preC-C (*precore-core*) transcreve a proteína do core ou capsídeo (proteína c ou antígeno HBc, HBcAg) e a proteína e (antígeno HBe, HBeAg). O gene X codifica



a proteína X, que entre outras, tem função transativadora (GANEM; PRINCE, 2004; ANZOLA, 2004; BLOCK; GUO H; GUO JT, 2007).

Até o momento, oito genótipos diferentes do VHB foram identificados (genótipos A a H), possuindo distribuição geográfica característica: o genótipo A é prevalente na América do Norte, Europa, África do Sul e Índia; os genótipos B e C são prevalentes na Ásia; o genótipo D é prevalente na Europa, Índia e África do Sul; o genótipo E é prevalente no oeste da África; o genótipo F é prevalente na América do Sul e Central e Alaska; o genótipo G é prevalente na Europa, México e EUA e o genótipo H foi relatado recentemente na América Central, EUA e Japão (WELZEL et al, 2006).

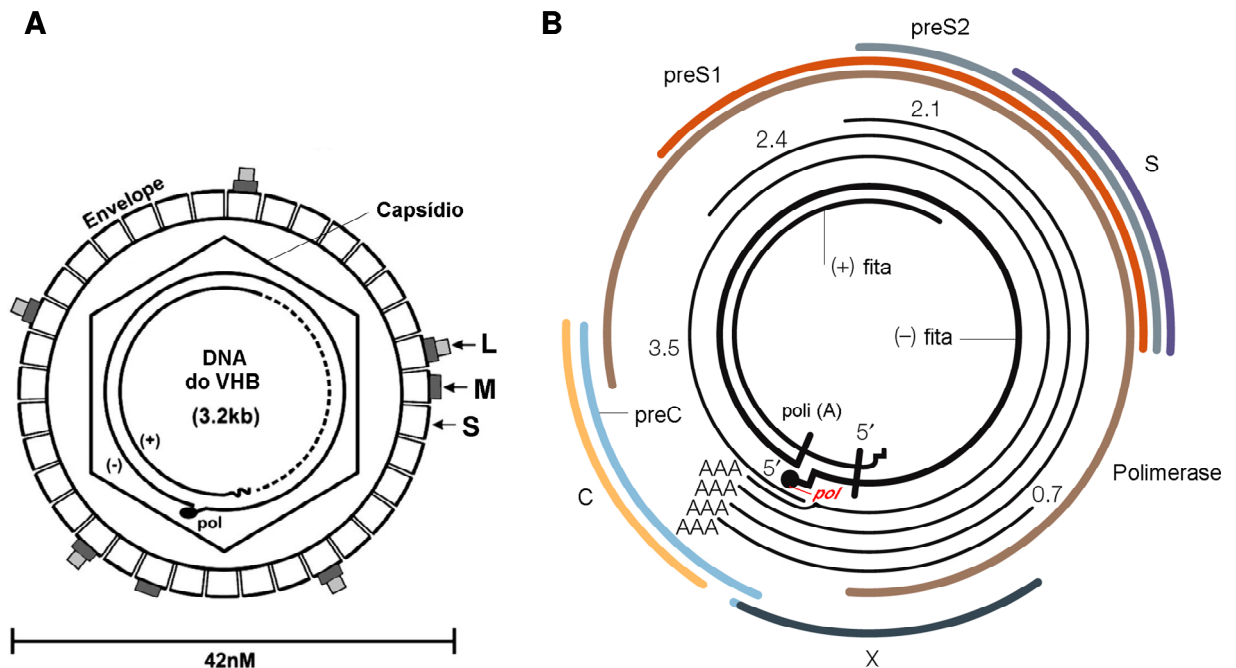


Figura 6 - Partícula viral e estrutura genômica do VHB. (A) Ilustração da partícula viral mostrando as proteínas de superfície S, M e L. Genoma viral circundado por capsídeo com a enzima polimerase (pol) covalentemente ligada à fita negativa. (B) Estrutura genômica viral mostrando o genoma dupla fita e a porção simples fita do genoma (rcDNA ou *relaxed circular DNA*). As barras coloridas evidenciam os genes virais. As barras pretas entre os genes e o genoma representam as quatro seqüências transcritas do genoma viral.

Fonte: Rehermann; Nascimbeni (2005) e Block; Guo, H.; Guo, J.T. (2007).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

### 2.5.1 Epidemiologia do vírus da hepatite B

O VHB tem larga distribuição geográfica, admitindo-se que cerca de dois bilhões de pessoas tenham tido contato com o vírus e mais de 350 milhões apresentem infecção persistente (MICHIELSEN; FRANQUE; VAN DONGEN, 2005; FARAZI; DePINHO, 2006). A Tabela 3 mostra as variações na prevalência da infecção persistente pelo VHB em diferentes regiões do mundo.

Tabela 3 - Padrão global da infecção crônica persistente pelo vírus da hepatite B

	<b>Alta</b>	<b>Intermediária</b>	<b>Baixa</b>
Prevalência	≥ 8%	2% - 7%	< 2%
Distribuição geográfica	Sudeste asiático, China, Melanésia, África sub-Saariana, Alaska, Peru, norte do Brasil	Bacia do Mediterrâneo, leste Europeu, Ásia central, Japão, bacia Amazônica.	Estados Unidos, Canadá, norte e oeste Europeu, Austrália, Nova Zelândia.
Idade predominante na época da infecção	Perinatal e infância	Todos os grupos	Adultos
Modo de infecção predominante	Materno-fetal, percutânea	Percutânea, sexual	Percutânea, sexual

Fonte: Garcia (2007).

Nota: Dados adaptados pelo autor.

No Brasil, a prevalência da infecção deste vírus é variável, apresentando diferenças regionais, com prevalência alta ou intermediária na região Amazônica, no Espírito Santo e oeste de Santa Catarina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, apud FIGUEIREDO et al., 2008). Estudos populacionais sobre a incidência da infecção com o VHB são raros no Brasil e as melhores informações são oriundas dos exames de rotina feitos obrigatoriamente nos hemocentros do país desde 1992 ou de relatos de dados de prevalência em amostras específicas da população.

O Espírito Santo, considerado uma das regiões que, juntamente com a Amazônia e Santa Catarina, tem áreas de média prevalência da infecção, não possui ainda estudos epidemiológicos bem conduzidos para a localização das áreas de maior prevalência da infecção pelo VHB. Existe apenas uma informação da Secretaria de Saúde do Espírito Santo mostrando prevalência média nos municípios de colonização italiana (PEREIRA; ANDRADE, apud FIGUEIREDO et al., 2008). Em 10500 doadores voluntários do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Espírito

Santo (HEMOES) nos anos de 1996 a 1999, 12,93% eram anti-HBc positivos (GONÇALVES et al., 2001). Com a introdução de triagem clínica mais rigorosa houve queda nessa prevalência. No ano de 2007, a prevalência foi de 4,56% antes da triagem e de 3,9% após a triagem clínica (PELIÇÃO, 2007). Estudos em gestantes e em mulheres jovens atendidas em serviço de saúde da família do Estado mostraram baixa incidência da infecção (FIGUEIREDO et al., 2008). A Tabela 4 resume alguns dados sobre incidência e prevalência da infecção pelo VHB no Brasil e no Espírito Santo.

Tabela 4 - Dados epidemiológicos da infecção pelo vírus da hepatite B em diferentes populações do Brasil

<b>Região</b>	<b>Amostra</b>	<b>Resultados % (IC 95%)</b>	<b>Referência</b>
<b><u>Norte</u></b>			
Acre	2656 (amostra populacional)	Anti-HBc: 61,2; HBsAg: 3,3	VIANA et al, 2005
Bacia Amazônica	349 (populações ribeirinhas)	HBsAg: 5,2	DE PAULA et al, 2001
<b><u>Centro-Oeste</u></b>			
Goiás	1095 (pacientes de hemodiálise)	29,8 (27,1-32,5), sendo: anti-HBs + anti-HBc: 25 HBsAg: 2,4 Anti-HBc: 2,5	FERREIRA et al, 2006
Mato Grosso	754 (populações rurais)	Anti-HBc: 31 (27-34) HBsAg: 3 (2-4)	SOUTO et al, 2001
Mato Grosso do Sul	260 (afro-descendentes)	Anti-HBc: 42,7 HBs Ag: 27,3	MOTTA-CASTRO et al, 2003
<b><u>Sudeste</u></b>			
Espírito Santo	10500 (doadores de sangue)	Anti-HBc: 13	GONÇALVES, 2001
Espírito Santo	965 (doadores de sangue)	Anti-HBc: 4,56	PELIÇÃO, 2007
Rio de Janeiro	128497 (doadores de sangue)	HBsAg: 0,27	ANDRADE et al, 2006
Rio de Janeiro (Macaé)	1100 (laboratórios de rotina)	HBc total: 15,3 (13,2-17,6)	GAZE; CARVALHO; WERNECK, 2002
São Paulo	1059 (amostra populacional)	5,94 (4,50-7,35)	FOCACCIA et al, 1998 #
São Paulo, Salvador e Manaus	3598 (doadores de sangue)	HBsAg: 1; 0,1 e 0,3 e Anti-HBc: 5; 4 e 5,5 para SP, Salvador e Manaus, respectivamente.	NASCIMENTO et al, 2008
<b><u>Sul</u></b>			
Paraná	3188 (gestantes)	Anti-HBc e/ou HBsAg: 18,5 (17,2-19,9)	BERTOLINI et al, 2006
Santa Catarina	263795 (doadores de sangue)	HBsAg: 0,64 - 0,98	ROSINI et al, 2003

# Dados obtidos a partir do resumo do trabalho.

A evolução da infecção depende da idade na qual ocorre. A infecção em recém nascidos (transmissão materno-fetal) e em crianças (transmissão horizontal por mecanismos não conhecidos) frequentemente é oligo ou assintomática e tende a persistir em cerca de 80-90% dos infectados (ARBUTHNOT; KEW, 2001). Nos adolescentes e adultos a infecção, após doença de gravidade variável, evolui para a cura em 90% dos casos, sendo a cronicidade da doença ou a persistência da infecção menos freqüente (GONÇALVES et al., 2006).

Dos indivíduos que não curam a infecção, muitos desenvolvem hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Outros permanecem como portadores oligossintomáticos, podendo assim persistir por toda a vida, ainda que mantenham o risco de desenvolver doença crônica, inclusive o CHC (WRIGHT; LAU, 1993; GANEM; PRINCE, 2004).

O VHB tem sido implicado na etiologia do CHC mesmo em pacientes que não apresentam evidências sorológicas de infecção. Assim, a correlação entre a infecção pelo VHB e o CHC deve ser mais significativa do que a relatada (RAIMONDO et al., 2007). O DNA do VHB pode persistir em baixas concentrações no soro mesmo após o desaparecimento do HBsAg (MOLINA et al., 1992; ZHANG et al., 1993). A detecção do DNA viral no fígado e/ou soro viral, em casos de sorologia negativa para o HBsAg, caracteriza a infecção oculta pelo VHB (RAIMONDO et al., 2007).

### **2.5.2 Mecanismos da hepatocarcinogênese pelo vírus da hepatite B**

A relação entre CHC e vírus da hepatite B foi demonstrada logo após a identificação do VHB e a introdução de métodos que permitiram identificar o vírus ou seus produtos nas pessoas infectadas. Essa relação é uma das mais fortes entre um vírus e um tumor humano e é sustentada por diversas evidências, entre as quais: (1) estudos epidemiológicos mostram uma associação significativa do VHB com o CHC tanto em regiões de alta como de baixa incidência do tumor (ARBUTHNOT; KEW, 2001; ANZOLA, 2004; CHEN et al., 2006) (A Tabela 10, Apêndice A resume a prevalência do VHB em pacientes com CHC em diferentes regiões do mundo). Estudos de coorte em regiões de alta prevalência do VHB demonstram que a infecção com o vírus aumenta em muitas vezes (8 a 194) o risco de desenvolver

CHC (IARC, 1994). (2) Estudos de biologia molecular demonstraram que o genoma do VHB ou seus fragmentos integram-se aleatoriamente no genoma do hepatócito, o que pode produzir, além da instabilidade do genoma, mutações insercionais, quebras e translocações, com possibilidade de perdas de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes (ARBUTHNOT; KEW, 2001; ANZOLA, 2004; FARAZI; DePINHO, 2006). (3) Dados de patologia comparada mostram que o carcinoma hepatocelular em marmotas (“woodchuck” ou *Marmota monax*) e em patos está relacionado a vírus semelhantes ao VHB, denominados respectivamente WHV (*woodchuck hepatitis virus*) e DHV (*duck hepatitis virus*) (YOKOSUKA et al., 1985; KORBA et al., 1989). (4) Camundongos transgênicos com o genoma do VHB ou com alguns de seus genes desenvolvem CHC em estágios precoces da vida (ARBUTHNOT; KEW, 2001). (5) Recentemente foi demonstrado que o tratamento antiviral específico diminui significativamente o risco de desenvolvimento do CHC (SUNG et al., 2008).

Os mecanismos da hepatocarcinogênese não são bem conhecidos. Podem-se considerar mecanismos de ação direta do VHB sobre o genoma e mecanismos indiretos decorrentes dos fenômenos necro-inflamatórios induzidos pelo vírus, como resumido na Figura 7.

