

ESTUDOS MOLECULARES NA TUMORIGÊNESE GÁSTRICA

PATRÍCIA JEANNE DE SOUZA MENDONÇA

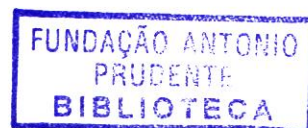
Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a.
MARIA RITA PASSOS BUENO

CO-ORIENTADOR: PROF^o. DR.
ANDREW JOHN GEORGE SIMPSON

São Paulo
2003



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Mendonça, Patrícia Jeanne de Souza

Estudos moleculares na tumorigênese gástrica / Patrícia Jeanne de Souza
Mendonça -- São Paulo, 2003.

58 p.

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Rita Passos Bueno

Descritores: 1. NEOPLASIAS GÁSTRICAS. 2. BIOLOGIA MOLECULAR.
3. PERDA DE HETEROZIGOSIDADE. 4. POLIMORFISMO DE UM UNICO
NUCLEOTIDIO.

“Não é suficiente ter um sonho, a menos que estejamos decididos a realizá-lo. Não é suficiente saber o certo, a menos que sejamos forte o bastante para fazê-lo. Não é suficiente aprender a verdade, a menos que aprendamos a vivê-la. Não é suficiente conseguir o amor, a menos que nos importemos o bastante em oferecê-lo. Os homens determinados a achar um caminho para si próprios, sempre encontrarão oportunidades suficientes; e se eles não as encontrarem, eles as criarão.”

Samuel Smiles

Aos meus pais Francisco e Edwiges

Ao meu esposo Márcio

À minha orientadora Maria Rita.



AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Rita Passos Bueno pela orientação e dedicação incomensurável; por ter me recebido com tanta afabilidade; por ter me dado a oportunidade em trabalhar em seu grupo de pesquisa e pelos valiosíssimos conselhos.

Ao Dr. Andrew Simpson pela oportunidade e confiança e pela orientação sempre acompanhada de brilhantes sugestões.

À Dra. Maria Lúcia Harada pelo eterno incentivo e apoio; pelo fornecimento das amostras de seu Banco de Tumores Gástricos e pela preciosa amizade.

Ao Dr. Rommel Burbano pelos primeiros ensinamentos na área de oncologia; pelo incentivo e amizade.

Ao Dr. Fernando Soares pela disponibilidade e interesse em ajudar sempre, especialmente, nas microdissecções das amostras.

À Dra. Otávia Cabalero e Dr. André Vetore por todos os conselhos dados e dúvidas esclarecidas.

À Eliane pela simpatia, presteza e eficiência.

Ao Carlinhos e Miyuki pela preparação de cortes histológicos e lâminas para microdissecção.

À Valéria Paixão pela disposição e prontidão em todos os momentos necessários; por seu alto-astrol que sempre passa sentimentos bons.

À Maria Cristina e Vanessa pelo importante apoio técnico e amizade.

À Ana Maria e Márcia pela excelente organização desta Pós-Graduação e pela memorável atenção e carinho fornecidos.

Às amigas Favia Errera e Fernanda pela ajuda na padronização das técnicas de SNUPE e Microsatélites, respectivamente.

Aos amigos Carlos, Oscar e, novamente, Flavia Errera pela constante troca de idéias e pela companhia nos fins-de-semana, feriados e noitadas no laboratório.

À amiga Eloísa por toda amizade demonstrada, toda a atenção fornecida, todos os conselhos dados e pelo incentivo e confiança.

Às amigas Lucia, Cibele e Roseli pela amizade, carinho e compreensão.

Ao Todd pela boa vontade em esclarecer nossas dúvidas de bioquímica; pela descontração gerada nos momentos de maior tensão ou esgotamento e pela amizade.

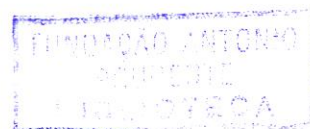
Aos colegas de laboratório Daniel, Roberto, Fernanda, Flávia Errera, Oscar, Guilherme, Dinamar, Carlos, Alessandra Splendore, Lucia, Cibele, Kelly, Todd, Eloísa, Roseli, Agnes, Andréia, Manuela, Camila, Alessandra Starling, Antônia, Constância, Dulci, Kikue, Marta pela boa convivência e pelos bons momentos vividos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

À meu pai e às minhas irmãs pelo eterno incentivo e apoio.

Ao Márcio pelo amor e carinho, pelo apoio nos momentos mais difíceis e por me compreender em todos os momentos

À minha mãe pelo amor dedicado em toda minha vida, pela força que me passa, por me ensinar a lutar e enxergar além, por ser meu símbolo de garra e virtude.



RESUMO

Mendonça-Mattos PJS. **Estudos moleculares na tumorigênese gástrica**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer gástrico apresenta uma alta taxa de mortalidade devido à ausência de sintomas clínicos em seus estágios iniciais e ao conseqüente diagnóstico tardio da doença. Além disso, a gastrectomia permanece como único tratamento curativo da doença. Portanto, a compreensão da biologia deste tumor e o desenvolvimento de testes que permitam uma detecção mais precoce do tumor poderão contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes. Os objetivos gerais da presente dissertação foram: a) caracterizar a região 8p22 em tumores gástricos da população brasileira; b) verificar se o polimorfismo D104N do *COL18A1* (região endostatina) está associado com o desenvolvimento de tumores gástricos. A região 8p22 é freqüentemente deletada em tumores como os de bexiga, próstata, ovário, estômago, colorretal, fígado e pulmão entre outros. Estudos de heterozigosidade em 8p22 demonstraram elevadas taxas de perda alélica, sugerindo a presença de gene supressor de tumor nesta região. Em 2000, Baffa *et al.* delimitaram uma região mínima de deleção de cerca de 1Mb entre os marcadores LPL-3' e D8S258 em adenocarcinomas gástricos. Em 2001, Vecchione *et al.* sugeriram que o gene FEZ1, mapeado neste intervalo, seria o gene supressor candidato para adenocarcinoma gástrico. No presente trabalho, analisamos os marcadores D8S261, LPL, D8S258 e D8S282 em 48 amostras de adenocarcinoma provenientes do Pará e 18 amostras de São Paulo. Detectamos perda alélica em 31% e 50% dos casos estudados, respectivamente, confirmando, portanto, que esta região é candidata a conter um gene supressor a este tipo de câncer. Foram identificadas duas regiões de deleção: (i) uma envolvendo o marcador D8S261, porém ainda não foi possível delimitarmos a região distal desta deleção; (ii) a outra entre LPL-D8S258, confirmando os dados anteriores. Uma vez que foi possível delimitar esta região tanto na sua região distal como proximal, realizamos uma análise *in silico* para verificar quais os genes localizados entre estes marcadores. Identificamos 3 genes e 2 clusters de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Apenas o

gene LZTS1/FEZ1 é um candidato funcional e deverá ser analisado, principalmente nas amostras que apresentaram perda alélica. Em relação (ou Por outro lado) aos clusters de ESTs, estes devem ser validados e caracterizados para verificar-se se correspondem a novos genes. Quanto aos genes de susceptibilidade, Iughetti et al. (2000) analisaram o polimorfismo D104N no gene *COL18A*, na região que codifica a endostatina, em uma amostra de adenocarcinomas de próstata e de controles normais. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que os portadores da variante 104N devem ter um aumento em cerca de 2,5 vezes a desenvolver carcinoma de próstata. Como a angiogênese é um processo crucial para o desenvolvimento da grande maioria de tumores de tecidos sólidos, julgou-se importante verificar se este polimorfismo se encontra em uma frequência elevada em indivíduos com câncer de estômago. Esta avaliação foi realizada através de duas estratégias de detecção de polimorfismos (enzimas de restrição e SNUPE) em pacientes com câncer gástrico da população do Pará e em indivíduos controles. A frequência do polimorfismo D104N foi maior em controles (17%) do que na amostra de afetados (6%). O resultado do teste exato de Fisher sugere que a presença do polimorfismo D104N do colágeno XVIII é um evento independente do desenvolvimento de tumores gástricos ($p=0,0854$), contudo, será importante analisá-lo em uma amostra maior para confirmarmos estes resultados.

ABSTRACT

Mendonça-Mattos PJS. **Estudos moleculares na tumorigênese gástrica** [Molecular studies in gastric cancer]. São Paulo; 2003 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Gastric cancer shows high rates of mortality due to absence of clinical symptoms in early stages and to the late diagnosis. Moreover, gastrectomy remains the only healing treatment of this disease. Thus, biology understanding of this tumor and the development of methods for its early detection could help to a better prognosis of those patients. The essential aims of this dissertation were: (i) to characterize 8p22 region in gastric tumors of Brazilian people; (ii) to find out if D104N polymorphism of COL18A1 (endostatin's region) is associated with gastric tumors development. 8p22 is a frequently deleted region in several tumors involving various tissues like bladder, prostate, ovarian, gastric, colorectal, liver, lung and so on. Loss of heterozygosity studies in 8p22 shows high rates of allelic loss, suggesting this region harbors a tumor suppressor gene. Baffa *et al.* (2000) delineate a deletion map within an 1Mb segment flanked by *LPL* and *D8S258* in gastric adenocarcinoma. Vecchione *et al.* (2001) proposed that FEZ1 gene, mapped in this region, is the tumor suppressor gene involved in gastric tumorigenesis. We analyzed loci D8S261, *LPL*, *D8S258* and *D8S282* in 48 gastric adenocarcinomas, originated from Pará and 18 cases from São Paulo. We found allelic loss in 31% and 50% cases, respectively. Thus, proving this region is candidate to harbor a tumor suppressor gene in this kind of cancer. We identified two deletion regions: (i) the first one is involving locus D8S261, however we couldn't delimitate its distal side; (ii) the latter region is between *LPL*-*D8S258*, corroborating to the previous data. As it was possible to delimitate this region in its distal and proximal side, we made *in silico* analyses to verify which gene is located between those loci. We identified 3 genes and 2 ESTs clusters. Only FEZ1 gene is a functional candidate and must be analyzed, specially in cases that showed allelic loss. On the other hand, ESTs cluster should be validated and characterized to verify if they correspond to new genes. In regard to susceptibility genes, Iughetti *et*

al.(2001) investigated D104N polymorphism, located at COL18A1 gene in prostate cancer cases and in controls. COL18A1 encodes endostatin, a potent angiogenesis inhibition. Their results suggested that D104N variant carriers have 2.5 more chances to develop prostate carcinoma than the normal population. As angiogenesis is a crucial event in the development of the majority of the solid tumors, we judged very important to verify if this polymorphism shows high rates in gastric cancer patients. This examination was realized by two methods of polymorphisms detection (restriction enzymes and SNUPE) in gastric cancer patients and in normal people from Pará. This polymorphism frequency was higher in controls (17%) than in patients (6%). Fisher's test suggest that the presence of the D104N polymorphism is an independent event in the development of gastric cancer ($p=0.0854$). However, it is important to analyze it in more samples to confirm these results.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Regiões Candidatas delimitadas por vários estudos em vários tumores, incluindo LPL-3'-D8S282.
- Figura 2** Representação ilustrativa da distância existente entre os marcadores estudados em Megabases (Mb).
- Figura 3** Representação ilustrativa de amostras classificadas como indefinidas.
- Figura 4** Exemplos de amostras apresentando instabilidade de microssatélite (MSI).
- Figura 5** Representação ilustrativa de amostras com LOH.
- Figura 6** Representação ilustrativa do estudo de LOH realizado na população do Pará.
- Figura 7** Representação ilustrativa do estudo de LOH realizado na população de São Paulo.
- Figura 8** Representação ilustrativa da região estudada D8S261-D8S258.
- Figura 9** - Representação ilustrativa de um homozigoto e um heterozigoto para o SNP D104N do COL18A1 através de SNUPE.
- Figura 10.** Representação ilustrativa de homozigotos – DD (1,2,3,6,7 e 9) e heterozigotos – DN (4,5, 8 e 10) por digestão enzimática.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentrações dos Reagentes Utilizados nas PCRs

Tabela 2 Ciclagens utilizadas nas PCRs.