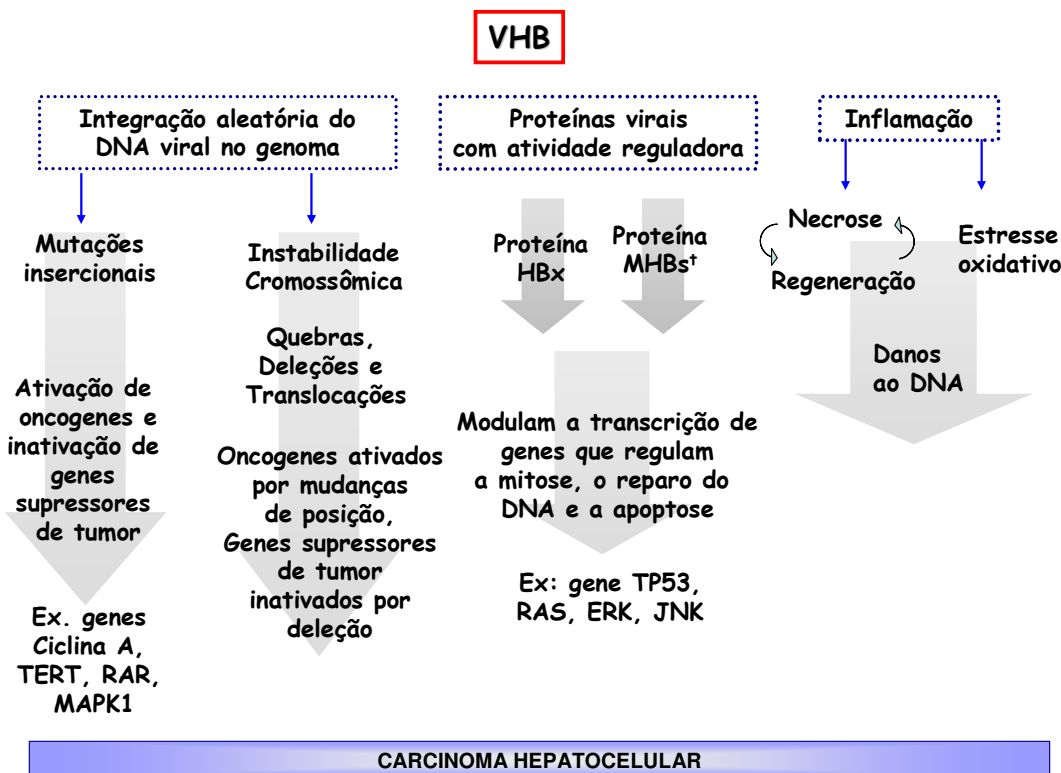


Figura 7 - Esquema ilustrando os mecanismos da hepatocarcinogênese mediada pelo VHB.

## 2.6 AÇÃO SINÉRGICA DE AFLATOXINAS E VÍRUS DA HEPATITE B NA HEPATOCARCINOGENESE

As primeiras evidências do sinergismo entre AFB1 e VHB na gênese do CHC foram obtidas por meio de experimentos com ratos transgênicos, que superexpressavam a proteína preS1 do VHB e eram alimentados com AFB1. Verificou-se que estes ratos desenvolveram mais rapidamente e de forma mais extensa displasia de hepatócitos e CHC (KEW, 2003).

Com o advento dos métodos de detecção dos metabólitos e dos adutos da aflatoxina, muitos estudos de coorte mostraram interação sinérgica entre a AFB1 e o VHB no aumento do risco para o câncer e/ou na diminuição da idade do aparecimento do tumor (ROSS et al., 1992; LUNN et al., 1997; YU et al., 1997; SUN et al., 1999; CHEN et al., 1992). Segundo alguns trabalhos, o risco de desenvolver CHC é cerca de 300 vezes maior em pacientes HBsAg positivos com a mutação ser-249 *TP53* em relação aos que não possuem estes dois fatores (KIRK et al., 2005).

Vários mecanismos são sugeridos para se explicar a interação sinérgica da AFB1 e o VHB. Uma proposição é que o VHB sensibiliza os hepatócitos para o efeito carcinogênico da AFB1 pela indução da enzima citocromo P-450, responsável por metabolizar a AFB1 e gerar seu epóxido reativo. Outro mecanismo proposto é que o aumento da necrose e regeneração dos hepatócitos, causado pela infecção crônica viral, aumenta a probabilidade das mutações induzidas pela AFB1 (dentre elas a mutação ser-249 *TP53*) e a expansão clonal das células que as apresentam. Por fim, a proteína viral X pode inibir a via de reparo do DNA, favorecendo assim a persistência das mutações (KEW, 2003).

A ação sinérgica do VHB e da AFB1 é confirmada pela maior prevalência da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com CHC de países com alta incidência de ambos os fatores etiológicos (MING et al., 2002).

### **3 OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência da mutação ser-249 no gene *TP53* e sua associação com infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes com carcinoma hepatocelular ou com cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular associado.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a mutação ser-249 no gene *TP53* no fígado e no plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular ou com cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular associado, por RFLP e sequenciamento;
- Detectar a presença do DNA do vírus da hepatite B no fígado e no plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular ou com cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular associado, por PCR;
- Correlacionar a presença da mutação ser-249 no gene *TP53* com a infecção pelo vírus da hepatite B;
- Avaliar a sensibilidade do método de RFLP para identificação da mutação ser-249 *TP53* considerando o sequenciamento como padrão-ouro.



## ***4 MATERIAL E MÉTODOS***

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### 4.5 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo é do tipo descritivo de análise da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular e pacientes com cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular e de investigação da sua associação com a infecção pelo VHB, fazendo uso de amostras obtidas a partir do Serviço de Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM).

O HUCAM localiza-se na cidade de Vitória-ES e possui um serviço de Gastroenterologia que é referência no Estado, atendendo aos municípios da Região Metropolitana de Vitória, assim como a outros municípios do Estado do Espírito Santo. A maioria dos casos de doença hepática diagnosticados no Estado é encaminhada a este hospital.

### CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico/UFES (n° de registro 107/07), em reunião realizada em 28 de novembro de 2007 (Anexo 1).

### 4.3 AMOSTRAS ESTUDADAS

#### **4.3.1 Amostras de fígado de pacientes com carcinoma hepatocelular**

Foram levantados 45 casos de carcinoma hepatocelular provenientes de necrópsias e biópsias no período de 1997 até 2008, arquivados no Serviço de Patologia do HUCAM. Dos casos levantados, obtivemos os fragmentos de fígado incluídos em blocos de parafina de 24 casos de biópsia e de 10 casos de necrópsia. A não obtenção de 11 amostras ocorreu pelo alto estado de degradação de alguns blocos ou pela não localização destes dentro do arquivo.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espessura e montados em lâminas de vidro. Removeu-se a parafina das lâminas com dois banhos de xilol PA, seguidos por dois banhos de etanol absoluto e, por fim, banhos de água destilada.

Buscou-se junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do HUCAM o prontuário dos pacientes cujas amostras foram incluídas no estudo para anotação dos dados sobre idade, sexo, presença ou ausência de cirrose hepática, de etilismo e da infecção pelo vírus da hepatite B e/ou C.

#### **4.3.2 Amostras de plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular**

Além das amostras de fígado, foram analisadas oito amostras de plasma provenientes de pacientes com CHC que foram atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HUCAM. O sangue foi colhido em tubo *vacutainer* contendo EDTA-K2 e submetido à centrifugação de 2500 xg por 10 minutos para separação do plasma, posteriormente armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.3 Amostras de fígado de pacientes com cirrose hepática**

Pacientes com cirrose hepática sem CHC foram incluídos no estudo para verificar se a mutação é encontrada em uma doença considerada pré-neoplásica. Foram estudadas 43 amostras de fragmentos hepáticos cirróticos sem CHC obtidas do arquivo de necrópsias do Serviço de Patologia do HUCAM. Os blocos de parafina foram seccionados e os cortes desparafinizados como descrito para os casos de CHC.

#### **4.3.4 Amostras de plasma de pacientes com cirrose hepática**

Foram utilizadas 31 amostras de plasma de pacientes cirróticos sem CHC atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HUCAM. Os procedimentos para coleta e armazenamento do plasma foram os mesmos descritos para os casos de CHC.

### 4.3 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO SER-249 TP53

A metodologia empregada na detecção da mutação ser-249 *TP53* para as amostras de CHC foi repetida para as amostras de cirrose hepática.

#### 4.4.1 Extração do DNA

##### 4.4.1.1 Amostras de fígado

Os cortes de fragmentos do tumor (10-15 mg ou 2-6 lâminas) foram raspados das lâminas com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e transferidos para tubos de 1,5 mL (VOLPINI et al, 2006). O DNA foi extraído utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen®) (JACKSON et al, 2001; HOSNY et al, 2008) conforme as recomendações do fabricante, com as seguintes modificações: os fragmentos de tecido (fígado) foram digeridos por, no mínimo, 12 horas e as amostras foram eluídas em 20-60 µL de tampão de eluição (fornecido pelo kit e constituído de Tris-EDTA), dependendo da quantidade inicial de tecido disponível. O DNA extraído foi armazenado em freezer a – 20°C.

##### 4.4.1.2 Amostras de plasma

O DNA foi extraído a partir de 200 µL de plasma utilizando o kit de extração QIAamp BLOOD MINI KIT (Qiagen®) (JACKSON et al, 2003; KIRK et al., 2000; HUANG et al., 2003; KIMBI et al, 2005; KIRK et al., 2005; HOSNY et al, 2008), de acordo com as recomendações do fabricante, com a seguinte modificação: as amostras foram eluídas em 60 µL de tampão de eluição. O DNA extraído foi armazenado em freezer a – 20°C.

#### 4.4.2 Detecção da mutação ser-249 no gene *TP53* pelo método PCR-RFLP

A metodologia utilizada para a detecção da mutação ser-249 *TP53* foi a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seguida pelo método de RFLP (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição) utilizada na grande maioria dos estudos (AGUILAR; HUSSAIN e CERUTTI, 1993; YANG et al., 1997; DENG; MA, 1998; KIRK et al., 2000; HUANG et al., 2003; JACKSON et al., 2003; KIMBI et al., 2005; KIRK et al., 2005; HOSNY et al., 2008).

#### 4.4.2.1 Reação de PCR

As seqüências dos iniciadores ou *primers* (Quadro 2 e Figura 8) foram escolhidas pelo laboratório, com base na seqüência nucleotídica do gene *TP53* disponível no GenBank (National Center of Biothecnology Information, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> sob o código AY838896) e testadas pelo programa *Primer3 Input 0.4.0* (disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/>>). As condições do programa de amplificação estão demonstradas no Quadro 3. Para cada reação de PCR, um volume de 2,5 µL de DNA (concentração final aproximada na reação de 4 ng/µL) foi adicionado a mistura de reagentes, contendo 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da Platinum Taq DNA polimerase 1X, o par de iniciadores na concentração final de 0,4 µM cada e água ultra pura para completar o volume final de 25 µL.

Todas as reações de amplificação para o éxon 7 do *TP53* foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf®) e na presença de um controle negativo, onde substituiu-se a amostra de DNA por água ultra pura (Gibco®).

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)	Fragmento amplificado
Senso (F)	GCGCACTGGCCTCATCTTGG	15252 - 15272	179 pb
Anti-senso (R)	CTTGCCACCCTGCACACTGG	15411 - 15431	

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na amplificação da região de interesse no gene *TP53*.

<b>Desnaturaçã Inicial</b>	<b>Desnaturaçã</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensã</b>	<b>Extensã final</b>	<b>Nº de ciclos</b>
94 °C, 10min	94 °C, 45s	67 °C, 45s	72 °C, 45s	72 °C, 10min	45

Quadro 3 - Programa de amplificação utilizado na PCR.

#### 4.4.2.2 Digestão dos produtos amplificados pelo método de RFLP

Após a reação de PCR, o fragmento de interesse amplificado (fragmento de 179 pb do éxon 7 do gene *TP53*) foi submetido à digestão *overnight* em banho-maria a 37 °C pela enzima de restrição *HaeIII* (Invitrogen®). À mistura de digestão foi adicionado 8 µL de produto de PCR (concentração final aproximada de 200 ng/ µL), 10 U da enzima *HaeIII*, BSA 0,1 X, tampão da enzima 1 X e água ultra pura para completar o volume final de 20 µL. Para cada amostra, as reações de digestão foram realizadas duas vezes, em dias distintos e com produtos de PCR diferentes.

#### 4.4.2.3 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada nos produtos de PCR (tópico 4.4.2.1), a fim de verificar a eficácia da amplificação antes de prosseguir com a digestão, bem como nas amostras digeridas pela enzima *HaeIII*, a fim de visualizar a separação dos fragmentos digeridos. Em ambos os casos, a corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida (50 mL de solução contendo: 7% de poliacrilamida, TBE 1 X, 0,7% de solução APS 10% e 0,07% de TEMED), com tampão TBE 1X por aproximadamente duas horas, sob uma corrente elétrica de 200 volts.

#### 4.4.2.4 Método de impregnação pela prata

Após a eletroforese, o gel foi corado através do método de impregnação pela prata, seguindo as seguintes etapas: tratamento do gel em solução fixadora (Etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5% e água destilada) por 6 min e, após remoção, incubado em solução de nitrato de prata 0,1% por 10-15 min, seguida por lavagem

com água. O gel foi então incubado com solução reveladora (formaldeído 0,1%, hidróxido de sódio 1,5% e água destilada) para redução da prata e visualização das bandas. O gel foi arquivado com o sistema de fotodocumentação de géis (Vilber Lourmat®).

#### 4.4.2.5 Interpretação dos resultados obtidos pelo método PCR-RFLP

Nos fragmentos de 179 pb amplificados que possuem a seqüência normal de nucleotídeos, a enzima *HaeIII* reconhece e cliva três sítios de restrição (GGCC), gerando quatro fragmentos de tamanhos diferentes: 92 pb, 66 pb, 9 pb e 12 pb (Figura 8). Os fragmentos que possuem a mutação (transversão de uma guanina por uma timina no códon 249 do gene *TP53*) perdem um dos sítios de restrição, pois este passa de GGCC para GTCC e deixa de ser reconhecido pela *HaeIII*. Desta forma, a clivagem das seqüências com a mutação resulta em três fragmentos distintos: 158 pb, 12 pb e 9 pb. A presença da banda de 158 pb no gel de poli-acrilamida indica, portanto, que a seqüência de DNA possui a mutação ser-249 *TP53*.

**A**

5'- gcgca**ctggcctcatcttgggcctgtgttatctcctag**GTTGGCTCTGACTGTACCACCAT  
 CCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCG  
 GA[**GGCC**]CATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGgtcaggagacca  
cttgcaccctgcacactgg -3'

**B**

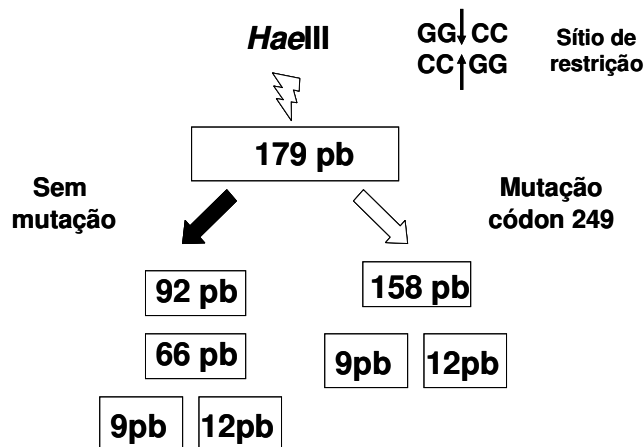


Figura 8 - Detecção da mutação ser-249 *TP53*. (A) Seqüência nucleotídica 5'-3' amplificada pelos iniciadores usados na PCR. Seqüências nucleotídicas sublinhadas (representam os iniciadores usados na reação de PCR), seqüência em caixa alta (éxon 7 do gene *TP53*), seqüência em negrito e dentro dos colchetes (sítio de restrição da enzima *HaeIII* que

engloba a mutação no códon 249). (B) Representação dos fragmentos gerados pela clivagem com *HaeIII* nas seqüências com e sem a mutação ser-249 *TP53*.

#### **4.4.3 Detecção da mutação ser-249 no gene *TP53* pelo sequenciamento**

Para confirmar os resultados encontrados com a utilização do método PCR-RFLP, as amostras do estudo foram seqüenciadas na Plataforma de Sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). Os procedimentos usados para o sequenciamento estão disponíveis no endereço eletrônico <<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/arquivos/manual.pdf>>.

Alguns procedimentos foram realizados antes do envio das amostras para o sequenciamento, como descrito abaixo.

##### **4.4.3.1 Extração de DNA do fragmento com a mutação a partir do gel de poliacrilamida**

Para aumentar a chance de detectar a mutação na reação de sequenciamento, realizamos a clivagem da banda de 158 pb a partir do gel de poliacrilamida, utilizando uma lâmina de bisturi. As bandas foram picotadas e transferidas para tubos de 1,5 mL com 400 µL de TE9 (solução de Tris 0,5 M, EDTA 0,02 M e NaCl 0,01 M, pH9). Os tubos foram incubados em banho-maria a 80°C por duas horas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 100 µL de NH<sub>4</sub>OAc 10 M e 1 mL de etanol absoluto a 4°C. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 20000 xg/30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado ao tubo 1 mL de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados a 20000 xg/15 min a 4°C, descartando-se posteriormente o sobrenadante. O precipitado foi eluído em 10 µL de água ultra pura (Gibco®) e as amostras foram armazenadas em freezer a – 20°C.

##### **4.4.3.2 Amplificação dos fragmentos com a mutação**



Para aumentar a concentração do fragmento de 158 pb extraído a partir do gel, foi realizada a PCR destas amostras utilizando o mesmo iniciador anti-senso e outro iniciador senso, desenhado pelo projeto (5'-CCTGTGTTATCTC CTAGGTTGGC-3').

#### 4.4.3.3 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado previamente à realização da reação de sequenciamento para retirada dos nucleotídeos não incorporados e do excesso de iniciadores. A purificação foi realizada utilizando-se o reagente ExoSAP-IT (USB<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>), utilizando-se 2 µL de cada amostra.

#### 4.4.3.4 Análise dos resultados de sequenciamento

A análise dos resultados do sequenciamento foi feita utilizando o programa BioEdit (disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>). Os resultados do sequenciamento de ambas as fitas (senso e anti-senso) de cada amostra foram comparados para se chegar a um consenso. As amostras foram consideradas positivas para a mutação apenas nos casos em que esta foi observada nas duas fitas. A leitura dos eletroferogramas foi realizada visualmente para cada seqüência.

### 4.5 PESQUISA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B

A pesquisa do DNA do VHB foi realizada em todas as amostras de CHC estudadas utilizando-se o mesmo DNA extraído a partir do tecido ou plasma. Foram utilizados seis pares de iniciadores, que foram usados em reações de PCR e três deles – VHB2, VHB4 e VHB6 – foram usados em reações de *nested*-PCR, tendo como molde o produto da amplificação com os iniciadores VHB1, VHB3 e VHB5, respectivamente (Quadro 4 e Figura 9).

Nome do iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)	Fragmento amplificado
VHB 1	F1- AAGCCTCCAAGCTGTGCCTT	1866- 1885	451pb
	R1- CCACCAAATGCCCCTATC	2300- 2317	
VHB 2	F2- TGGCTTTGGGGCATGGACAT	1889- 1908	397pb
	R2- GGAGTGTGGATTTCGCACTCC	2267-2286	
VHB 3	F3- CTGCTGGTGGCTCCAGTTC	57- 75	371pb
	R3- CATCCTGCTGCTATGCCTCA	409- 428	
VHB 4	F4- CCTGCTCGTGTTACAGGCG	187- 205	207pb
	R4- GATGTGTCTGCGGCGTTTT	376- 394	
VHB 5	F5- CGCACCTCTCTTTACGCGG	1525- 1543	310pb
	R5- GCAACTTTTTACCTCTGCC	1816-1835	
VHB 6	F6- TTCGCTTCACCTCTGCACGT	1585- 1604	213pb
	R6- GAGGCTGTAGGCATAAATTGGT	1777- 1798	

Quadro 4 - Iniciadores usados na amplificação dos fragmentos do genoma do VHB pela PCR.

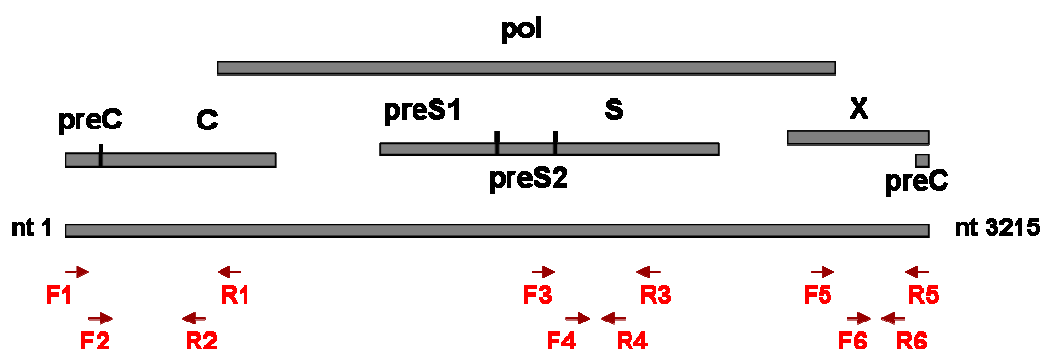


Figura 9 - Genoma viral evidenciando as regiões amplificadas pelos iniciadores virais utilizados no estudo (setas vermelhas).

Para a escolha dos iniciadores buscou-se inicialmente no GenBank mais de 100 seqüências do genoma do VHB que englobam os seus oito genótipos (A-H). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA 4.1 Beta (disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>>) e as regiões mais conservadas foram delimitadas e utilizadas para a escolha das seqüências dos iniciadores. Para auxiliar na escolha das seqüências, foi utilizado o programa *Primer3 Input 0.4.0* (disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/>>), que fornece uma predição da temperatura de anelamento dos iniciadores, da concentração das bases C e G e do potencial para dimerização e formação de estruturas secundárias. Foram realizadas buscas no BLAST (disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) para verificar se os

iniciadores possuíam homologia com seqüências de outros organismos que não o VHB.

Para validação dos iniciadores, testamos as seis regiões em pacientes com diagnóstico sorológico positivo para o antígeno viral de superfície HBsAg.

As condições do programa de amplificação estão demonstradas no Quadro 5. Para cada reação de PCR, um volume de 2 µL de DNA (concentração final aproximada de 3,5 ng/µL) foi adicionado à mistura de reagentes, contendo 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da Platinum Taq DNA polimerase 1X, o par de iniciadores na concentração final de 0,4 µM cada e água ultra pura para completar o volume final de 25 µL.

Todas as reações de amplificação para as regiões virais foram realizadas no termociclador Geneamp PCR system 9700 (Applied Biosystems<sup>®</sup>), na presença de um controle negativo.

<b>Desnaturaçã Inicial</b>	<b>Desnaturaçã</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão final</b>	<b>Nº de ciclos</b>
94 °C, 10min	94 °C, 45s	60 °C, 45s	72 °C, 45s	72 °C, 10min	45

Quadro 5 - Programa de amplificação utilizado na PCR para as regiões do VHB.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos casos de variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher – para verificar a significância estatística das tabelas de freqüência 2x2 de amostras independentes – ou o teste Binomial para os casos de comparação de freqüência dentro de uma amostra. Nos casos de variáveis contínuas foi usado o teste *t* de Student.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa BioEstat versão 5.0 (disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/>>), considerando-se estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## ***5 RESULTADOS***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS UTILIZADAS

Os principais dados demográficos e as informações disponíveis sobre a etiologia dos casos de carcinoma hepatocelular e de cirrose hepática estão resumidos nas Tabelas 5 e 6.

Nos casos de CHC, a cirrose hepática estava associada em 23 de 32 casos (72%) onde foi adequadamente investigada.

Tabela 5 - Dados demográficos e fatores etiológicos de 41 casos de carcinoma hepatocelular

<b>Idade</b> (anos)	
Média ± DP	62 ± 12
Amplitude	35 – 85
<b>Gênero</b> [n° (%)]	
Masculino	36 (88)
Feminino	5 (12)
<b>Etiologia em 33 casos</b> [n° (%)] <sup>1</sup>	
Álcool (A) <sup>2</sup>	3 (9)
VHB (B)*	14 (42)
VHC (C)*	10 (30)
B+ C+ *	2 (6)
A- B- C-	4 (12)
<b>Informação incompleta sobre etiologia</b>	8
<b>Total</b>	41

<sup>1</sup> Alcoolismo, VHB e VHC investigados simultaneamente em 33 casos.

<sup>2</sup> Casos onde a presença do alcoolismo foi observada isoladamente.

\* Foram considerados os casos de infecção viral isolada ou associada ao etilismo.

Tabela 6 - Dados demográficos e fatores etiológicos de 74 casos de cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular associado.

<b>Idade</b> (anos)	
Média ± DP	50 ± 12
Amplitude	16 – 81
<b>Gênero</b> [n°/total (%)]	
Masculino	55 (74)
Feminino	19 (26)
<b>Etiologia em 43 casos</b> [n° (%)] <sup>1</sup>	
Álcool (A)	13 (30)
VHB (B)*	9 (21)
VHC (C)*	12 (28)
B+ C+ *	3 (7)
A- B- C-	6 (14)
<b>Informação incompleta sobre etiologia</b>	31
<b>Total</b>	74

<sup>1</sup> Alcoolismo, VHB e VHC investigados simultaneamente em 43 casos.

<sup>2</sup> Casos onde a presença do alcoolismo foi observada isoladamente.

\* Foram considerados os casos de infecção viral isolada ou associada ao etilismo.

## 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

### 5.2.1 Amostras de fígado

Das 34 amostras tumorais (necrópsia e biópsia), 33 mostraram boa amplificação para a região de interesse do gene *TP53* (97%); apenas uma amostra não mostrou amplificação, mesmo após a repetição da extração e da amplificação, sendo esta amostra excluída das análises. As 43 amostras de cirrose hepática resultaram em boa amplificação.

A extração de DNA a partir dos cortes de fígado fixados em lâmina foi a alternativa encontrada para substituir a extração de DNA a partir dos fragmentos hepáticos incluído em parafina. Esta extração não gerou resultados satisfatórios, mostrando

baixa taxa de amplificação. A utilização de fragmentos de fígado retirados diretamente dos blocos pode dificultar a remoção da parafina pelo xilol, enquanto na lâmina, esta remoção é mais eficaz. A parafina dificulta a extração do DNA e pode inibir a sua amplificação.

A escolha dos iniciadores priorizou seqüências que amplificassem fragmentos de tamanho reduzido e viabilizassem, assim, a amplificação a partir de amostras com DNA fragmentado, o que é esperado de amostras fixadas com formaldeído e conservadas em parafina por longo período (SHI et al., 2004; SIMONATO et al., 2007).