Tabela 3 Resultados obtidos através da microdissecção, contendo tipo histológico de cada amostra de câncer gástrico obtidas da população de Belém.

Tabela 4 Resultados obtidos através da microdissecção, contendo tipo histológico de cada amostra de câncer gástrico obtidas da população de São Paulo.

Tabela 5 Tabela das Taxas de LOH obtidas nas populações do Pará e de São Paulo à partir dos marcadores D8S261, LPL, D8S258 e D8S282.

Tabela 6 Representação das taxas de LOH(%) obtidas em adenocarcinomas gástricos

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>“Adenomatosis Polyposis Coli”</i>
CG	Nomenclatura utilizada nas amostras da população do Pará.
CGL	Nomenclatura utilizada nas amostras da população de São Paulo.
DCC	<i>“Deleted In Colorectal Cancer”</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
hMLH1	<i>“Human MutL Homolog 1”</i>
GDB	<i>“The Genome Database”</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOH	Perda de heterozigosidade.
LZTS1	<i>“Leucine zipper tumor suppressor gene 1”</i>
MSI	Instabilidade de microssatélites.
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SNuPE	<i>“Single Nucleotide Primer Extension”</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular.
TGF	Fator de crescimento transformante

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer Gástrico.....	1
1.1.1	Histologia do Câncer Gástrico.....	2
1.1.1.1	Adenocarcinoma do Tipo Intestinal.....	2
1.1.1.2	Adenocarcinoma do Tipo Difuso.....	3
1.1.2	Tratamento e Prognóstico do Câncer Gástrico.....	4
1.2	A Genética Dos Tumores Gástricos.....	4
1.2.1	Genes Envolvidos no Desenvolvimento de Tumores Gástricos.....	5
1.2.1.1	Proto-Oncogenes Em Tumores Gástricos.....	6
1.2.1.2	Os Genes De Reparo Em Tumores Gástricos.....	7
1.2.1.3	Genes Supressores Em Tumores Gástricos.....	7
1.2.1.4	Cromossomo 8.....	9
1.2.2	Genes de Susceptibilidade.....	13
1.2.2.1	A Endostatina.....	14
2	OBJETIVOS PROPOSTOS.....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1	Amostras.....	18
3.1.1	População do Pará.....	18
3.1.2	População de São Paulo.....	18
3.2	Microdissecção.....	19
3.3	Extração de DNA	19
3.4	Quantificação do DNA.....	19
3.5	Análise de Microsatélites e Determinação de Perda de Heterozigosidade.....	20
3.6	Identificação <i>In Silico</i> de Transcritos da Região Candidata.....	23
3.7	Análise do Polimorfismo D104N do Gene	

	do Colágeno XVIII (Col18A1).....	24
3.7.1	Digestão Enzimática.....	24
3.7.2	SNuPE.....	25
3.8	Questões Éticas.....	26
3.9	Análise Estatística.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Amostras.....	28
4.2	Análise dos microssatélites em amostras de pacientes com câncer gástrico.....	31
4.2.1	População do Pará.....	32
4.2.2	População de São Paulo.....	38
4.3	Delimitação da Região Candidata.....	40
4.4	Identificação <i>in silico</i> dos genes contidos nas regiões candidatas.....	41
4.5	Endostatina.....	41
4.5.1	Análise do Polimorfismo D104N.....	41
5	DISCUSSÃO.....	45
5.1	Taxas de LOH em tumores gástricos do tipo difuso e em tumores gástricos do tipo intestinal.....	45
5.2	Taxas de LOH obtidas comparadas às descritas na literatura.....	46
5.3	Região Crítica.....	47
5.4	Polimorfismo D104N da Endostatina.....	51
6	CONCLUSÕES FINAIS.....	52
6.1	Região 8p.....	52
6.2	Polimorfismo D104N da Endostatina.....	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico está entre os tumores de maior incidência no mundo, especialmente em países em desenvolvimento como Costa Rica e Brasil. Em alguns países, como China, Chile e Japão, os altos índices de prevalência associados ao mau prognóstico tornam esta doença um sério problema de saúde pública⁶²

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2002, o registro de aproximadamente 20.420 casos novos e 11.070 óbitos decorrentes de câncer gástrico (<http://www.inca.org.br/>). Esta alta taxa de mortalidade pode ser atribuída em parte ao diagnóstico tardio da doença devido à ausência de sintomas clínicos em seus estágios iniciais⁵¹. Geralmente, quando este diagnóstico de carcinoma gástrico é estabelecido, apresenta-se em um estágio avançado (estádio III ou IV), incurável em mais de 2/3 dos casos em regiões não endêmicas e uma sobrevida média de apenas 16 meses^{9,24}.

Em algumas regiões endêmicas como o Japão, que utiliza protocolos de triagem em massa, uma maior taxa de diagnóstico de cânceres gástricos em estágios iniciais tem sido observada; conseqüentemente, a sobrevida dos pacientes com cânceres gástricos é maior⁹. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que permitam a identificação destes tumores em estágios precoces é da maior importância, pois certamente contribuirá para uma melhor sobrevida destes casos.

1.1.2 Histologia do Câncer Gástrico

Os carcinomas do estômago são morfologicamente heterogêneos. Esta heterogeneidade é reflexo da diversidade de classificações histopatológicas disponíveis. Estas classificações são baseadas em métodos diferentes, tais como perfil histológico, grau de diferenciação, padrão de crescimento e histogênese⁹. Dentre as classificações mais comumente utilizadas, há a de LÀUREN³⁷ (1993) e a da Sociedade Japonesa³³ (1998).

A primeira é a mais utilizada na comunidade científica mundial e classifica os tumores em duas categorias principais: adenocarcinoma do tipo intestinal e do tipo difuso. Já a segunda, estipula três tipos histológicos de carcinomas: bem, moderadamente e pouco diferenciados; sendo os dois primeiros comparáveis ao tipo intestinal e o último, ao tipo difuso, da classificação de Làuren³³. Tendo em vista que adotaremos a classificação de Làuren, abaixo, apresentamos uma breve descrição desta.

1.1.1.1. Adenocarcinoma do Tipo Intestinal

O adenocarcinoma do tipo intestinal representa o tipo histológico predominante (mais de 50% dos casos). Ocorre principalmente em áreas onde o câncer gástrico é epidêmico, o que sugere uma etiologia principalmente ambiental. Microscopicamente, é bem delimitado¹⁴. Nos tumores mais diferenciados, os quais apresentam maior vascularização, a maioria das células é colunar e secreta mucina, provocando a formação de glândulas^{2,46}.

É detectado com maior frequência em homens na quinta e sexta décadas de vida e está associado à gastrite atrófica e à metaplasia intestinal. A gastrite atrófica ambiental está relacionada a *Helicobacter pylori*, uma bactéria que quando presente na mucosa gástrica, produz uma nuvem neutralizante de bases fortes que a protege do ácido clorídrico, causando hipocloridria neste tecido. Com o passar dos anos, a inflamação predispõe à atrofia glandular, ocorrendo hipocloridria profunda e glandular e conduzindo, portanto, a metaplasia intestinal e, possivelmente, a um adenocarcinoma^{2,14,22}. O estômago hipo ou aclorídrico é até seis vezes mais susceptível ao câncer do que o normoclorídrico, coincidindo com a observação de que, estatisticamente, a gastrite atrófica aumenta o risco de câncer gástrico²². Além disso, a *Helicobacter pylori* catalisa a redução de nitrato à nitrito e a reação entre nitritos e compostos N-nitrosos, podendo, dessa forma, produzir efeitos carcinogênicos diante a ingestão de compostos ricos em nitratos²². Assim sendo, a *Helicobacter pylori* tem sido reconhecida como um importante fator ambiental de predisposição a este tipo de carcinoma²².

1.1.1.2. Adenocarcinoma do Tipo Difuso

O adenocarcinoma do tipo difuso representa aproximadamente 40% dos adenocarcinomas gástricos, ocorrendo principalmente em indivíduos jovens⁴⁶. Representa o principal tipo histológico em áreas endêmicas e está associado com casos familiares, evidenciando a existência de predisposição genética associado com esta forma de adenocarcinoma².

Seu diagnóstico é mais difícil, pois suas lesões tendem a não formar uma massa exofítica visível macroscopicamente⁹. Microscopicamente, a lesão não

apresenta limites definidos, geralmente apresentando espalhamento submucoso extensivo e metástases precoces^{2,9}. Histologicamente, constitui-se de pequenos ninhos de células do tipo anel de sinete e, por isso, este tipo de tumor também é chamado de adenocarcinoma de anel em sinete^{14,46}. Porém, alguns cortes histológicos apresentam uma morfologia normal devido erro de amostragem; o que torna extremamente difícil a detecção de pequenas lesões por endoscopia²⁹.

1.1.2. Tratamento e Prognóstico do Câncer Gástrico

A gastrectomia permanece como o único tratamento curativo do câncer gástrico, sendo a extensão da cirurgia amplamente dependente do tamanho do tumor e das condições em que se encontra o restante da mucosa. A quimioterapia e radioterapia são utilizadas como adjuvantes ou paliativas^{19,46}.