A concentração média de DNA obtida com a metodologia de extração utilizada foi de 40 ng/ $\mu$ L (Gráfico 1).

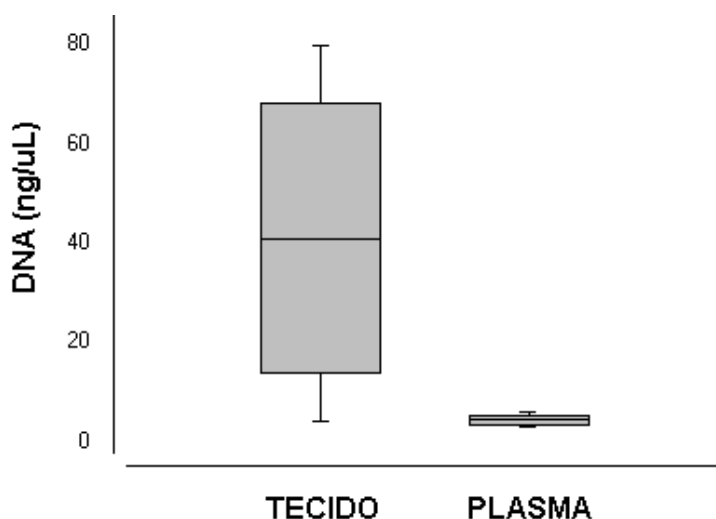


Gráfico 1 - Média de concentração de DNA obtida com a extração a partir de fragmentos hepáticos e de plasma de pacientes com carcinoma hepatocelular.

### 5.2.2 Amostras de plasma

As oito amostras de DNA de CHC e as 31 amostras de CH extraídas a partir de plasma mostraram boa amplificação. A concentração média de DNA obtida com a metodologia de extração foi de 5 ng/ $\mu$ L para as amostras de CHC (Gráfico 1).

Kirk e colaboradores (2005) observaram uma concordância de 88% entre o DNA das células tumorais e o DNA extraído do plasma, o que foi confirmado em outros

estudos (JACKSON et al., 2001; JACKSON et al., 2003). Com base nestes dados, optou-se por formar um grupo único com as amostras de tumor e de plasma, resultando em um número maior de amostras usadas nas análises estatísticas.

### 5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *TP53*

Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à reação de PCR para obtenção do fragmento de 179 pb do éxon 7, gene *TP53* (Figura 10).

Embora as extrações a partir de tecido e de plasma tenham resultado em concentrações médias de DNA diferentes, os seus produtos de PCR apresentaram concentrações médias semelhantes (500 ng/μL).

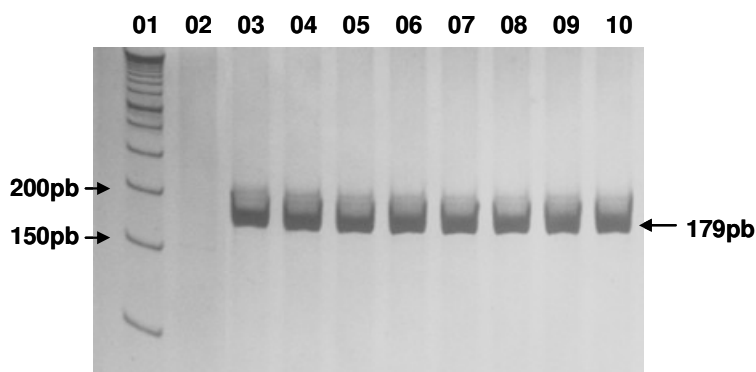


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do *amplicon* de 179 pb do éxon 7 do gene *TP53*. Coluna 01: marcador de peso molecular de 50 pb. Coluna 02: controle negativo da reação. Colunas 03 – 10: amplificação do fragmento de interesse para diferentes amostras estudadas.

### 5.4 RESULTADOS DE RFLP

A detecção da mutação ser-249 *TP53* foi obtida através da digestão do produto amplificado e observação do fragmento não digerido de 158 pb. O padrão de bandas gerado por amostras com e sem a mutação está representado na figura 11.



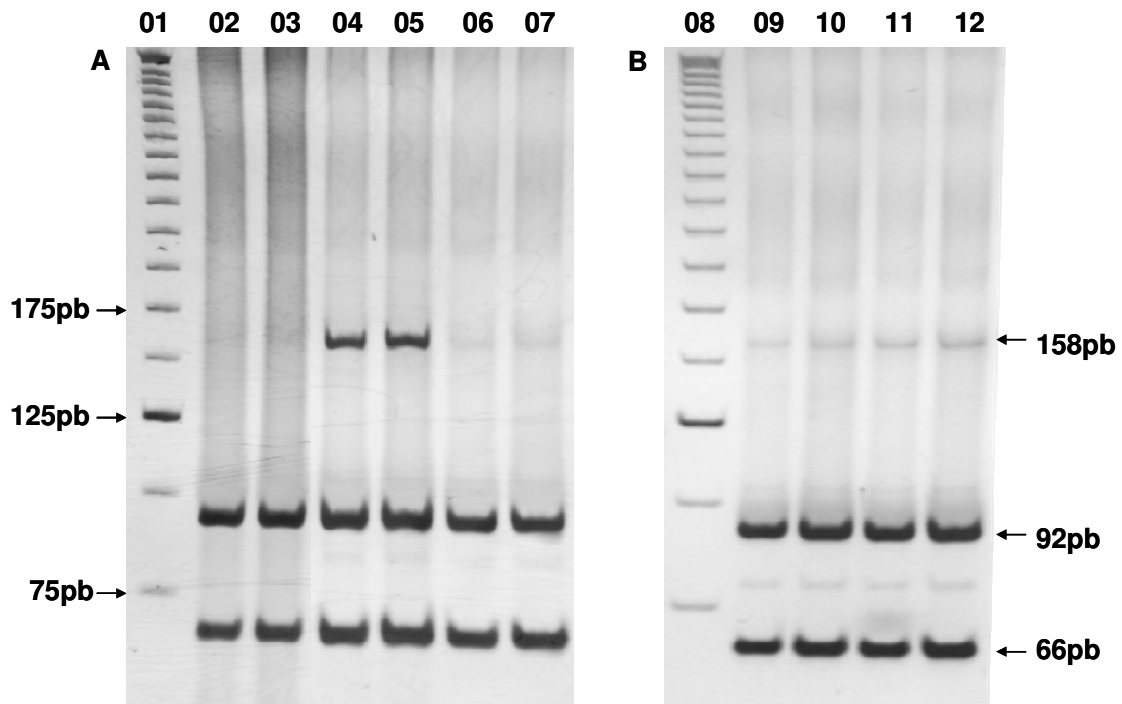


Figura 11 - Eletroforese em géis de poliacrilamida dos produtos em duplicatas da restrição enzimática com a enzima *HaeIII*. O fragmento de 158 pb diferencia o padrão com a mutação do normal, que apresenta apenas os fragmentos de 92 pb e 66 pb. **Gel A.** Colunas 02, 03: duplicata de uma amostra sem a mutação ser-249 *TP53*. Colunas 04, 05: exemplo de uma amostra com a mutação (fragmento de 158 pb de intensidade forte). Colunas 06, 07: exemplo de uma amostra com fragmento de 158 pb de intensidade fraca. **Gel B.** Colunas 09, 10, 11, 12: duas amostras em duplicatas cujo fragmento de 158 pb mostrou intensidade mediana. Colunas 01 e 08: marcador de peso molecular de 25pb.

A presença do fragmento de 158 pb no produto de digestão indica que há mutação ser-249 *TP53*, enquanto a presença dos fragmentos de 92 pb e 66 pb indica que há seqüências selvagens do gene *TP53* junto com seqüências que apresentam a mutação, o que é ocasionado pela presença de células não tumorais durante a extração de DNA. A grande maioria dos estudos utiliza a técnica de RFLP e também observa os fragmentos selvagens de 92 pb e 66 pb no produto de digestão, não comprometendo a análise da mutação (KIRK et al., 2000; HUANG et al., 2003, JACKSON et al., 2003; KIMBI et al., 2005; HOSNY et al., 2008).

A recomendação do fabricante quanto ao uso da enzima de restrição é a utilização de 1U da enzima *HaeIII* para cada 1 µg de DNA, incubando a 37 °C por 1 hora. Neste estudo foi utilizada 1U da enzima para cada 0,4 µg de DNA aproximadamente e a incubação foi realizada *overnight*. Estas modificações visaram evitar a ocorrência de digestão incompleta ou parcial. No entanto, a intensidade do fragmento de 158 pb apresentada por algumas amostras (fragmentos de intensidade fraca) como

visualizado na Figura 11, gerou dúvidas na interpretação dos resultados: se os fragmentos de intensidade fraca pertenciam a amostras com a mutação em uma pequena fração do DNA extraído ou se o fragmento visualizado era resultado de digestão parcial. Para tentar solucionar as dúvidas, os fragmentos com a mutação foram clivados do gel de poliácridamida e o DNA extraído a partir da banda do gel foi re-amplificado para posterior reação de sequenciamento.

## 5.5 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento bidirecional foi realizado em todas as amostras que apresentaram a banda de 158 pb. As seqüências foram investigadas quanto à presença de um pico referente à base timina na terceira posição do códon 249, o que caracteriza a mutação ser- 249 *TP53* (Figura 12).

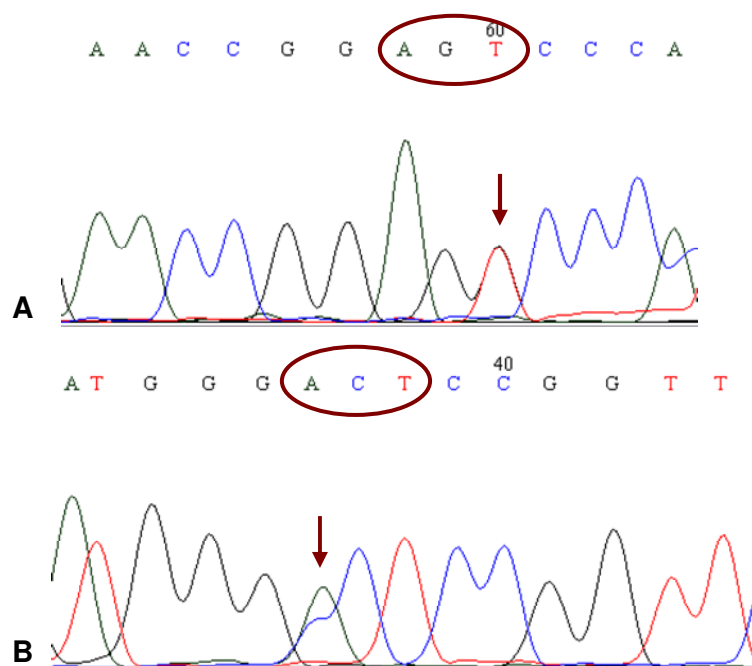


Figura 12 - Sequenciamento do éxon 7 do gene *TP53*. **A.** Seqüência senso mostrando a mutação na terceira base (seta) do códon 249 (círculo). **B.** Seqüência anti-senso da mesma amostra confirmando a presença da mutação ser-249 *TP53*.

## 5.6 MUTAÇÕES DETECTADAS

### 5.6.1 Mutação ser-249 *TP53*

Os resultados do RFLP mostraram que 16 amostras de CHC (39%) apresentaram os fragmentos de 158 pb com intensidade mediana ou forte (Figura 11), ou seja, foram consideradas positivas para a mutação. Quando incluídos os fragmentos de intensidade fraca, mais 14 amostras foram consideradas positivas, elevando para 73% o número de amostras positivas para a mutação.

Embora tenham sido analisados somente oito casos de plasma, não houve diferença na freqüência de mutações encontrada nas amostras de plasma comparada com a encontrada nas amostras de tecido, considerando ambas as metodologias, RFLP ( $p= 1,000$ ) e sequenciamento ( $p= 0,653$ ) (Tabela 7).

Para a cirrose hepática o RFLP mostrou 30 amostras positivas (40,5%), considerando a presença de fragmentos de intensidade fraca, mediana ou forte.

De modo semelhante, para os casos de cirrose hepática não houve diferença na freqüência da mutação em relação à origem do DNA, se de plasma ou de tecido (para RFLP,  $p= 0,632$  e para sequenciamento,  $p= 1,000$ ) (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da presença das mutações no éxon 7 do gene *TP53* nas amostras de carcinoma hepatocelular e de cirrose hepática.

	RFLP		Sequenciamento <sup>1</sup>		Sequenciamento <sup>2</sup>	
	plasma	tecido	plasma	tecido	plasma	tecido
CHC	6/8 (75%)	24/33 (73%)	0/8	6/33 (18%)	1/8 (12,5%)	9/33 (27%)
CH	14/31 (45%)	16/43 (37%)	0/31	1/43 (2,3%)	0/31	1/43 (2,3%)

<sup>1</sup> Considerando apenas as mutações ser-249 *TP53*.

<sup>2</sup> Considerando as mutações ser-249 e as mutações no códon 250.

Todas as 41 amostras de CHC foram submetidas ao seqüenciamento que mostrou a presença de seis (15%) transversões da base G para a base T na terceira base do códon 249 (AGG→AGT).

Das 74 amostras de cirrose hepática, as 30 amostras consideradas positivas para a mutação pelo RFLP foram submetidas ao sequenciamento, que confirmou a

mutação apenas em uma amostra (1 mutação em 69 amostras: cinco amostras foram excluídas pois não mostraram resultados satisfatórios no sequenciamento).