Geralmente, o prognóstico de uma doença é reflexo das limitações dos tratamentos disponíveis. Dessa forma, o prognóstico do câncer do estômago ainda é muito pobre. Para sua estimativa, vários fatores devem ser levados em consideração como a idade do paciente; a localização, tamanho e margens do tumor; a profundidade de invasão; a existência de comprometimento dos linfonodos regionais e o tipo histológico¹⁴.

1.2. A GENÉTICA DOS TUMORES GÁSTRICOS

O acúmulo de alterações genéticas é responsável pelo desenvolvimento e progressão tumoral; entretanto, a biologia tumoral da maioria dos casos ainda não é bem compreendida. Dessa maneira, o estudo da estrutura e função de genes

associados ao câncer gástrico é fundamental para: (i) o estabelecimento de métodos mais eficientes de diagnóstico tumoral em fases iniciais da doença, isto é, antes da invasão e disseminação do tumor; (ii) o cálculo de riscos de um determinado indivíduo desenvolver a doença; (iii) a descoberta de novos tratamentos; (iv) o monitoramento da eficácia da terapêutica ou da intervenção preventiva⁶.

Nesse sentido, novos fatores genéticos têm sido pesquisados e mutações em vários proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo têm sido identificados.

De maneira simplista, os estudos de tumores podem ser subdivididos em dois grandes subgrupos:

- a. aqueles que buscam a identificação de genes envolvidos; diretamente na gênese e desenvolvimento do tumor;
- b. aqueles que procuram caracterizar genes de susceptibilidade do tumor, conforme apresentado a seguir.

1.2.1. Genes Envolvidos no Desenvolvimento de Tumores Gástricos

Os genes envolvidos no desenvolvimento de tumores, em geral, são classificados em duas classes principais: oncogenes e genes supressores de tumor. Os oncogenes são tipicamente ativados por amplificação gênica, translocações ou mutações de ponto em apenas um dos alelos; portanto, sendo classificados como de efeito dominante. Ao passo que os genes supressores de tumor geralmente são inativados através de perda de um alelo aliada à perda funcional do outro alelo, seja por deleção, mutação ou hipermetilação, caracterizando um padrão de manifestação recessivo.

Os genes de reparo têm sido considerado por alguns autores como uma terceira classe de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores; contudo, outros os consideram como uma subclasse dos genes supressores de tumores. Na presente dissertação, será tratada como uma classe.

1.2.1.1. Proto-Oncogenes em Tumores Gástricos

Em 1995, TAHARA⁵⁴ et al. dividiram os proto-oncogenes envolvidos no surgimento e/ou progressão do câncer gástrico em duas classes principais de acordo com os tipos de proteínas por eles codificadas: a dos receptores de tirosina quinase e a dos fatores de crescimento e citocinas.

No que diz respeito à primeira classe, destacam-se o c-met, a família gênica K-sam (K-sam I, II, III e IV) e o c-erbB-2. Os adenocarcinomas do tipo intestinal apresentam amplificação em c-met , c-erb-B2 e K-sam em suas respectivas frequências de 19%, 20% e 0%; já os do tipo difuso revelam 39% , 0% e 33% , respectivamente^{6,54,55}.

Quanto à classe dos fatores de crescimento e às citocinas, os genes TGF- α (fator de crescimento transformante α) e a família EGF (fatores de crescimento epidermal) são os que apresentam as maiores frequências de alterações com taxas para os tumores do tipo intestinal em 60% (TGF- α), 40% (EGF), 46% (VEGF) e 50% (EGFR); para os carcinomas difusos apresentam-se alterados em 55%, 20%, 12% e 25%, respectivamente^{6,54,55}.

1.2.1.2.Os Genes de Reparo em Tumores Gástricos

A elevada taxa de erros nos mecanismos de reparo do DNA eventualmente conduz a mutações em genes críticos, cuja inativação pode resultar em desenvolvimento tumoral. Estes erros, freqüentemente, causam instabilidade em microssatélites, pequenas seqüências repetitivas dispersas ao longo do genoma. Dessa forma, a ocorrência de mutação nestes genes pode ser verificada indiretamente através da identificação de instabilidade de microssatélites (MSI) pela análise de variação de comprimento de microssatélites^{6,7}.

Nos tumores gástricos, a instabilidade de microssatélites foi detectada em 31% dos cânceres gástricos independente de seu tipo histológico¹². Estudos recentes de amostras de afetados do Japão, Korea, Taiwan, Estados Unidos, Reino Unido, Portugal e Itália revelaram taxas de 15%, 16%, 27%, 21%, 23% e 50%, respectivamente, de alelos mutantes em pelo menos um loco de microssatélites⁵⁰. Em 2000, BEVILACQUA e SIMPSON⁷ descreveram que a instabilidade de microssatélites em câncer gástrico estava associada à hipermetilação dos alelos somáticos do gene hMLH1 em 100% dos casos.

1.2.1.3.Genes Supressores em Tumores Gástricos

A inativação de múltiplos genes supressores de tumor é freqüentemente observada no câncer gástrico. Alterações no gene p53, por exemplo, têm sido observadas em 5-70% dos casos, independentemente do subtipo histológico. Neste gene, as mutações de sentido trocado (*missense*) são as mais comuns e aumentam a estabilidade da proteína alterada, acarretando em seu acúmulo no núcleo celular²³.

Outro gene supressor de tumor associado à tumorigênese gástrica é o DCC (*deleted in colorectal cancer*), cujo produto induz à apoptose através da ativação da caspase-3 e, portanto, funciona como controle de morte celular programada¹⁰. Em estudos de perda de heterozigosidade (LOH), este gene tem se demonstrado importante no desenvolvimento de carcinomas gástricos do tipo intestinal, já que têm se detectado perda alélica em 50% desses tumores contra nenhuma encontrada no tipo difuso⁶.

Não menos importante é o envolvimento da via de transdução de sinal *Wnt* na tumorigênese humana; normalmente, esta via exerce um papel importante nos mecanismos de desenvolvimento como formação do “eixo do corpo”, desenvolvimento do sistema nervoso central entre outros. Já foram identificadas várias mutações em genes participantes desta via metabólica e associadas ao câncer gástrico como APC (*adenomatosis polyposis coli*) e β -catenina¹. Assim, foram detectadas mutações no gene APC em 60% dos tumores do tipo intestinal e raramente nos do tipo difuso⁶. No gene β -catenina, essencial na adesão célula-a-célula, estas alterações representam 27% e 0%, respectivamente⁴².

A β -catenina liga o domínio citoplasmático da E-caderina à α -catenina, que ancora o complexo de adesão (β -catenina – E-caderina) ao citoesqueleto⁴². A E-caderina, proteína codificada pelo gene CDH1, é crucial para o estabelecimento da integridade estrutural dos tecidos epiteliais. Mutações no gene CDH1 têm sido detectadas em 50% dos tumores do tipo difuso e nos casos de câncer gástrico familiar⁶. Além disso, hipermetilação no promotor deste gene em adenocarcinomas gástricos do tipo difuso e intestinal foi detectada³⁸.

Além destes genes, têm-se demonstrado o envolvimento de algumas regiões cromossômicas na tumorigênese gástrica. Estas regiões têm sido identificadas através: (i) de análise citogenética convencional em células tumorais; (ii) de estudo de ligação com marcadores polimórficos em casos familiares; 3 (iii) da triagem de perda de heterozigosidade de marcadores polimórficos.

Dentre estas regiões, o cromossomo 8, em especial seu braço curto, despertou o interesse dos pesquisadores por constituir uma região freqüentemente deletada em vários tumores, como os de bexiga, próstata, ovário, mama, estômago, fígado, colorretal e pulmão entre outros^{13,18,21,36,48,59,60,62}. Abaixo, daremos ênfase a esta região, uma vez que será tema de estudo da presente dissertação.

1.2.1.4.Cromossomo 8

Em 1994, ICHIKAWA³⁰ et al. introduziram um cromossomo 8 humano em células de murinos altamente metastáticas de câncer de próstata, as quais continham cromossomos 8 aberrantes. Este experimento resultou em supressão *in vivo* da capacidade de invasão tumoral. Em 1996, GUSTAFSON²⁶ et al. transferiram um monocromossomo 8 mediado por microcélulas em três linhagens celulares colorretais, demonstrando redução de tumorigenicidade. Deleções parciais neste cromossomo delinearam a região crítica 8p22-23 em cânceres colorretais²⁶.

Posteriormente, vários estudos analisaram a região 8p com vários microssatélites em amostras de diferentes tumores com o intuito de se verificar se havia perda de heterozigosidade (LOH) em alguma região específica, o que poderia possibilitar delimitar com mais precisão a região candidata para um possível gene supressor de tumor. Foram identificadas elevadas taxas de perda alélica em várias

regiões em 8p, mas principalmente da região 8p22^{3,5,11,17,39,44,45,58,60}. As regiões observadas com perdas alélicas estão resumidas na Figura 1. Estes resultados reforçaram a hipótese da existência de genes supressores de tumor neste região. A seguir, iremos nos restringir aos estudos de perda alélica (LOH) em tumores gástricos, pois é um dos temas de estudo na presente dissertação.

Em 1999, YUSTEIN⁶² et al. fizeram o primeiro estudo de LOH em 8p em tumores gástricos. Nesta análise, utilizaram os marcadores D8S261 (8p22) e D8S1106 (8p22), encontrando maior taxa de LOH com este último marcador (58%).

Em 2000, BAFFA⁵ et al. analisaram 5 marcadores (D8S261, LPL-3', D8S258, D8S133, NEFL), em 52 amostras de tumores gástricos, nas quais detectaram taxas de LOH de 29%, 39%, 33%, 33% e 27%, respectivamente. À partir dos resultados obtidos, sugeriram uma região mínima de deleção de cerca de 1 Mb entre os marcadores D8S258 e LPL-3' e, conseqüentemente, a presença de um gene supressor de tumor nesta região envolvido na progressão do carcinoma gástrico. Nesta ocasião, os autores não apontaram nenhum gene candidato.