A diferença entre a detecção da mutação entre os casos de CHC e cirrose hepática foi estatisticamente significativo, considerando os dois métodos utilizados (sequenciamento,  $p= 0,011$ ; RFLP,  $p= 0,0009$ ).

Em resumo, o sequenciamento do éxon 7 do gene *TP53* em 41 casos de carcinoma hepatocelular e em 69 casos de cirrose hepática mostrou a presença da mutação ser-249 *TP53* em 6 (15%) e 1 (1,5%), respectivamente, sem diferença em relação à origem do DNA, se de plasma ou tecido.

### 5.6.2 Outras mutações no éxon 7 do gene *TP53* em pacientes com CHC

Outras quatro (10%) mutações do tipo transição foram detectadas no códon 250 do éxon 7 de pacientes com CHC: três na segunda base do códon 250 (CCC→ CTC) e uma na primeira base (CCC→TCC) (Figura 13 a e b, respectivamente).

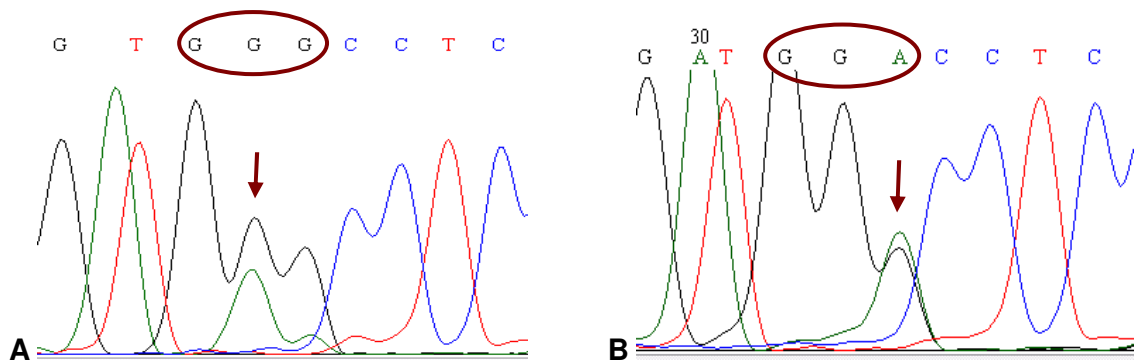


Figura 13 - Sequenciamento do éxon 7 do gene *TP53*. **A.** Seqüência anti-senso mostrando a mutação (seta) na segunda base do códon 250 (círculo). **B.** Seqüência anti-senso mostrando a mutação (seta) na primeira base do códon 250 (círculo). Nota: Considera-se a fita senso como base para orientação da posição da mutação.

As quatro mutações detectadas no códon 250 também alteram o sítio de restrição da enzima *HaeIII* (GGCC) e, portanto, também geram fragmentos não digeridos no gel de poliacrilamida, fragmentos estes indicativos da mutação ser-249 *TP53*.

Considerando a presença de seis mutações no códon 249 e de quatro mutações no códon 250 do éxon 7 do gene *TP53*, foi encontrado um total de 10 mutações (24%) que alteram o sítio de restrição da enzima *HaeIII* e geram fragmentos não digeridos de 158 pb (Tabela 7).

A distribuição das mutações de acordo com a etiologia do carcinoma hepatocelular está detalhada nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Distribuição das mutações em relação à etiologia do carcinoma hepatocelular

<b>Etiologia<sup>1</sup></b>	<b>Mutação<sup>3</sup></b>	
	<b>ser-249</b>	<b>ser-249 e 250</b>
Álcool (A)	2/3	2/3
VHB (B) <sup>2</sup>	1/14	3/14
VHC (C) <sup>2</sup>	2/10	3/10
B+ C+ <sup>2</sup>	0/2	1/2
A- B- C-	0/4	0/4
<b>Informação incompleta sobre etiologia</b>	1	1
<b>Total de mutações</b>	6	10

<sup>1</sup> Alcoolismo, VHB e VHC investigados simultaneamente em 33 casos.

<sup>2</sup> Foram considerados os casos de infecção viral isolada ou associada ao etilismo.

<sup>3</sup> N° de mutações/n° total de casos relacionados à etiologia do CHC.

Tabela 9 - Presença da mutação nos casos de carcinoma hepatocelular com ou sem cirrose associada

<b>Cirrose</b>	<b>Presença de mutação ser-249 e 250</b>		<b>total</b>
	<b>presente</b>	<b>ausente</b>	
presente	4	19	23
ausente	3	6	9
<b>total</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>32</b>

Não houve diferença significativa na média de idade nos pacientes com ou sem a mutação ( $61 \pm 9$  anos e  $63 \pm 12$  anos, respectivamente,  $p= 0,685$ ). Também não

houve diferença em relação ao gênero: 1/5 (20%) em mulheres e 9/36 (25%) em homens,  $p= 1,00$ .

Em relação aos fatores etiológicos associados ao CHC, nem a presença do VHB, do VHC ou do etilismo se relacionaram significativamente com a presença das mutações ( $p = 0,822$ ;  $p= 0,888$ ;  $p= 0,29$ , respectivamente). Do mesmo modo, em relação à presença de cirrose hepática associada ao CHC, não houve diferença significativa com relação à presença ou à ausência de mutações ( $p= 0,37$ ).

## 5.7 DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B

Para cada uma das 41 amostras de CHC estudadas foi realizada a amplificação das seis regiões do genoma do vírus da hepatite B (Figura 14).

As amostras que apresentaram resultados negativos para amplificação das seis regiões foram também testadas com três reações de *nested*-PCR, objetivando amplificar amostras que apresentassem carga viral baixa.

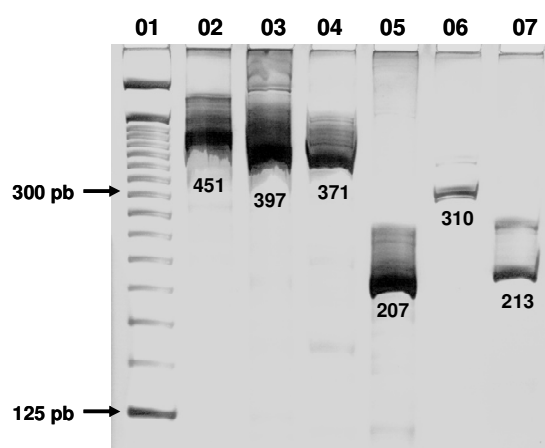


Figura 14 - Eletroforese em gel de poli-acrilamida dos produtos de PCR dos seis pares de iniciadores virais para uma amostra usada como controle positivo (HBsAg +). Coluna 01: marcador de peso molecular de 25 pb. Colunas 02-07: região VHB1 a VHB6, respectivamente.

Com essa metodologia, a presença do DNA do VHB foi detectada em 19 (46%) amostras. Dos 30 casos nos quais havia sorologia para o VHB, o HBsAg estava presente em oito (27%). Todas as oito amostras positivas para o HBsAg tiveram o

DNA viral detectado. Dos 11 casos nos quais o VHB foi detectado somente pelo DNA presente no tecido ou plasma, o HBsAg era negativo em sete e não foi pesquisado em quatro.

Quando analisamos a detecção do DNA considerando isoladamente a amplificação com cada um dos iniciadores, os iniciadores VHB2 e VHB4 foram os mais eficientes na detecção do VHB. A utilização destes dois pares de iniciadores permitiu detectar o DNA viral de todas as 19 amostras consideradas positivas para o VHB, embora em seis destas amostras estes dois iniciadores só tenham permitido a detecção do DNA após a reação de *nested*-PCR (sendo quatro destas amostras negativas para as demais regiões). Para a reação de *nested*-PCR com estes iniciadores é necessária, porém, a amplificação prévia com os iniciadores VHB1 e VHB3.

Os iniciadores VHB5 e VHB6 não demonstraram boa sensibilidade na detecção do DNA viral. As reações com os iniciadores VHB5 foram negativas para todas as amostras investigadas e o VHB6 foi positivo apenas em amostras positivas para outras regiões.

## **6 DISCUSSÃO**



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 *TP53* NOS CASOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

A presença da mutação '*hotspot*' ser-249 *TP53* foi encontrada em 15% (6/41) dos casos de CHC estudados. Essa frequência é bem menor que a observada em regiões onde há alta exposição às aflatoxinas. A Tabela 11 (Apêndice B) resume a prevalência dessa mutação em diferentes regiões do mundo, de acordo com o nível de exposição às aflatoxinas.

De acordo com a meta-análise realizada por Stern e colaboradores (2001) a frequência de mutações ser-249 *TP53* em pacientes com CHC varia de acordo com o nível de exposição às aflatoxinas, numa proporção de 30-83%, 0-30% e 0-11% para as regiões de alta, moderada e baixa exposição, respectivamente. Com base neste critério e nos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se admitir que no Espírito Santo, se houver exposição às aflatoxinas, esta deverá ser moderada ou baixa. De fato, a frequência da mutação encontrada nos casos de CHC se aproxima da observada em áreas onde a exposição às aflatoxinas é moderada, como no México (SOINI et al., 1996) e em Taiwan (LUNN et al., 1997) (Tabela 11, Apêndice B).

Nos Estados Unidos, na Europa e no Japão, regiões onde a contaminação com aflatoxinas é baixa, a frequência encontrada para a mutação variou de 0-11% (KUBICKA et al., 1995; GOLDBLUM et al., 1993; KAZACHKOV et al., 1996; VOLKMANN et al., 1994; KIRK et al., 2000; ODA et al., 1992). Já na África variou de 18% em regiões ao sul do continente (KIMBI et al., 2005), 40% na Gâmbia (KIRK et al., 2005) até 67% em Senegal (COURSAGET et al., 1993). Na China, a mutação variou de 33% na região de Tongan e Guangdong (PENG; PENG; YAO, 1998; YANG et al., 1997) até 69% em Guangxi (DENG; MA, 1998). A frequência da mutação encontrada no estudo (15%) foi superior à encontrada em países europeus e inferior à encontrada em países onde a exposição às aflatoxinas é endêmica.

Não existem muitos estudos sobre a frequência da mutação ser-249 *TP53* em países latino-americanos. No México, Soini e colaboradores (1996) encontraram a presença dessa mutação em 19% dos casos de CHC estudados e em 39% dos casos foi observada expressão moderada à alta de p53, por imuno-histoquímica. O México é um dos maiores consumidores de milho do mundo (10-35 g/dia) e este fato, associado ao mau armazenamento e à manipulação do milho e seus derivados, deve contribuir para exposição alimentar da população às aflatoxinas e, conseqüentemente, para a ocorrência de mutações ser-249 *TP53* (MONTESANO; HAINAUT; WILD, 1997).

No Brasil, Alves e colaboradores (2004) estudaram pacientes com CHC e cirrose hepática provenientes de São Paulo: encontraram uma hiperexpressão da p53 em 19/54 (35%) dos casos de CHC e em nenhum dos 30 casos de cirrose hepática sem CHC. Entretanto, a metodologia utilizada foi a imuno-histoquímica, permitindo apenas verificar a existência de alteração na proteína p53, e não a caracterização da mutação ou sua localização no gene. A elevada frequência de imuno-expressão da p53 no estudo de Alves e colaboradores (2004) foi próxima à relatada na China e regiões da África. Visto que no CHC o principal sítio 'hotspot' do gene *TP53* é o códon 249, Alves e colaboradores (2004) sugeriram a possível ocorrência de mutações no códon 249 nesta população. Nogueira (2007) estudou 74 amostras de fragmentos hepáticos de pacientes com CHC provenientes de São Paulo e observou a presença da mutação ser-249 *TP53* em 28% dos casos. Em ambos os estudos, os resultados indicam a presença de exposição às aflatoxinas no Estado de São Paulo. De fato, a presença de aflatoxinas ou do fungo *Aspergillus flavus* tem sido relatada em várias amostras de alimentos para uso humano e em rações para uso animal provenientes de diferentes regiões do Brasil (Tabela 2). No Estado do Espírito Santo, não há nenhuma relato publicado sobre a presença de aflatoxinas contaminando alimentos ou rações animais.

No Brasil, apesar da legislação em vigor e da fiscalização pela ANVISA, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em altos níveis, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como, milho, amendoim e derivados (FREITAS; BRIGIDO, 1998; OLIVEIRA; ROSMANINHO; ROSIM, 2006; GONÇALEZ et al., 2008; CAMPOS et al., 2008). A

interdição de lotes de amendoim e seus derivados é freqüentemente relatada no site da ANVISA (disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>) devido à presença de teores de aflatoxinas superiores aos permitidos pela legislação sanitária do produto.

### **6.1.1 Freqüência da mutação ser-249 *TP53* e presença do DNA do VHB**

Embora o número de casos estudados nessa série não permita uma avaliação adequada, os resultados não mostraram correlação estatística entre a presença da mutação ser-249 *TP53* e a presença do DNA do VHB nas amostras de CHC. Contudo, evidências epidemiológicas e experimentais sugerem forte sinergismo hepatocarcinogênico entre a AFB1 e a infecção crônica pelo VHB (KEW, 2003; MING et al., 2002). Também é proposto que a AFB1 é suficientemente hepatocarcinogênica em altos níveis de exposição, enquanto em níveis moderados ou baixos a presença da infecção pelo VHB é necessária para o efeito carcinogênico (KEW, 2003). No entanto, esta suposição não foi corroborada pelos resultados de Kirk e colaboradores (2000) na Gâmbia, Kimbi e colaboradores (2005) no sul da África e pela meta-análise de Stern e colaboradores (2001), que avaliaram amostras de pacientes expostos a níveis altos, moderados e baixos de AFB1. Nenhum destes estudos encontrou diferença entre a prevalência da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com ou sem a presença do VHB.

Neste trabalho, a ausência de associação entre a presença de mutação e a infecção pelo VHB pode estar relacionada à baixa freqüência da mutação, visto que, nos estudos onde a associação foi observada, a freqüência de mutações era elevada. Outro fator que deve ser destacado é que neste estudo apenas foi avaliado a presença do DNA do VHB, e não a sua expressão gênica ou o seu estágio de infecção (estágio replicativo ou inativo). Como tem sido relatado na literatura, o processo pelo qual o VHB leva ao surgimento da mutação ser-249 estaria relacionado à ação de proteínas virais com atividade reguladora (HBx e MHBs<sup>†</sup>), à integração do DNA viral ao genoma hospedeiro e aos fenômenos necro-inflamatórios indiretamente induzidos pelo VHB nos hepatócitos (FARAZI; DePINHO, 2006, MICHIELSEN; FRANQUE; VAN DONGEN, 2005; ARBUTHNOT; KEW,

2001), sendo estes eventos influenciados pelo estágio de infecção no qual o VHB se encontra.

Kirk e colaboradores (2005) não encontraram associação entre a presença do marcador HBsAg e a mutação ser-249 *TP53*, mas observaram que a presença do marcador HBeAg (marcador sorológico indicativo de replicação viral) aumentou em 3 vezes a chance de detecção desta mutação. Segundo Kirk e colaboradores (2005), outras investigações são necessárias para definir os mecanismos de interação entre o VHB e a mutação ser-249 *TP53*.

## 6.2 FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO SER-249 *TP53* NOS CASOS DE CIRROSE HEPÁTICA

A avaliação da mutação em pacientes com cirrose hepática sem CHC foi feita porque esta é considerada lesão pré-cancerosa, sendo lícito admitir a possibilidade da ocorrência da mutação em pacientes cirróticos que já tenham lesões com alto risco para evoluir para o CHC. Existem vários relatos da prevalência da mutação em cirróticos em diferentes regiões do mundo, com exposição variável de aflatoxinas (as informações estão resumidas na Tabela 11, Apêndice B). A prevalência observada na amostra estudada na presente investigação (1,5%) foi bem mais baixa do que a observada nas áreas de média ou alta exposição às aflatoxinas, sendo 10 vezes menor do que a observada na amostra de CHC. Algumas investigações da prevalência da mutação realizadas simultaneamente em pacientes com CHC e em pacientes cirróticos da mesma região têm mostrado a presença da mutação ser-249 em pacientes cirróticos em uma proporção 2,4, 2,7 e 2 vezes menor que nos pacientes com CHC (KIRK et al., 2000; KIRK et al., 2005; HUANG et al., 2003, respectivamente). Todas essas observações foram feitas em regiões de alta prevalência de exposição às aflatoxinas. A frequência 10 vezes menor da mutação em pacientes com cirrose hepática na amostra do presente trabalho reforça a idéia de que não deve haver alta exposição às aflatoxinas no Espírito Santo.

Admite-se que a presença da mutação ser-249 em pacientes com cirrose hepática possa representar um fator preditivo de maior risco para o desenvolvimento do CHC

nesses pacientes. Jackson e colaboradores (2003) realizaram um estudo prospectivo em Qidong (China) para estudar a presença dessa mutação em 1638 indivíduos (852 indivíduos positivos para o HBsAg e 786 indivíduos negativos, todos residentes de regiões rurais). Dos 15 indivíduos que tiveram diagnóstico de CHC durante o estudo, a mutação foi detectada no plasma de 21,7% das amostras coletadas antes do diagnóstico (em até cinco anos antes do diagnóstico) e em 44,6% das amostras coletadas após o diagnóstico. Essa observação reforça a hipótese criada por alguns autores de que a mutação ocorre em estágios precoces do desenvolvimento do CHC (PENG et al., 1999; KIRK et al., 2000; HUANG et al., 2003; KIRK et al., 2005), demonstrando que a sua presença pode ser considerada como fator de risco para o desenvolvimento do tumor. É possível que a presença da mutação ser-249 *TP53* em cirróticos represente um marcador de risco para CHC em cirróticos de regiões com alta exposição às aflatoxinas. Nas regiões onde a exposição à AFB1 é alta, essa mutação é observada em estágios precoces do CHC, enquanto que em regiões de baixa exposição ela é observada apenas em estágios mais avançados do tumor (FARAZI; DePINHO, 2006).

### 6.3 COMENTÁRIOS SOBRE PESQUISA DA MUTAÇÃO SER-249 *TP53* NO DNA EXTRAÍDO DO PLASMA

Nesta pesquisa, a mutação ser-249 foi investigada em DNA extraído de fragmento hepático e de plasma e os resultados foram considerados em conjunto. A utilização dos resultados em conjunto é justificada porque na literatura há evidências de que existe uma forte correlação entre a presença da mutação ser-249 no DNA extraído de fragmento hepático e no DNA extraído do plasma (JACKSON et al., 2001; JACKSON et al., 2003; KIRK et al., 2005).

Os mecanismos que levam à presença do DNA livre e circulante no plasma/soro não são bem conhecidos (KIRK et al., 2000; HUANG et al., 2003). Relata-se que pacientes com câncer tendem a apresentar maiores concentrações de DNA circulante no plasma/soro do que pacientes sem a doença (ANKER et al., 1999). Jackson e colaboradores (2003) e Kirk e colaboradores (2005) demonstram que entre a detecção da mutação no plasma e nos fragmentos de fígado há uma

concordância de aproximadamente 90%. A mutação no plasma foi detectada em amostras sucessivas dos mesmos pacientes, mostrando que a presença do DNA circulante com a mutação não é um evento ocasional, mas parece ser persistente (JACKSON et al., 2003). Embora a concentração média de DNA extraído a partir do plasma tenha sido oito vezes menor que a concentração média obtida com a extração dos fragmentos hepáticos, a taxa de amplificação do DNA proveniente das duas origens foi semelhante e satisfatória, com concentração de produto amplificado variando de 400-650 ng/μL. Além disso, não houve diferença na detecção das mutações em relação à origem do DNA, se de plasma ou tecido.

#### 6.4 OUTRAS MUTAÇÕES OBSERVADAS NO EXON 7 DO GENE TP53

Neste estudo, foram encontradas quatro mutações no códon 250 (10%), códon adjacente ao sítio 'hotspot' do códon 249 do éxon 7. Observou-se uma transição na primeira base do códon 250 (CCC→TCC), levando a uma substituição de aminoácidos (uma prolina por uma serina) e três transições na segunda base do códon 250 (CCC→CTC), resultando na substituição de uma prolina por uma leucina. Apesar do códon 249 ser responsável pela maior parte das mutações do *TP53* no CHC, ele não é o único sítio 'hotspot' de mutação neste tipo de tumor. Vários estudos têm observado a presença de mutações em códons adjacentes (DENISSENKO et al., 1998; SMELA et al., 2001). Aguilar, Hussain e Cerutti (1993) encontraram *in vitro* mutações na segunda base do códon 250 (CCC→CTC), semelhantes às encontradas no estudo. Kirk e colaboradores (2005) também encontraram mutações em códons adjacentes: cinco mutações no códon 250 (três CTC e duas TCC, semelhantes às encontradas na presente investigação), uma no códon 248 e outra no códon 254. Denissenko e colaboradores (1998) e Benassutti e colaboradores (1988) mostraram que, além dos adutos formados no códon 249, a AFB1 pode produzir adutos em outras guaninas dos exons 5 a 8 do gene *TP53*. Denissenko e colaboradores (1999) observaram que os adutos são detectados, preferencialmente, nas seqüências de dinucleotídeos GG, sendo a segunda guanina o sítio de maior ligação da AFB1. Encontraram também que nas seqüências senso os danos mais significativos foram observados no códon 249 (AGG), enquanto nas seqüências anti-senso, os sítios de maior ligação da AFB1 foram os códons 250,

248, 247 e 244. Segundo este autor, o códon 250 (GGG) foi um importante sítio de danos ao DNA. Considerando que a mutação no códon 250 tenha sido causada pela AFB1, o estudo encontrou uma frequência de 24% de mutações causadas por esta micotoxina nos pacientes com CHC. Essa prevalência de mutações ser-249 e ser-250 ou leu-250, possivelmente associadas à exposição às aflatoxinas, indica uma moderada exposição no Espírito Santo.

## 6.5 COMENTÁRIOS SOBRE O MÉTODO RFLP NA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO SER-249 *TP53*

As quatro mutações no códon 250 encontradas no estudo alteram o sítio de restrição da enzima *HaeIII* (GGCC), usada nos estudos de detecção da mutação ser-249. Este fato leva a admitir que resultados de algumas investigações, que utilizaram somente o método de RFLP e se referem apenas à presença da mutação ser-249, contenham também mutações no códon 250.

Aliás, a pesquisa da mutação ser-249 *TP53* somente pelo RFLP pode gerar resultados superestimados. Como visto nos resultados aqui apresentados, há uma grande quantidade de casos falso-positivos. O método de RFLP mostrou sensibilidade alta, detectando a mutação em todos os casos positivos no sequenciamento. No entanto, o número de falso-positivos foi alto. O valor preditivo positivo (VPP) para o RFLP foi de 0,625, considerando apenas os fragmentos de intensidade média a forte (probabilidade de encontrar resultados falso-positivos ou PFP = 37,5%), enquanto o VPP para o RFLP considerando todos os fragmentos observados foi de 0,33, gerando valor muito elevado de resultados falso-positivos (PFP = 67%). A grande quantidade de falso-positivos deve estar relacionada à digestão parcial dos produtos amplificados pela PCR. Nos relatos da literatura, resultantes de investigações que utilizaram o RFLP e o sequenciamento, não há nenhum comentário sobre a comparação dos dois métodos.

A análise pelo RFLP possui ainda um outro aspecto limitante que é a interpretação subjetiva dos fragmentos obtidos após a digestão. Neste trabalho, foram encontrados fragmentos não digeridos (indicativos da mutação ser-249) de

intensidades variadas, que, caso não fossem confirmados com o sequenciamento, poderiam gerar resultados bem distintos, dependendo da interpretação.

Com base nos resultados do presente estudo, mostrando baixa especificidade do RFLP para identificar a mutação ser-249 *TP53*, não se recomenda a utilização do método isoladamente para a detecção dessa mutação. Recomenda-se o RFLP como método de rastreamento, seguido do sequenciamento de todas as amostras que apresentarem fragmentos indicativos da presença da mutação.

## 6.6 COMENTÁRIOS SOBRE OS INICIADORES UTILIZADOS PARA DETECTAR O DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B NAS AMOSTRAS DE CHC

Com a existência de múltiplos genótipos do VHB (A-H) e cada um deles com uma distribuição geográfica característica, faz-se necessário o uso de iniciadores capazes de detectar os genótipos encontrados na população de interesse (GANEM; PRINCE, 2004). Com isso, optou-se por usar um maior número de iniciadores (seis pares desenvolvidos durante o projeto) que fossem específicos para o maior número possível de genótipos do VHB, para depois verificar aqueles que demonstrassem os resultados mais satisfatórios. Verificou-se que os iniciadores VHB2 e VHB4 mostraram os resultados mais satisfatórios e são recomendados para detecção do DNA viral, bem como os iniciadores VHB1 e VHB3, que são necessários para a reação de *nested-PCR* com os iniciadores VHB2 e VHB4, respectivamente. Embora os iniciadores VHB5 e VHB6 amplifiquem a região do gene X, conservado entre os membros da família *Hepadnaviridae*, estas regiões não apresentaram boa detecção do DNA do VHB e podem não ser importantes na detecção do vírus.

Dos 19 (46%) casos de CHC onde o DNA viral foi detectado, sete casos eram negativos para o marcador sorológico HBsAg e em quatro casos a sorologia não foi realizada. Nestes sete casos onde o DNA foi detectado na ausência do HBsAg, sugere-se a presença de infecção oculta pelo VHB. Os mecanismos que levam ao surgimento de infecção oculta não são bem esclarecidos, mas acredita-se que seja em resposta a uma forte supressão da replicação viral e de sua expressão gênica, devido à resposta imune do hospedeiro, à co-infecção com outros agentes



infecciosos e/ou a fatores epigenéticos (RAIMONDO et al., 2007). Atualmente, o padrão ouro para a detecção de infecção oculta pelo VHB são as análises com metodologias *in house* utilizando-se a técnica de *nested-PCR* com oligonucleotídeos específicos para, no mínimo, três regiões do genoma do VHB (CACCIOLA et al., 1999; RAIMONDO et al., 2007). Neste estudo, foram utilizados seis pares de iniciadores oligonucleotídeos para três regiões do genoma viral, que foram empregados em reações independentes e em reações *nested-PCR*, resultando em alta sensibilidade na detecção do VHB nas amostras estudadas, detectando todos os casos positivos para o marcador HBsAg, além de outros 11 casos nos quais o HBsAg era negativo ou não foi investigado.

## 6.7 COMENTÁRIOS SOBRE O MÉTODO DE EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO

Quanto à extração do DNA, obtida com a metodologia de extração a partir de tecido tratado com formaldeído e conservado em parafina, os bons resultados aqui apresentados estariam relacionados à otimização da retirada da parafina a partir das lâminas contendo os fragmentos hepáticos. A desparafinização com xilol é mais fácil nas lâminas e o xilol é facilmente removido com os banhos de álcool absoluto. Após a hidratação, tem-se apenas o fragmento hepático, sem resíduos de parafina ou xilol. Em relação à amplificação, os iniciadores escolhidos para amplificar a região de interesse do éxon 7 do gene *TP53* levaram a obtenção de fragmentos de tamanho reduzido, objetivando a melhor amplificação de amostras com DNA possivelmente degradado, devido ao tratamento com formol. O tamanho dos fragmentos amplificados não altera a ação da enzima *HaeIII* quanto à detecção da mutação no seu sítio específico.