Em 2001, o mesmo grupo de pesquisadores analisou LOH nos marcadores D8S261 e LPL-3'⁵⁷ em outros 26 tumores gástricos. Este esforço foi feito na tentativa de correlacionar a perda alélica em 8p com o gene FEZ1, que houvera sido descrito como gene candidato importante para o desenvolvimento de vários tumores³¹. Assim, VECCHIONE⁵⁷ et al. (2001) descreveram perda alélica em 3 dos 17 (18%) casos informativos para D8S261 e 3 de 18 (16%) casos informativos para LPL-3' nesta nova análise. Estes pesquisadores triaram mutações no gene FEZ1 nas 26 amostras de câncer gástrico que haviam sido analisadas nas estudos de LOH. Encontraram apenas uma mutação de sentido trocado em um adenocarcinoma

gástrico do tipo difuso. Esta amostra não havia apresentado perda de heterozigosidade em D8S261 ou em LPL-3', porém este tumor não expressava FEZ1, segundo imunohistoquímica realizada. Ausência ou redução da expressão da proteína FEZ1 foi também observada em 4 outros casos sem LOH em 8p21 e em 4 casos com LOH em D8S261. Portanto, de 26 amostras, 10 apresentaram redução ou ausência de expressão desta proteína e portanto, os autores consideraram o gene FEZ1 como um candidato importante como supressor de tumor para adenocarcinoma gástrico.

A confirmação desta região em câncer gástrico em outra população é fundamental para reforçar a hipótese da existência de gene(s) supressor(es) de tumor nesta região, bem como poderá contribuir para uma restrição ainda maior da região candidata e identificação do gene supressor de tumor aí contido.

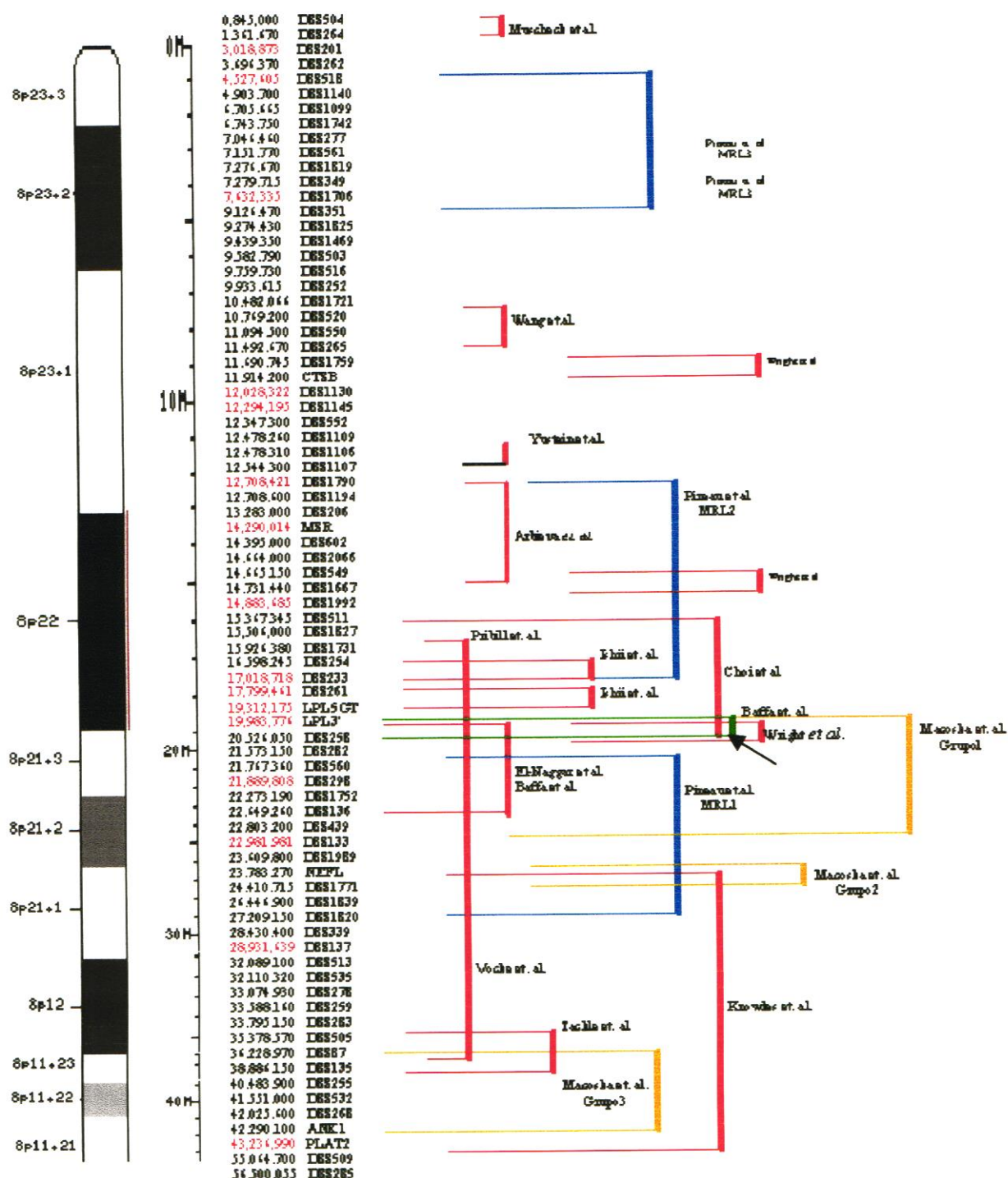


Figura 1 - Regiões Candidatas delimitadas por vários estudos em vários tumores, incluindo D8S258-LPL-3' (seta). Os marcadores apresentam-se ordenados de acordo com pesquisas realizadas dentro do banco de dados mundial do Projeto Genoma Humano (HGP) através da ferramenta Map Viewer disponível via web no Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/>)

1.2.2 Genes de Susceptibilidade

Estudos epidemiológicos têm mostrado que cerca de 1-3% dos adenocarcinomas gástricos são familiares e que parentes de primeiro grau têm um risco aumentado de virem a desenvolver câncer do estômago²⁹. Estes dados têm sugerido que a alteração de alguns genes, além dos fatores ambientais, predispõe seus portadores ao desenvolvimento de tumores gástricos. Dessa forma, acredita-se que a grande maioria dos casos seja decorrente de um padrão de herança multifatorial e a habilidade de se identificar indivíduos com risco aumentado da doença permitiria vigilância clínica intensiva, detecção precoce e diagnóstico melhorado.

Recentemente, através de estudos de ligação e clonagem posicional, GUILFORD²⁵ et al. (1999) demonstraram que mutações no gene CDH1, que codifica a E-caderina, estão associadas ao desenvolvimento de câncer gástrico. A E-caderina é uma proteína transmembrana, cuja função refere-se ao estabelecimento da polaridade celular e à manutenção da morfologia do tecido normal e da diferenciação celular. Desde sua identificação, várias mutações têm sido identificadas na linhagem germinativa de membros de famílias com câncer gástrico familiar do tipo difuso^{25,29,34}, bem como em células somáticas de casos esporádicos³.

Até o presente momento, não há outros genes associados com a predisposição ao desenvolvimento de tumores gástricos, especialmente em relação aos casos de tumores gástricos isolados. Tem-se pressuposto que cada um dos genes de susceptibilidade envolvidos com as formas de herança multifatorial contribua com o aumento de cerca de 2 vezes o risco de um indivíduo a desenvolver câncer. A identificação destes genes tem sido uma tarefa árdua e o método mais freqüentemente utilizado é o estudo de associação, onde se verifica se a presença de

um determinado polimorfismo referencial, em geral um SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo) em região codificadora ocorre em uma frequência maior do que a esperada entre os afetados do que em indivíduos normais da população. Os genes selecionados como candidatos podem ser aqueles envolvidos com mecanismos importantes para o desenvolvimento do tumor, como por exemplo, genes que participam da angiogênese, ou genes que esteja, diretamente envolvidos com o desenvolvimento do tumor como o da E-caderina ou o APC. Em relação ao presente projeto, selecionamos o estudo de genes envolvidos com os mecanismos da angiogênese, em particular, o gene *COL18A1*, responsável pela produção de um potente fator anti-angiogênico, a endostatina, como especificado a seguir.

1.2.1.1 A Endostatina

A endostina é um fragmento de 20 KDa C-terminal do fragmento do colágeno XVIII e um potente inibidor da angiogênese e do crescimento tumoral *in vivo*⁴¹.

Estudos demonstraram que a administração sistêmica da endostatina recombinante inibe, em potencial, a angiogênese, mantém metástases em um tamanho microscópico e regride o tumor primário a menos de que 1 mm³, uma redução de mais de 150 vezes⁴¹. Além disso, há evidências de que a endostatina inibe potencialmente a expressão de muitos genes relacionados ao crescimento e à apoptose em células endoteliais em crescimento exponencial⁴⁹. Em condições de soro suplementado, que representam o estímulo de crescimento máximo, a endostatina não é pró-apoptótica e reduz apenas levemente a proliferação e a transição do ciclo celular⁴⁹. Já em condições de soro reduzido, a endostatina induz a apoptose

endotelial e bloqueia a proliferação e a migração induzida pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)^{15,16,61}.

É bem conhecido que o desenvolvimento de tumores de tecidos sólidos são altamente dependentes da angiogênese^{20,28,35}. Recentemente, baseando-se em um estudo com pacientes com Síndrome de Down e a determinação plasmática dos níveis de endostatina, sugerimos que a menor prevalência de tumores de tecidos sólidos observada nestes pacientes²⁷ poderia ser decorrente de níveis mais elevados de endostatina⁶³. Ou seja, indivíduos com capacidade de produzir níveis mais elevados de fatores anti-angiogênicos teriam um fator protetor quanto ao desenvolvimento de tumores de tecido sólido.

Variações na região codificadora da endostatina podem acarretar em uma redução funcional da proteína. Conseqüentemente, é possível que indivíduos portadores destas alterações seriam ao contrário dos pacientes com Síndrome de Down, mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores de tecido sólido.

Em 2001, IUGHETTI³² et al. caracterizaram 20 polimorfismos no gene COL18A. Destes, o D104N destacou-se por conduzir à substituição de 1 aminoácido (ácido aspártico para asparagina) em uma região da endostatina. A análise deste polimorfismo em indivíduos normais e afetados com câncer de próstata mostrou que esta variante é 2,5 vezes mais freqüente entre os afetados. Estes resultados sugeriram que o polimorfismo D104N aumenta a susceptibilidade de um indivíduo a desenvolver um carcinoma de próstata em cerca de 2,5 vezes. Corroborando com estes resultados, MUSSO⁴⁰ et al. (2001) observaram uma redução, em aproximadamente duas vezes, dos níveis do colágeno XVIII em pacientes com hepatocarcinomas recorrentes. Dessa forma, estes achados apóiam a hipótese de que

indivíduos com baixos níveis de endostatina estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores em tecidos sólidos. Como a angiogênese é um processo crucial para o desenvolvimento da grande maioria de tumores de tecidos sólidos, julgamos importante verificar se este polimorfismo se encontra em uma frequência elevada em indivíduos com câncer de estômago.