## 6.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, a frequência de mutações no éxon 7 do *TP53* encontrada neste estudo – frequência moderada, segundo critério de Stern e colaboradores (2001) – foi inferior a encontrada na China, em Senegal e na Gâmbia. No entanto, esta frequência é maior do que a encontrada em regiões com baixa exposição às

aflatoxinas. Este resultado pode indicar a provável exposição alimentar às aflatoxinas no nosso meio.

São necessárias investigações futuras no sentido de: a) ampliar a investigação da mutação ser-249 em maior número de casos de CHC; b) investigar a mutação ser-249 em nódulos displásicos de fígados cirróticos, para verificar se a mutação é mais freqüente nos casos de cirrose com maior probabilidade de desenvolverem CHC; c) investigar a presença de aflatoxinas e seus adutos em fragmentos hepáticos, no plasma e urina de amostras da população do Espírito Santo, incluindo indivíduos com e sem hepatopatias.

## ***7 CONCLUSÕES***

## 7 CONCLUSÕES

- Observou-se uma prevalência de 15% da mutação ser-249 no gene *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular diagnosticados no Espírito Santo, o que pode ser uma indicação indireta de exposição moderada às aflatoxinas no Estado;
- Foram identificadas quatro mutações no códon 250, consideradas como relacionadas à exposição às aflatoxinas, que, somadas à mutação ser-249, perfazem 24% de mutações no éxon 7 do gene *TP53* relacionadas a estas micotoxinas, o que reforça a hipótese de haver moderada exposição às toxinas do *Aspergillus* no nosso meio;
- Observou-se uma prevalência de 1,5% da mutação ser-249 *TP53* nos pacientes com cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular;
- Não houve relação entre a presença do VHB e a ocorrência da mutação ser-249 *TP53* nos casos de carcinoma hepatocelular;
- Não houve diferença entre a taxa de amplificação e nem na detecção da mutação ser-249 entre amostras de origem de plasma e de fígado;
- O método de PCR-RFLP mostrou baixa especificidade na detecção da mutação ser-249 *TP53*.

## **8 REFERÊNCIAS**

## 8 REFERÊNCIAS

Adamson RH, Correa P, Sieber SM, McIntire KR, Dalgard DW. Carcinogenicity of aflatoxin B1 in rhesus monkeys: two additional cases of primary liver cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1976;57(1):67-78.

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G>T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(18):8586-90.

Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Corrêa B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem.* 2002;50(13):3877-82.

Alves VA, Nita ME, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Wakamatsu A, Lehrbach DM, de Carvalho MF, de Mello ES, Gayotto LC, da Silva LC. p53 immunostaining pattern in Brazilian patients with hepatocellular carcinoma. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(1):25-31.

Andrade AF, Oliveira-Silva M, Silva SG, Motta IJ, Bonvicino CR. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6):673-6.

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73.

Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat.* 2004;11(5):383-93.

Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2001;82(2):77-100.

Bailey EA, Iyer RS, Stone MP, Harris TM, Essigmann JM. Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(4):1535-9.

Bedard LL, Massey TE. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett.* 2006;241(2):174-83.

Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD, Loechler EL. Mapping the binding site of aflatoxin B1 in DNA: systematic analysis of the reactivity of aflatoxin B1 with guanines in different DNA sequences. *Biochemistry.* 1988;27(1):472-81.

Bertolini DA, Pinho JR, Saraceni CP, Moreira RC, Granato CF, Carrilho FJ. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Paraná State, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(8):1083-90.

Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis.* 2007;11(4):685-706.

Brasil, Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos — CNNPA, Resolução N° 34/1976. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de janeiro de 1977.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária — Anvisa, RDC N° 274, 15 de outubro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de outubro de 2002.

Brasileiro Filho G, Pereira FEL, Guimarães RC. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia Geral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 173-234.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350(6317):429-31.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*. 1999;341(1):22-6.

Caldas ED, Silva AC. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *J Agric Food Chem*. 2007;55(19):7974-80.

Campos SG, Cavaglieri LR, Fernández Juri MG, Dalcero AM, Krüger C, Keller LA, Magnoli CE, Rosa CA. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008;92(3):377-83.

Chen CJ, Zhang YJ, Lu SN, Santella RM. Aflatoxin B1 DNA adducts in smeared tumor tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1992;16(5):1150-5.

Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006;295(1):65-73.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994;265(5170):346-55.

Costa LLF, Scussel VM. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;(33):138-144.

Coursaget P, Depril N, Chabaud M, Nandi R, Mayelo V, LeCann P, Yvonnet B. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas from Senegal. *Br J Cancer*. 1993;67(6):1395-7.

Croy RG, Wogan GN. Temporal Patterns of Covalent DNA Adducts in Rat Liver after Single and Multiple Doses of Aflatoxin B1. *Cancer Research*. 1981;(41):197-203.

Deng ZL, Ma Y. Aflatoxin sufferer and p53 gene mutation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 1998;4(1):28-29.

Denissenko MF, Koudriakova TB, Smith L, O'Connor TR, Riggs AD, Pfeifer GP. The p53 codon 249 mutational hotspot in hepatocellular carcinoma is not related to selective formation or persistence of aflatoxin B1 adducts. *Oncogene*. 1998;17(23):3007-14.

Denissenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, Gerber N, Pfeifer GP. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res*. 1999;425(2):205-11.

De Paula VS, Arruda ME, Vitral CL, Gaspar AM. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(8):1123-8.

Dycaico MJ, Stuart GR, Tobal GM, de Boer JG, Glickman BW, Provost GS. Species-specific differences in hepatic mutant frequency and mutational spectrum among lambda/lacl transgenic rats and mice following exposure to aflatoxin B1. *Carcinogenesis*. 1996;17(11):2347-56.

Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994;34:135-72.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):674-87.

Ferreira RC, Teles SA, Dias MA, Tavares VR, Silva SA, Gomes SA, Yoshida CF, Martins RM. Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(6):689-92.

Figueiredo NC, Page-Shafer K, Pereira FEL, Miranda AE. Marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em mulheres jovens atendidas pelo Programa de Saúde da Família em Vitória, Estado do Espírito Santo, 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(6):590-595.

Freire FC, Kozakiewicz Z, Paterson RR. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. *Mycopathologia*. 1999;145(2):95-103.

Freire FC, Kozakiewicz Z, Paterson RR. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*. 2000;149(1):13-9.

Freitas VP, Brigido BM. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. *Food Addit Contam*. 1998;15(7):807-11.

Focaccia R, da Conceição OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenço R, Vieira De Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR, Fischer D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General



Population of the Municipality of São Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis.* 1998;2(6):269-284.

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004;350(11):1118-29.

Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. *Global Cancer Facts & Figures 2007.* Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.

Gaze R, Carvalho DM, Werneck GL. Hepatitis A and B seroprevalence in Macaé, Rio de Janeiro State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2002;18(5):1251-9.

Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1993;17(12):1244-51.

Gonçalez E, Nogueira JH, Fonseca H, Felicio JD, Pino FA, Corrêa B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. *Int J Food Microbiol.* 2008;123(3):184-90.

Gonçalves CS, Pereira FEL, Zago MP, Cirino S. Hepatocellular carcinoma in Espírito Santo state, Brazil: some epidemiological aspects of 96 cases. *Digestive Disease and Sciences.* 1986; 31(n. Supl):100-100.

Gonçalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997;39(3):165-70.

Gonçalves CS, Zago-Gomes MP, Gonçalves PL, Pereira FEL. Carcinoma Hepatocelular. In: LOPES, AC. *Tratado de Clínica Médica, Volume I.* São Paulo: Rocca, 2006, p.1462-1480.

Gonçalves PL, Gonçalves CS, Folleto S, Pereira FEL. Marcadores de infecção do vírus B em doadores de sangue com sorologia positiva para o vírus C da Hepatite. *Gastrenterologia e Endoscopia Digestiva.* 20 (supl): S70, 2001.

Harris AJ, Shaddock JG, Manjanatha MG, Lisenbey JA, Casciano DA. Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats. *Carcinogenesis.* 1998;19(8):1451-8.

Hennigen MR, Dick T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Addit Contam.* 1995;12(5):677-81.

Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P. Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. *Cancer Lett.* 2008;264(2):201-8.

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature.* 1991;350(6317): 427-8.

Huang XH, Sun LH, Lu DD, Sun Y, Ma LJ, Zhang XR, Huang J, Yu L. Codon 249 mutation in exon 7 of p53 gene in plasma DNA: maybe a new early diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in Qidong risk area, China. *World J Gastroenterol*. 2003;9(4):692-5.

Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007;26(15):2166-76.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Hepatitis Viruses, 59. United Kingdom: International Agency for Research on Cancer. 1994. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/allmonos60.php>>. Acesso em set. de 2008.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 82. United Kingdom: International Agency for Research on Cancer. 2002. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>>. Acesso em dez. de 2007>.

INCA. Ministério da Saúde. Câncer de Fígado. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=330](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330)>. Acesso em 20 nov. 2008>.

Jackson PE, Qian GS, Friesen MD, Zhu YR, Lu P, Wang JB, Wu Y, Kensler TW, Vogelstein B, Groopman JD. Specific p53 mutations detected in plasma and tumors of hepatocellular carcinoma patients by electrospray ionization mass spectrometry. *Cancer Res*. 2001;61(1):33-5.

Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, Kensler TW, Qian GS, Groopman JD. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis*. 2003;24(10):1657-63.

Kazachkov Y, Khaoustov V, Yoffe B, Solomon H, Klintmalm GB, Tabor E. p53 abnormalities in hepatocellular carcinoma from United States patients: analysis of all 11 exons. *Carcinogenesis*. 1996;17(10):2207-12.

Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. 2003;23(6):405-9.

Kimbi GC, Kew MC, Yu MC, Arakawa K, Hodkinson J. 249 ser p53 mutation in the serum of black southern African patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(8):1185-90.

Kirby GM, Batist G, Fotouhi-Ardakani N, Nakazawa H, Yamasaki H, Kew M, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA. Allele-specific PCR analysis of p53 codon 249 AGT transversion in liver tissues from patients with viral hepatitis. *Int J Cancer*. 1996;68(1):21-5.

Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trépo C, Bréchet C, Hainaut P, Montesano R. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from the Gambia. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(2):148-53.

Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, Szymańska K, Whittle H, Goedert JJ, Hainaut P, Montesano R. 249 (ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2005;24(38):5858-67.

Korba BE, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Tennant BC, Popper H, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks: presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology.* 1989;9(3):461-70.

Kubicka S, Trautwein C, Schrem H, Tillmann H, Manns M. Low incidence of p53 mutations in European hepatocellular carcinomas with heterogeneous mutation as a rare event. *J Hepatol.* 1995;23(4):412-9.

Lasky T, Magder L. Hepatocellular carcinoma p53 G > T transversions at codon 249: the fingerprint of aflatoxin exposure? *Environ Health Perspect.* 1997;105(4):392-7.

Lawrence CW, Borden A, Banerjee SK, LeClerc JE. Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(8):2153-7.

Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene.* 2006;25(27):3778-86.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88 (3):323-31.

Lleonart ME, Kirk GD, Villar S, Lesi OA, Dasgupta A, Goedert JJ, Mendy M, Hollstein MC, Montesano R, Groopman JD, Hainaut P, Friesen MD. Quantitative analysis of plasma TP53 249 Ser-mutated DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(12): 2956-62.

Lunn RM, Zhang YJ, Wang LY, Chen CJ, Lee PH, Lee CS, Tsai WY, Santella RM. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res.* 1997;57(16):3471-7.

Maia PP, Pereira Bastos de Siqueira ME. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. *Food Addit Contam.* 2002;19(12):1180-3.

Michielsen PP, Francque SM, van Dongen JL. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2005;3:27.

Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology.* 2002; 36(5):1214-20.

Misra RP, Muench KF, Humayun MZ. Covalent and noncovalent interactions of aflatoxin with defined deoxyribonucleic acid sequences. *Biochemistry*. 1983;22(14):3351-9.

Molina J, Bartolomé J, Moraleta G, Ruiz-Moreno M, Rua MJ, Moreno A, Carreño V. Persistence of hepatitis B virus DNA after reduction of viral replication in serum and liver. *J Med Virol*. 1992;38(1):11-5.

Moncada C. Aductos, Mecanismos Patogênicos. *Gastr Latinoam*. 2002; 13, Monografia nº 1: 37-39.

Monroe DH, Eaton DL. Effects of modulation of hepatic glutathione on biotransformation and covalent binding of aflatoxin B1 to DNA in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988;94(1):118-27.

Montesano R, Hainaut P, Wild CP. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(24):1844-51.

Motta-Castro AR, Yoshida CF, Lemos ER, Oliveira JM, Cunha RV, Lewis-Ximenez LL, Cabello PH, Lima KM, Martins RM. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):13-7.

Nascimento MC, Mayaud P, Sabino EC, Torres KL, Franceschi S. Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. *J Med Virol*. 2008;80(1):53-7.

Newberne PM, Butler WH. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res*. 1969;29(1):236-50.

Newberne PM. Experimental hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 1976;36:2573-8.