2. OBJETIVOS PROPOSTOS

1. Caracterizar a região 8p22 em amostras de tumor gástrico de pacientes brasileiros:
 - a. Verificar a frequência de perda de heterozigosidade (LOH) desta região em tumores gástricos através de marcadores polimórficos;
 - b. Delimitar a região mínima de deleção;
 - c. Identificar *in silico* os transcritos localizados nesta sub-região;
2. Verificar se o polimorfismo D104N da endostatina aumenta a predisposição ao desenvolvimento de tumor gástrico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Neste trabalho, foram analisadas amostras de pacientes com câncer gástrico de duas populações: Pará e São Paulo.

3.1.1 População do Pará

Foram obtidas 62 amostras de tecidos gástricos normais e tumorais (adenocarcinomas) de pacientes do Hospital Offir Loyola (Belém, PA) e do Hospital Universitário João de Barros Barreto (Belém, PA).

Além disso, foram também obtidas 50 amostras de sangue periférico de indivíduos considerados normais (controles) dentre a população paraense para o estudo de polimorfismo.

3.1.2 População de São Paulo

Foram obtidas 34 amostras de adenocarcinomas gástricos e seus correspondentes normais, oriundos de pacientes tratados no Hospital A. C. Camargo (São Paulo, SP).

3.2 MICRODISSECÇÃO

Todas as amostras foram microdissecadas no Departamento de Patologia Clínica e Hemoterapia do Hospital A. C. Camargo pelo Dr. Fernando Soares, com o objetivo de eliminar possíveis contaminações de células normais nas secções tumorais ou de células tumorais/inflamatórias nas secções de tecido normal e, ainda, verificar morfologia do tecido em análise.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras acima descritas. Inicialmente, estas amostras foram incubadas em solução de proteinase K à 37°C por 24 horas a fim de serem digeridas. Após a digestão, seu DNA foi isolado pelo método descrito por SAMBROOK⁴⁷ et al. 1989.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A concentração do DNA foi obtida através da leitura da uma alíquota da amostra no espectrofotômetro em comprimento de onda equivalente a 260nm. Cada alíquota era diluída 250X em solução alcalina (0,3M NaOH; 0,1M NaCl).

3.5 ANÁLISE DE MICROSATÉLITES E DETERMINAÇÃO DE PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (LOH)

Através da análise de marcadores polimórficos, é possível identificar-se regiões cromossômicas com deleções. Estas regiões apresentam apenas um alelo do marcador em estudo, o que pode ser então em decorrência da perda do outro ou seja, perda de heterozigosidade (LOH). O requisito fundamental para este tipo de estudo é que o indivíduo analisado seja informativo, isto é, heterozigoto para os marcadores escolhidos. Desta forma, é possível distinguir os dois alelos de um marcador de DNA de um tecido normal do indivíduo afetado e, por comparação, determinar se ocorre perda, ou não, de um dos alelos no DNA tumoral⁵².

Uma vez identificada uma região cromossômica que apresenta uma alta frequência de deleção em células tumorais, esta região torna-se alvo de investigações com o intuito de identificar os genes aí existentes, pois esta perda pode estar associada com a presença de um gene supressor de tumor nesta região.

Desse modo, a análise de microssatélites foi realizada com amostras de DNA tumoral e não-tumoral pareadas, devidamente microdissecadas. Foram analisados os marcadores D8S261, LPL-3', D8S258, , e D8S282. As seqüências de seus iniciadores e suas frequências de heterozigosidade foram obtidas do banco de dados do "The Genome Database" – GDB (<http://www.gdb.org/>). A distância entre estes marcadores (Figura 2) foi verificada através das ferramentas Map Viewer e BLAST do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

SECRET

Nas reações de PCR, para amplificação do fragmento de interesse, foram utilizadas amostras de DNA com 50 ng/μl e os oligonucleotídeos marcados com a fluorescência FAM (LPL-3' e D8S261) e HEX (D8S258 e D8S282). As condições da PCR utilizadas estão descritas nas Tabelas 1 e 2. Os produtos da PCR eram, então, diluídos em água milli-Q de acordo com a fluorescência utilizada (5X em FAM e 7.5X em HEX). Então, as amostras eram submetidas à corridas eletroforéticas no Sequenciador Automático *Megabace1000* e analisadas, posteriormente, pelo software *MegaBACE Genetic Profile 1.5* (Amershaw).

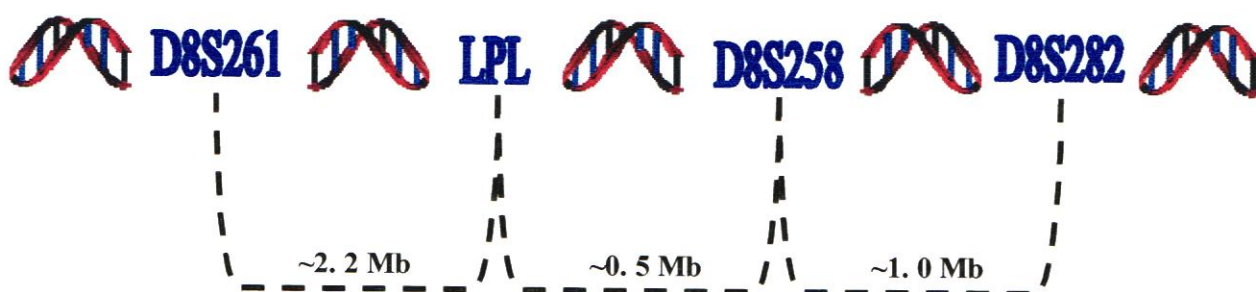


Figura 2 - Representação ilustrativa da distância existente entre os marcadores estudados em Megabases (Mb).

Fundação Antonio Predente
 Ana Maria Rodrigues Alves Kunin
 Coordenadora Pós-Graduação

Tabela1 - Concentrações dos reagentes utilizados nas PCRs.

Reagentes	Concentração
10x PCR Buffer	1x
DNTP	200 µM
MgCl	1,5 mM
Iniciadores F + R	0,6 µM
Taq Polimerase	1 U
DNA	30-50 ng

Tabela 2 - Ciclagens utilizadas nas PCRs.

Incubação		30 Ciclos		Extensão	Passo Final
Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final	
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
5 min	15 seg	15 seg	30 seg	20 min	∞

Para a verificação de perda de heterozigosidade (também denominada de perda alélica), calculou-se a relação entre os picos de cada amostra, da seguinte forma:

altura do alelo2 tumoral

altura do alelo1 tumoral

LOH=-----

altura do alelo2 normal

altura do alelo1 normal

Consideramos como perda alélica parcial resultados menores que 0,6 ou maiores que 1,5. Em amostras, cujo tecido tumoral apresentava 1 alelo a menos, quando comparado ao normal, denominamos de perda alélica total.

Para cada caso, analisamos em triplicata uma amostra de tecido normal e em triplicata uma amostra de tecido tumoral do mesmo indivíduo. Em nossas análises, consideramos apenas as amostras que apresentaram resultados adequados nas 3 réplicas. Nestes casos, a média destas réplicas foi considerada no cálculo de LOH. O percentual de casos com LOH foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{nº de casos de LOH}}{(\text{nº de casos informativos}) - (\text{nº de casos com instabilidade de microssatélites})}$$

Como instabilidade de microssatélites, consideramos aquelas amostras que apresentaram pelo menos 1 alelo novo no tecido tumoral, quando comparadas ao tecido gástrico normal. Novamente, só consideramos amostras que apresentaram resultados adequados em triplicata.

3.6 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE TRANSCRITOS DA REGIÃO CANDIDATA

Tão logo delimitada uma região candidata, os transcritos aí localizados foram identificados dentro do banco de dados mundial do Projeto Genoma Humano (HGP)

através da ferramenta Map Viewer disponível via web no Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/>) e no banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC), utilizando a ferramenta Golden Path também disponível via web (<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/septTracks.html>).

3.7 ANÁLISE DO POLIMORFISMO D104N DO GENE DO COLÁGENO XVIII (COL18A1)

O polimorfismo D104N do gene COL18A1 foi analisado a partir de DNA extraído de tecido gástrico normal de pacientes da população paraense e de DNA obtido do sangue de indivíduos controles. A maioria das amostras foi analisada através de duas metodologias: digestão enzimática e SNuPE.

3.7.1 Digestão Enzimática

Através deste método, o polimorfismo D104N do gene COL18A1 foi analisado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nele, as amostras foram submetidas a uma *PCR* com os oligonucleotídeos apropriados, seguida de digestão com a endonuclease de restrição *MseI*, que, ao reconhecer o sítio de restrição gerado pelo polimorfismo, cliva o produto da PCR de 169 pb e gera um fragmento de 100 bp e um de 69 bp.

As reações de *PCR* para a amplificação da região em estudo foram feitas a partir de 100ng de DNA em um volume final de reação de 25µl, contendo 0,25mM de cada nucleotídeo, 0,2 unidades de *Pfx Taq* DNA Polimerase (*Life Technologies*),

tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8.3; 0,01% gelatina), 1X “*enhancer*” da enzima, 1,0 mM de MgSO₄ e 20pmol de cada oligonucleotídeo. As amostras eram desnaturadas a 94°C por 4 minutos, seguidos de 33 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Uma desnaturação final a 72°C por 6 minutos completava a reação. Posteriormente, 7,0 µl do produto da reação de *PCR* eram submetidos a uma digestão com a endonuclease de restrição *MseI* a 37°C por 18 a 20 horas, em um volume final de 25 µl. O produto da digestão submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% ou gel de acrilamida 8%, sendo que a coloração era feita com solução de brometo de etídio (0,75 µg/ml) ou AgNO₄ 0,2%, respectivamente. Neste último caso, a incubação com AgNO₄ por cerca de 10 minutos era precedida por uma etapa de fixação do gel em solução contendo 10% de etanol e 0,5% de ácido acético por 3 minutos. Após a incubação com AgNO₄, o gel era lavado em água destilada e revelado em uma solução contendo 3% de NaOH e 0,5% de formaldeído até que as bandas atinjam a coloração desejada. Por fim, era realizada uma nova etapa de fixação em etanol 10% e ácido acético 0,5% por cerca de 5 minutos.

3.7.2 SNuPE (Single Nucleotide Primer Extension)

Neste novo método semi-automatizado, as amostras foram submetidas a uma *PCR* com os oligonucleotídeos apropriados (D104N), seguida de reação de SNuPE (Amersham Pharmacia). Esta consiste na utilização de um único iniciador 3' com cerca de 20 bases, cuja última base sempre antecede o nucleotídeo que pode estar mutado. O premix, com o qual esta reação é feita, contém além de tampões e termosequenases, também dideoxinucleotídeos marcados. Estes dideoxinucleotídeos

marcados cessam a síntese da molécula no ponto em que são adicionados, que corresponde à posição da base polimórfica, e emite uma fluorescência, quando excitado por um feixe de laser. A cor gerada pela fluorescência varia de acordo com a base adicionada⁵³.

As reações de *PCR* para a amplificação da região em estudo foram feitas, conforme descrito no método de digestão enzimática. Posteriormente, o produto da reação de *PCR* foram purificados com as enzimas eletrolíticas : Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), que degrada os nucleotídeos não incorporados, e a Exonuclease I (EXO,) que degrada iniciadores residuais e demais produtos simples fita não desejáveis. O produto, então, purificado era quantificado em gel de agarose 1.5%, onde era utilizado o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) para estimativa da concentração de cada produto, e visualizado por coloração com Brometo de Etídio.

De posse da concentração do produto, fazia-se reamplificação com iniciador com dideoxinucleotídeo fluorescente, utilizando-se quantidade de DNA de acordo com as instruções do fabricante. Nesta metodologia, o iniciador utilizado foi:

<i>TAAAACCCAGGCTCCCCGC</i>

3.8 QUESTÕES ÉTICAS

Todas as amostras utilizadas possuem termo de consentimento assinado, por seus respectivos pacientes, para sua utilização em pesquisas.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Teste Exato de Fisher foi realizado para avaliar a diferença entre os índices de LOH encontrados entre os tipos histológicos difuso e intestinal nas populações do Pará e de São Paulo e entre estas duas populações.

A hipótese da diferença entre as frequências genotípicas do polimorfismo D104N entre casos e controles foi testada pelo Teste Exato de Fisher na população paraense através de tabela de contingência. Foi ainda realizado a análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O nível de significância considerado em todas as análises foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

A classificação dos tumores estudados, de acordo com a análise histopatológica, está descrita nas Tabelas 3 e 4. Dentre as 96 amostras inicialmente estudadas, excluimos as amostras da população paraense CG 04, 19, 22, 23, 32 e 41 e as amostras da população de São Paulo CGL 03, 15, 22, 23, 32, e 33 correspondentes à secções não tumorais. Portanto, foram incluídas no presente estudo 84 amostras de tumor gástrico (56 de Pará e 28 de São Paulo), sendo 18 do tipo difuso e 66 do tipo intestinal.

Tabela 3 - Resultados obtidos através da microdissecção, contendo tipo histológico de cada amostra de câncer gástrico obtidas da população de Belém.

AMOSTRAS	MORFOLOGIA	AMOSTRAS	MORFOLOGIA
CG01	Adenocarcinoma intestinal	CG32	NÃO É TUMOR
CG02	Adenocarcinoma intestinal	CG33	Adenocarcinoma difuso
CG03	Adenocarcinoma intestinal	CG34	Adenocarcinoma intestinal
CG04	NÃO É TUMOR	CG35	Adenocarcinoma intestinal
CG05	Adenocarcinoma intestinal	CG36	Adenocarcinoma difuso
CG06	Adenocarcinoma intestinal	CG37	Adenocarcinoma difuso
CG07	Adenocarcinoma intestinal	CG38	Adenocarcinoma difuso
CG08	Adenocarcinoma intestinal	CG39	Adenocarcinoma intestinal
CG09	Adenocarcinoma intestinal	CG40	Adenocarcinoma intestinal
CG10	Adenocarcinoma intestinal	CG41	NÃO É TUMOR
CG11	Adenocarcinoma intestinal	CG42	Adenocarcinoma intestinal
CG12	Adenocarcinoma intestinal	CG43	Adenocarcinoma intestinal
CG13	Adenocarcinoma intestinal	CG44	Adenocarcinoma intestinal
CG14	Adenocarcinoma intestinal	CG45	Adenocarcinoma difuso
CG15	Adenocarcinoma difuso	CG46	Adenocarcinoma intestinal
CG16	Adenocarcinoma difuso	CG47	Adenocarcinoma intestinal
CG17	Adenocarcinoma intestinal	CG48	Adenocarcinoma intestinal
CG18	Adenocarcinoma intestinal	CG49	Adenocarcinoma intestinal
CG19	NÃO É TUMOR	CG50	Adenocarcinoma intestinal
CG20	Adenocarcinoma intestinal	CG51	Adenocarcinoma intestinal
CG21	Adenocarcinoma difuso	CG52	Adenocarcinoma intestinal
CG22	NÃO É TUMOR	CG53	Adenocarcinoma intestinal
CG23	NÃO É TUMOR	CG54	Adenocarcinoma intestinal
CG24	Adenocarcinoma intestinal	CG55	Adenocarcinoma intestinal
CG25	Adenocarcinoma difuso	CG56	Adenocarcinoma intestinal
CG26	Adenocarcinoma intestinal	CG57	Adenocarcinoma intestinal
CG27	Adenocarcinoma difuso	CG58	Adenocarcinoma intestinal
CG28	Adenocarcinoma difuso	CG59	Adenocarcinoma intestinal
CG29	Adenocarcinoma intestinal	CG60	Adenocarcinoma intestinal
CG30	Adenocarcinoma intestinal	CG61	Adenocarcinoma intestinal
CG31	Adenocarcinoma intestinal	CG62	Adenocarcinoma intestinal

Tabela 4 - Resultados obtidos através da microdissecção, contendo tipo histológico de cada amostra de câncer gástrico obtidas da população de São Paulo.

AMOSTRAS	HISTOLOGIA
CGL01	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 02	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 03	NÃO É TUMOR
CGL 04	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 05	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 06	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 07	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 08	Adenocarcinoma Difuso
CGL 09	Adenocarcinoma Difuso
CGL 10	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 11	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 12	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 13	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 14	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 15	NÃO É TUMOR
CGL 16	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 17	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 18	Adenocarcinoma Difuso
CGL 19	Adenocarcinoma Difuso
CGL 20	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 21	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 22	NÃO É TUMOR
CGL 23	NÃO É TUMOR
CGL 24	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 25	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 26	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 27	Adenocarcinoma Difuso
CGL 28	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 29	Adenocarcinoma Difuso
CGL 30	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 31	Adenocarcinoma Intestinal
CGL 32	NÃO É TUMOR
CGL 33	NÃO É TUMOR
CGL 34	Adenocarcinoma Difuso

4.2 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO

Foi possível verificar a presença (ou não) de perda alélica em 20 amostras (15 do Pará; 5 de SP), 26 retenções (18 do Pará e 8 de SP) e 4 com MSI (3 do Pará e 1 de SP). Algumas amostras foram classificadas neste trabalho como indefinidas, pois nestes casos quando comparava-se os alelos tumorais aos normais observava-se que o alelo com pico mais alto no tecido normal, apresentava-se mais baixo no tecido tumoral e vice-versa (Figura 3). Este evento sugere perda alélica em 7% dos casos não detectáveis pelo cálculo indicado, sendo 9% na população paraense e 2% na população paulistana.

Devemos ressaltar ainda que 18 amostras foram excluídas deste estudo pelos seguintes motivos: (i) amostras de DNA com baixa qualidade, (ii) amostras que apresentaram alelos tumorais totalmente diferentes dos normais, sugerindo troca de amostra biológica. As amostras excluídas devido à quantidade insuficiente de DNA para a amplificação de todas as réplicas necessárias foram CG06, CG13, CG39, CGL09, CGL19, CGL26 e CGL29. As amostras CG37, CG46, CG49, CG50, CG55, CGL02, CGL04, CGL07, CGL17, CGL24 e CGL30 foram excluídas das análises finais devido à possível troca de amostras, já que os alelos tumorais não correspondiam aos normais. Dessa maneira, restaram 48 e 18 espécimes para as análises finais na população paraense e paulista, respectivamente.

4.2.1 População do Pará

Detectamos perda de heterozigosidade, em pelo menos um loco, em 15 das 46 (32%) amostras informativas. A Figura 5 apresenta um exemplo de perda alélica para cada marcador. Das 48 amostras analisadas, 46 foram informativas para, pelo menos, um marcador. Os resultados obtidos para cada microssatélite foram:

- **Marcador D8S261**

Para este marcador, 48 amostras foram analisadas, sendo que: 20 não apresentaram perda alélica (retenção do alelo), 15 não foram informativas (homozigotas), 11 apresentaram perda alélica (35%) e uma (CG38) não apresentou resultados satisfatórios, isto é, não foi amplificada adequadamente nas 6 réplicas (3 do tecido normal e 3 do tecido tumoral) e, portanto, foi excluída das futuras análises. Das amostras apresentando perda de heterozigosidade, verificamos que 11 tratavam-se de perdas alélicas parciais e 2 perdas alélicas totais (CG16 e CG47). Foi observada instabilidade de microssatélites na amostra CG30.

- **LPL-3'**

Neste marcador, das 48 amostras analisadas: 21 não apresentaram perda de heterozigosidade (retenção), 12 eram homozigotas e 7 amostras demonstraram perdas alélicas parciais (25%). Foi observada instabilidade de microssatélites nas mesmas 3 amostras (CG11, CG17 e CG30) que apresentaram MSI no marcador D8S258 (exemplos na Figura 4). As amostras CG 18, CG29, CG33, CG58 e CG61 foram classificadas como indefinidas.

- **Marcador D8S258**

Para este marcador, as 48 amostras foram analisadas, sendo que: 15 não apresentaram perda alélica (retenção), 19 não foram informativas e 7 apresentaram perda alélica (32%). Na amostra CG38, foi observada perda total de um dos alelos. As amostras CG11, CG17 e CG30 apresentaram instabilidade de microssatélites (exemplos na Figura 4), quando amplificadas com os iniciadores deste marcador. Além disso, 4 amostras (CG07, CG18, CG33 e CG57), foram classificadas como indefinidas, sendo que as amostras CG18 e CG33 também foram assim classificadas no marcador LPL-3'.

- **Marcador D8S282**

Neste marcador, das 48 amostras analisadas, detectamos 12 amostras homozigotas, 27 que não apresentaram perda de heterozigosidade (retenção) e 6 apresentaram perda alélica (18%), sendo 1 perda alélica total (CG38). A amostra CG11 também apresentou instabilidade de microssatélites para este marcador. A amostra CG07 foi classificada como indefinida para este marcador, assim como para o microssatélite D8S258.

Os dados obtidos estão representados na Figura 6. Amostras não informativas ou que não apresentaram LOH em nenhum dos marcadores utilizados não estão representadas.