Ng IO, Srivastava G, Chung LP, Tsang SW, Ng MM. Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people. *Cancer*. 1994;74(1):30-7.

Nogueira, JA. Mutação pontual do códon 249 do TP53 no carcinoma hepatocelular. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 1992;52(22):6358-64.

Oliveira CAF, Germano PML. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Rev. Saúde Pública*. 1997;31 (4):417-24.

Oliveira GR, Ribeiro JM, Fraga ME, Cavaglieri LR, Direito GM, Keller KM, Dalcero AM, Rosa CA. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins,

fumonisin and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 2006;162(5):355-62.

Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*. 2006;23(2):196-201.

Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromentel CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther*. 2009;16(1):1-12.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.

Pelição, FS. Avaliação custo-efetividade da utilização de um teste rápido para pesquisa de anticorpos contra o core do vírus da hepatite B (anti-HBc) na triagem de doadores de sangue em serviços de hemoterapia. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

Peng XM, Peng WW, Yao JL. Codon 249 mutations of p53 gene in development of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 1998;4(2):125-127.

Peng XM, Yao CL, Chen XJ, Peng WW, Gao ZL. Codon 249 mutations of p53 gene in non-neoplastic liver tissues. *World J Gastroenterol*. 1999;5(4):324-326.

Pereira FE, Boni ES, Castro Filho AK, Leal Filho J. Frequência de carcinomas primitivos do fígado em 907 necrópsias realizadas em Vitória, ES. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1977; 23: 421-422.

Pereira FE, Gonçalves CS, Boni ES. The association of hepatitis B surface antigen (HBsAg) with hepatocellular carcinoma in Espírito Santo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1981;14(4-5):277-80.

Pereira FE, Gonçalves CS, Zago Mda P. The effect of ethanol intake on the development of hepatocellular carcinoma in HBsAg carriers. *Arq Gastroenterol*. 1994;31(2):42-6.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-65.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999;83(1):18-29.

Pitt JI. Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*. 2000;56(1):184-92.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2007;46(1):160-70.

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215-29.

Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(4):262-7.

Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Henderson BE. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 1992;339(8799):943-6.

Sabino M, Prado G, Inomata EI, Pedroso Mde O, Garcia RV. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. *Food Addit Contam.* 1989;6(3):327-31.

Sargeant K, Sheridan A, O'Kelly J, Carnaghan RBA. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature.* 1961;(192): 1096-97.

Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(6):981-4.

Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res.* 1992;52(6):1635-8.

Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):143-54.

Sheu JC, Huang GT, Lee PH, Chung JC, Chou HC, Lai MY, Wang JT, Lee HS, Shih LN, Yang PM, et al. Mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res.* 1992;52(21):6098-100.

Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(3):211-8.

Shimizu Y, Zhu JJ, Han F, Ishikawa T, Oda H. Different frequencies of p53 codon-249 hot-spot mutations in hepatocellular carcinomas in Jiang-Su province of China. *Int J Cancer.* 1999;82(2):187-90.

Simonato LE, Garcia JF, Nunes CM, Miyahara GI. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. *Bras Patol Med Lab.* 2007;43(2):121-127.

Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2001;22(4):535-45.

Sohn S, Jaitovitch-Groisman I, Benlimame N, Galipeau J, Batist G, Alaoui-Jamali MA. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat Res.* 2000;460(1):17-28.

Soini Y, Chia SC, Bennett WP, Groopman JD, Wang JS, DeBenedetti VM, Cawley H, Welsh JA, Hansen C, Bergasa NV, Jones EA, DiBisceglie AM, Trivers GE, Sandoval CA, Calderon IE, Munoz Espinosa LE, Harris CC. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis*. 1996;17(5):1007-12.

Souto FJD, Espírito Santo GA, Philippi JC, Pietro BRC, Azevedo RB, Gaspar AMC. Prevalência e fatores associados a marcadores do vírus da hepatite B em população rural do Brasil central. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2001;10(6).

Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003;21(3):201-16.

Stern MC, Umbach DM, Yu MC, London SJ, Zhang ZQ, Taylor JA. Hepatitis B, aflatoxin B(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(6):617-25.

Strzelecki EL, Cader-Strzelecka B. A survey of aflatoxin levels in peanut meal imported into Poland for animal feedingstuffs. *Food Addit Contam*. 1988;5(4):597-9.

Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, Wang J, Wu Y, Liu G, Wu Y, Zhu Y. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology*. 1999;30(2):379-83.

Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, Li KC, Chan HL. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(9):1067-77.

Vargas EA, Preis RA, Castro L, Silva CM. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Addit Contam*. 2001;18(11):981-6.

Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(4):808-14.

Volkman M, Hofmann WJ, Müller M, Räh U, Otto G, Zentgraf H, Galle PR. p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene*. 1994;9(1):195-204.

Volpini AC, Marques MJ, Lopes dos Santos S, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):815-8.

Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3325-33.

Wild CP, Jiang YZ, Allen SJ, Jansen LA, Hall AJ, Montesano R. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. *Carcinogenesis*. 1990;11(12):2271-4.

Wogan GN, Paglialunga S, Newberne PM. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food Cosmet Toxicol*. 1974;12(5-6):681-5.

Wogan GN. Aflatoxin risks and control measures. *Fed Proc*. 1968;27(3):932-8.

Wright TL, Lau JY. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet*. 1993;342(8883):1340-4.

Yang M, Zhou H, Kong RY, Fong WF, Ren LQ, Liao XH, Wang Y, Zhuang W, Yang S. Mutations at codon 249 of p53 gene in human hepatocellular carcinomas from Tongan, China. *Mutat Res*. 1997;381(1):25-9.

Yokosuka O, Omata M, Zhou YZ, Imazeki F, Okuda K. Duck hepatitis B virus DNA in liver and serum of Chinese ducks: integration of viral DNA in a hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(15):5180-4.

Yu MW, Lien JP, Chiu YH, Santella RM, Liaw YF, Chen CJ. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J Hepatol*. 1997;27(2):320-30.

Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology*. 1993;17(4):538-44.



***APÊNDICES***

## APÊNDICE A – Tabela 10

Tabela 10 - Prevalência da infecção pelo VHB em pacientes com carcinoma hepatocelular em diferentes regiões do mundo

Local	Amostra/Método	Resultado (%)	Referência
Alemanha	20 amostras/ HBsAg	20	KUBICKA et al., 1995
<b><u>Espírito Santo, Brasil</u></b>	41 amostras de CHC (1) e 74 amostras de CH (2)/ PCR e <i>Nested</i> -PCR	(1) 46; (2) 32	<b><u>Presente investigação</u></b>
EUA	37 amostras/ <i>Nested</i> -PCR	14	GOLDBLUM et al., 1993 #
Europa	22 amostras/ HBsAg	32	VOLKMANN et al., 1994
Europa	50 amostras de CHC (1) e 10 amostras de CH (2)/ HBsAg	(1) 42; (2) 30	KIRK et al., 2000
Gâmbia	88 amostras de CHC (1), 42 cirrose (2) e 125 controles (3)/ HBsAg	(1) 58; (2) 55; (3) 16	LLEONART et al., 2005
Gâmbia	175 amostras de CHC (1), 98 cirrose (2) e 345 controles (3)/ HBsAg e HBeAg	(1) 58; (2) 55; (3) 14	KIRK et al., 2005
Guangxi, China	HbsAg	94,4	DENG; MA, 1998
Guangxi	38 amostras/ HBsAg	74	STERN et al., 2001
Hong Kong, China	31 amostras/ HBsAg	90,3	NG et al., 1994
Jiang-Su, China	14 amostras/ HBsAg	86	SHIMIZU et al, 1999
México	20 amostras/ HBsAg e HBcAg	55	SOINI et al., 1996
Qidong, China	25 amostras de CHC (1), 20 cirrose (2) e 30 controles (3)/ HBsAg	(1) 84; (2) 65; (3) 13	HUANG et al., 2003
São Paulo, Brasil	74 amostras/ PCR em tempo real	16	NOGUEIRA, 2007
Taiwan	105 amostras de CHC (1) e 37 controles (2)/ HBsAg	(1) 74; (2) 30	LUNN et al., 1997
Taiwan	61 amostras/ HBsAg	67	SHEU et al., 1992
Tongan, China	16 amostras/ HBsAg	80	YANG et al., 1997

# Dados obtidos do resumo do trabalho.

## APÊNDICE B – Tabela 11

Tabela 11 - Prevalência da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática provenientes de regiões expostas a diferentes níveis de aflatoxina

(continua)

Local	Amostra/Método	Prevalência da mutação	Referência
<b>ALTA EXPOSIÇÃO ÀS AFLATOXINAS</b>			
África (sul)	158, 20 e 9 amostras de plasma de CHC (1), CH (2) e controles (3)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 18%; (2) 0%; (3) 5%	KIMBI et al., 2005
China (sul)	10 e 5 amostras de tecido tumoral (1) e CH (2)/ PCR-SSCP e sequenciamento	(1) 65% (2) 100%	PENG et al., 1999
Gâmbia	53, 13 e 53 amostras de plasma de CHC (1), CH (2) e controles (3)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 36%; (2) 15%; (3) 6%	KIRK et al., 2000
Gâmbia	186, 98 e 348 amostras de plasma de CHC (1), CH (2) e controles (3)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 40%; (2) 15,3%; (3) 3,5%	KIRK et al., 2005
Guangdong, China	70 amostras de tecido tumoral/ PCR-RFLP	33%	PENG; PENG; YAO, 1998
Guangxi, China	107 amostras de tecido tumoral/ PCR-RFLP (1) e sequenciamento (2)	(1) 69%; (2) 57%	DENG; MA, 1998
Guangxi, China	50 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento	36%	STERN et al., 2001
Jiang-Su, China	16 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento*	56%	SHIMIZU et al., 1999
Moçambique	6 amostras de tecido não-tumoral/ PCR alelo específico (AS-PCR)	83%	KIRBY et al, 1996 #
Qidong, China	25, 20 e 30 amostras de plasma de CHC (1), CH (2) e controles (3)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 40%; (2) 20%; (3) 7%	HUANG et al., 2003
Qidong, China	36 amostras de tecido tumoral/ PCR-RFLP e sequenciamento*	58%	SCORSONE et al., 1992

Tabela 11 - Prevalência da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática provenientes de regiões expostas a diferentes níveis de aflatoxina

Local	Amostra/Método	Prevalência da mutação	Referência (continuação)
Senegal	15 amostras de tecido tumoral	67%	COURSAGET et al., 1993 #
Tongan, China	21 amostras de tecido tumoral/ PCR-RFLP e sequenciamento	33%	YANG et al., 1997
<b>EXPOSIÇÃO MODERADA ÀS AFLATOXINAS</b>			
Hong Kong, China	26 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento*	8%	NG et al., 1994
México	16 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento*	19%	SOINI et al., 1996
São Paulo, Brasil	74 amostras de tecido tumoral (1) e 17 de tecido não-tumoral (2)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 28%; (2) 0%	NOGUEIRA, 2007
Taiwan	100 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento*	12%	LUNN et al., 1997
Taiwan	61 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento*	7%	SHEU et al., 1992
<u>Espírito Santo, Brasil</u>	41 e 74 amostras de tecido tumoral (1) e CH (2) / PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 15%; (2) 1,5%	<b><u>Presente investigação</u></b>
<b>BAIXA EXPOSIÇÃO ÀS AFLATOXINAS</b>			
Alemanha	20 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento	0%	KUBICKA et al., 1995
Egito	76 amostras de plasma (1) e 20 de tecido tumoral (2)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 1,3%; (2) 10%	HOSNY et al., 2008
EUA	37 amostras de tecido tumoral	11%	GOLDBLUM et al., 1993 #
EUA	12 amostras de tecido tumoral/ SSCP e sequenciamento	0%	KAZACHKOV et al., 1996

Tabela 11 - Prevalência da mutação ser-249 *TP53* em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática provenientes de regiões expostas a diferentes níveis de aflatoxina

<b>Local</b>	<b>Amostra/Método</b>	<b>Prevalência da mutação</b>	<b>Referência</b> (conclusão)
EUA	Amostras de tecido de CH/ PCR alelo específico (AS-PCR)	0%	KIRBY et al., 1996 #
Europa	19 amostras de tecido tumoral/ Sequenciamento	5%	VOLKMANN et al., 1994
Europa	50 e 10 amostras de plasma de CHC (1) e CH (2)/ PCR-RFLP e sequenciamento	(1) 0% (2) 0%	KIRK et al., 2000
Japão	128 amostras de tecido tumoral/ SSCP e sequenciamento	3%	ODA et al., 1992

\* Foi empregado a metodologia de sequenciamento manual, enquanto nos demais trabalhos foi usado sequenciamento automatizado.

# Dados obtidos a partir do resumo do trabalho.

Nota: CHC = carcinoma hepatocelular e CH = cirrose hepática.

***ANEXO***

## ANEXO – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 29 de novembro de 2007

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

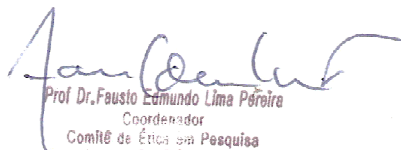
Para: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro  
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Análise Molecular do Gene TP53 (Codon 249) em Pacientes com Carcinoma Hepatocelular”**

Senhor Pesquisador,

Informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Protocolo de Pesquisa, **No. de Registro no CEP-107/07**, intitulado: **“Análise Molecular do Gene TP53 (Codon 249) em Pacientes com Carcinoma Hepatocelular”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 28 de novembro de 2007.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro Biomédico/UFES

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)