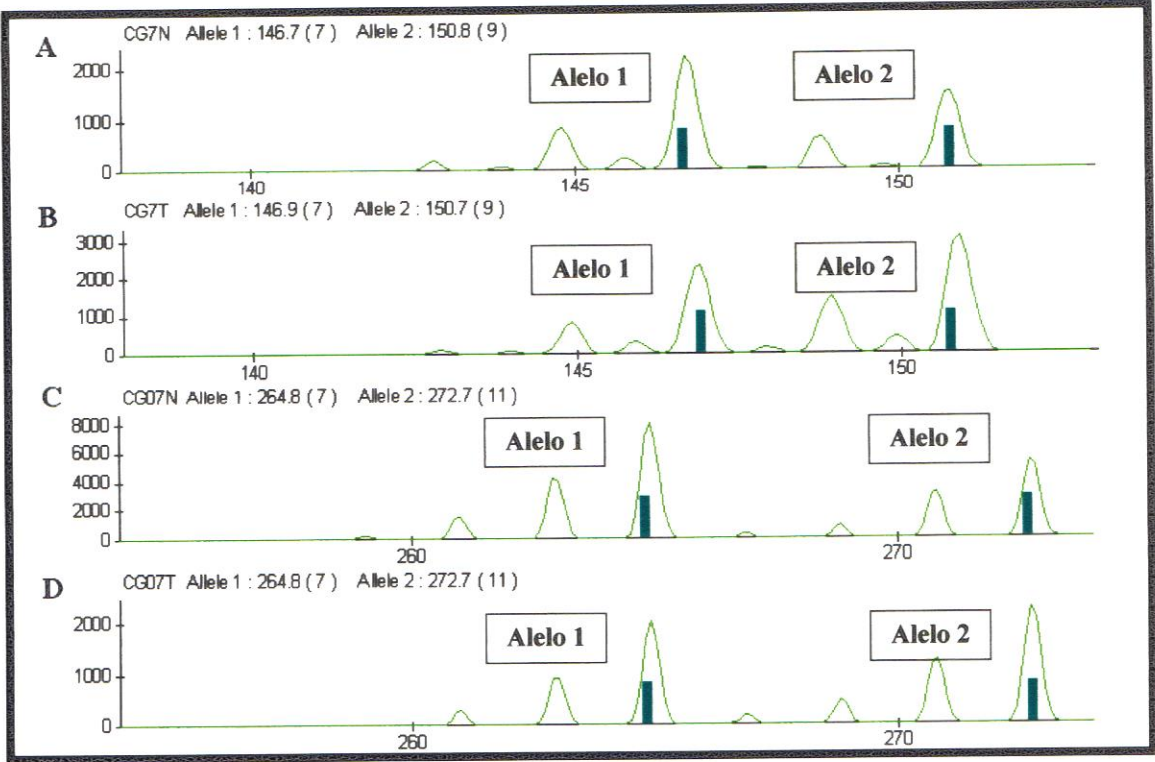


Figura 3 - Representação ilustrativa de amostras classificadas como indefinidas. Em A e B, a amostra CG07 amplificada com o marcador D8S258 a partir de seu DNA normal (N) e tumoral (T), respectivamente. Em B e C, a mesma amostra analisada com D8S282, utilizando DNA normal (N) e tumoral (T).

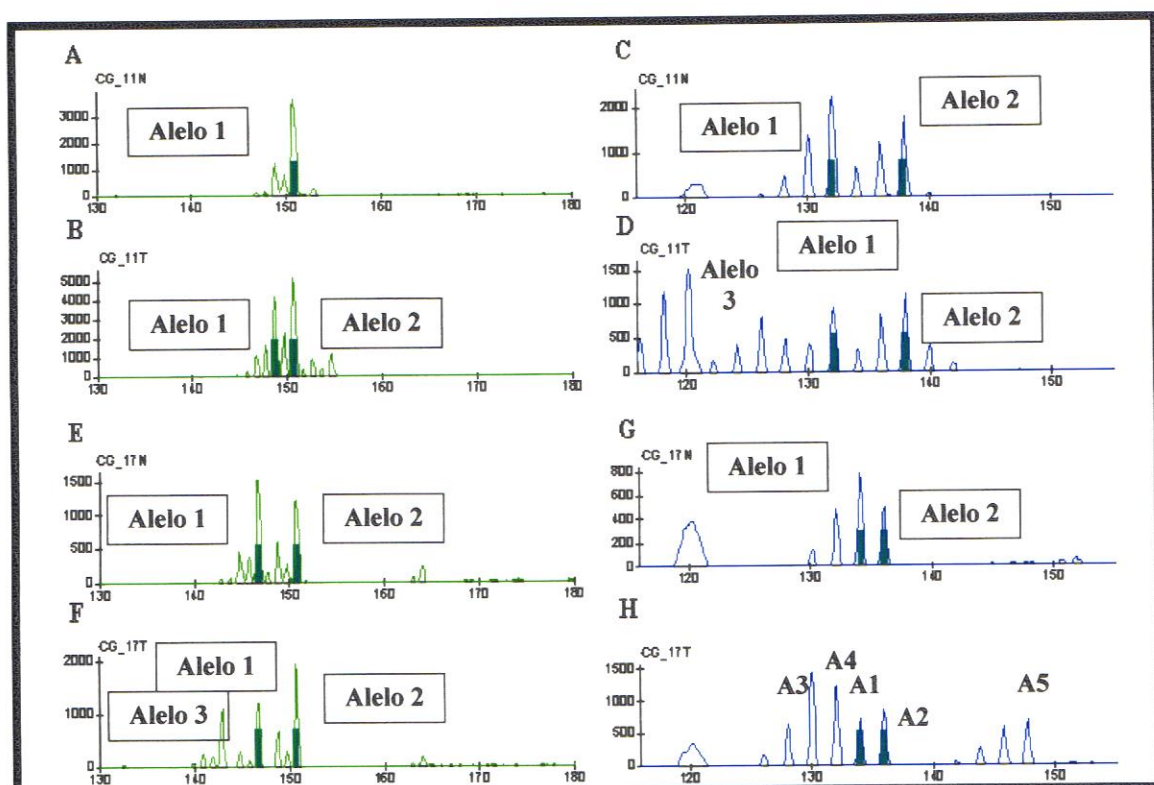


Figura 4 - Exemplos de amostras apresentando instabilidade de microssatélite (MSI). Em verde, fluorescência HEX (D8S258) e, em azul, FAM (LPL). Em A e B, o paciente CG11 apresenta 1 alelo (homozigose) em seu tecido gástrico normal para o marcador D8S258 e 2 alelos em seu tecido tumoral. Para o marcador LPL (C e D), o mesmo paciente possui dois alelos em seu tecido normal (heterozigoto) e quatro alelos em seu tecido tumoral (2 alelos novos). O paciente CG17, apresenta um novo alelo do marcador D8S258 (E e F) em seu tecido tumoral, quando comparado ao normal, e 3 alelos novos do loco LPL (G e H).

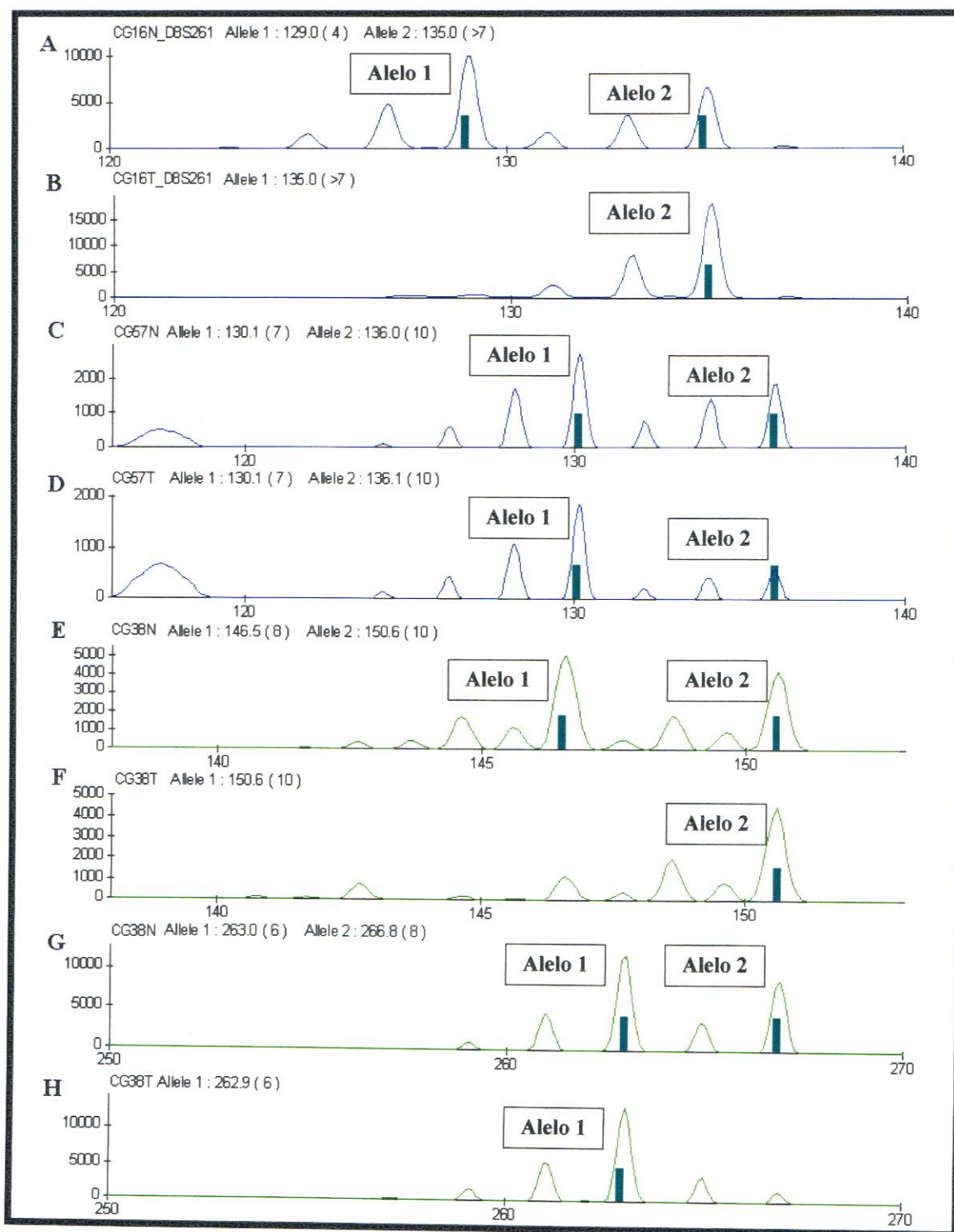


Figura 5 - Representação ilustrativa de amostras com LOH nos seguintes marcadores: D8S261 (A e B), LPL (C e D), D8S258 (E e F) e D8S282 (G e H); sempre comparando seus tecidos normais (N) e tumorais (T).

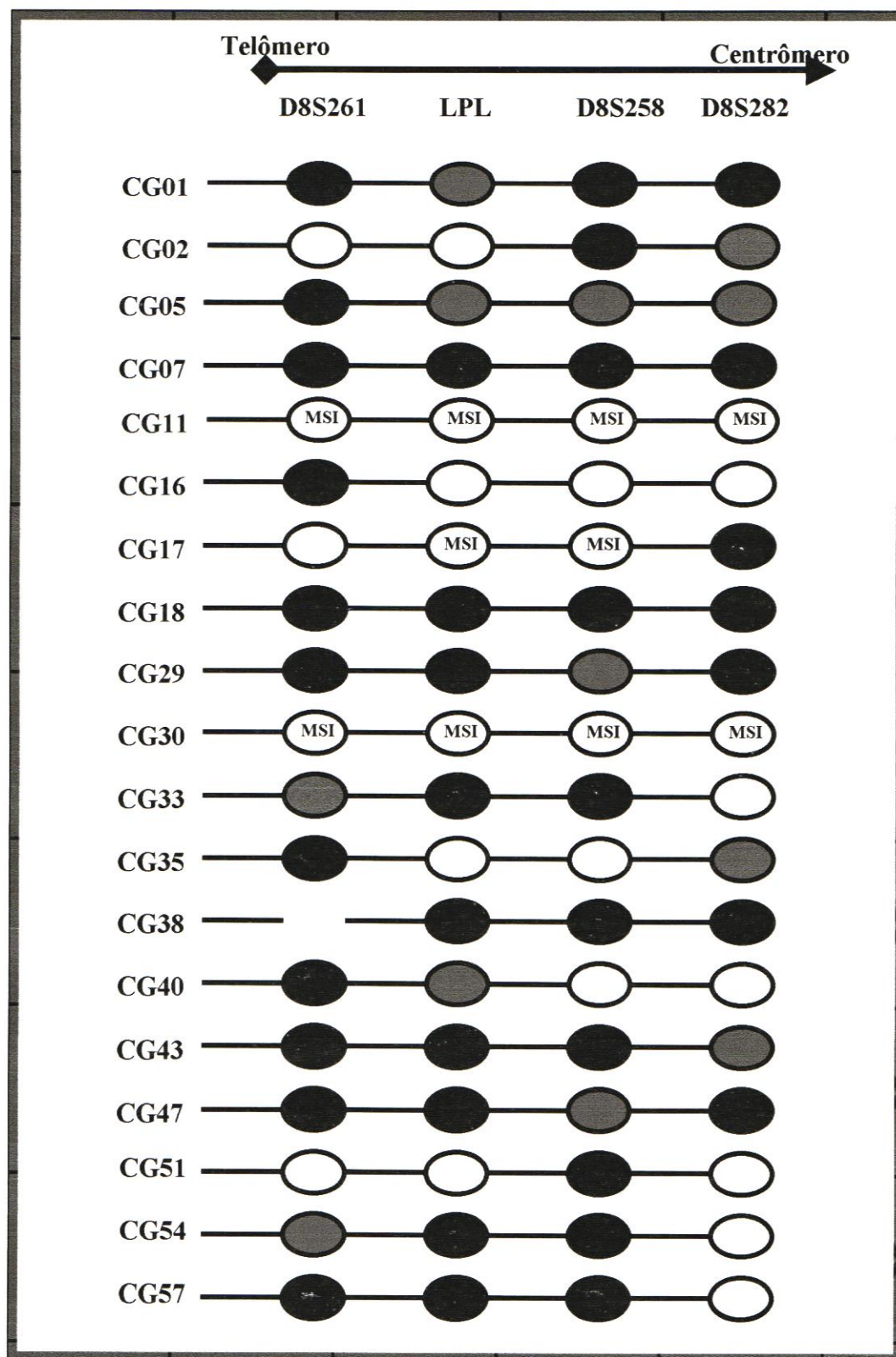


Figura 6 - Representação ilustrativa do estudo de LOH, realizado na população do Pará, utilizando-se os marcadores D8S261, LPL-3', D8S258 e D8S282. Os círculos negros representam LOH; os cinzas - locos não informativos; os brancos - retenção alélica; os preenchidos com pontilhados são amostras que foram classificadas como indefinidas e os que contêm a sigla MSI, leia-se instabilidade de microssatélites.

4.2.2 População de São Paulo

Detectamos perda de heterozigosidade, em pelo menos um loco, em 5 das 16 (31%) amostras informativas. Das 18 amostras analisadas, 16 amostras foram informativas para, pelo menos, 1 marcador. Os resultados obtidos para cada microssatélite foram:

- **Marcador D8S261**

Para este marcador, conseguimos amplificação adequada em 15 amostras, sendo que 7 não apresentaram perda alélica, 4 não foram informativas e 4 apresentaram perda alélica (36%).

- **LPL-3'**

Neste marcador, não obtivemos resultados satisfatórios nas 3 réplicas em 7 das amostras (CGL01, CGL05, CGL10, CGL13, CGL18, CGL25 e CGL27). Das 11 restantes, 9 não apresentaram perda de heterozigosidade e 2 amostras demonstraram perdas alélicas parciais (18%). Nenhum homozigoto foi detectado em LPL-3' dentre as amostras analisadas.

- **Marcador D8S258**

Para este marcador, 16 amostras foram analisadas, já que em duas (CGL05 e CGL10) não obtivemos amplificação satisfatória nas replicas necessárias em nenhuma das diversas repetições. Seis amostras não apresentaram perda alélica, 7

não foram informativas (homozigotas) e 2 apresentaram perda alélica (25%). A amostra CGL18 apresentou instabilidade de microssatélites.

- **Marcador D8S282**

Neste marcador, 14 amostras foram devidamente analisadas. Então, detectamos 1 amostra homozigota, 10 que não apresentaram perda de heterozigosidade, 1 apresentou perda alélica (9%) e 1 foi classificada como indefinida (CGL05).

Os dados obtidos estão representados na Figura 7. Novamente, as amostras não informativas ou que não apresentaram LOH em nenhum dos marcadores utilizados não estão representadas.

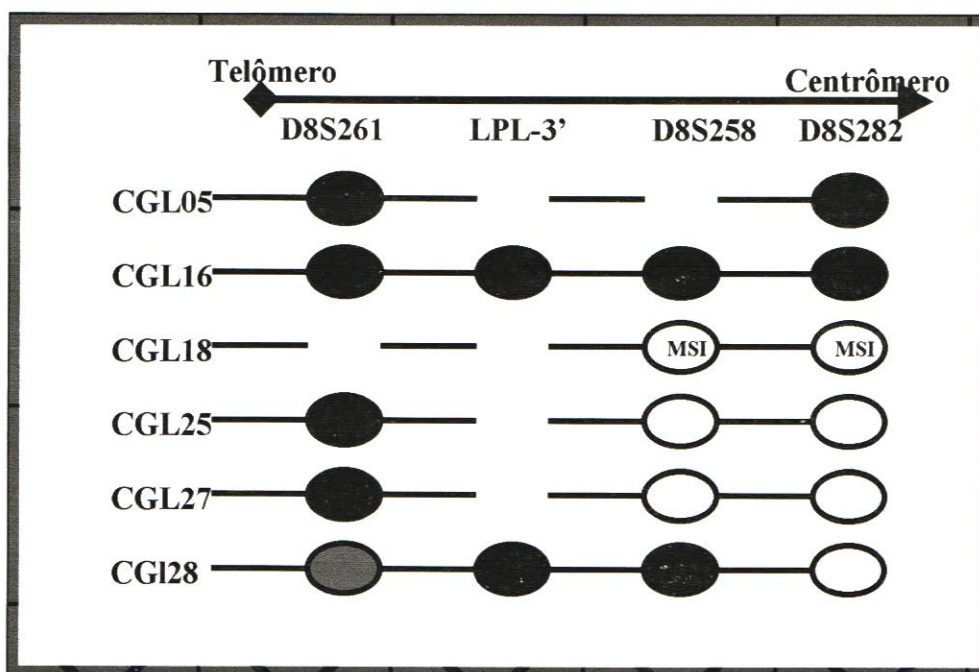


Figura 7 - Representação ilustrativa do estudo de LOH, realizado na população de São Paulo, utilizando-se os marcadores D8S261, LPL-3', D8S258 e D8S282. Os círculos negros representam LOH; os cinzas - locos não informativos; os brancos - retenção alélica; os preenchidos com pontilhados são amostras que foram classificadas como indefinidas e os que contêm a sigla MSI, leia-se instabilidade de microssatélites.

Para melhor caracterizar as amostras, consideramos como LOH (i) quando a razão das alturas entre os alelos foi <0.6 ou >1.5 ; (ii) locos informativos entre dois locos deletados; (iii) os locos indefinidos. Os resultados obtidos estão representados na tabela abaixo.

Tabela 5 - Tabela das Taxas de LOH obtidas nas populações do Pará e de São Paulo à partir dos marcadores D8S261, LPL, D8S258 e D8S282.

	Pelo menos 1 alelo (%)	D8S261 (%)	LPL (%)	D8S258 (%)	D8S282 (%)
PARÁ	41 (19 de 46)	35 (11 de 31)	38 (13 de 34)	44 (12 de 27)	21 (7 de 34)
SÃO PAULO	31 (5 de 16)(	36 (4 de 11)	18 (2 de 11)	25 (2 de 8)	17 (2 de 12)

*Os números entre parênteses significam o número de amostras com perda de heterozigosidade dividido pelo número de amostras informativas, conforme fórmula de cálculo de taxa de LOH. Assim, em (x de y), leia-se x como número de amostras com LOH e y como amostras informativas.

4.3 DELIMITAÇÃO DA REGIÃO CANDIDATA

Para esta análise, consideramos somente as amostras do Pará, haja visto o pequeno número amostral de São Paulo.

Nesta etapa,. baseamos-nos nos critérios descritos acima. Dessa maneira, observamos que com exceção das amostras CG16 e CG35, todas as outras tem uma região comum de deleção entre LPL-3’ e D8S282. Dentre estes, a menor deleção foi observada na amostra CG51, o que define como menor região candidata para o gene supressor de tumor entre os marcadores LPL-3’ e D8S282. As amostras CG16 e CG35 apresentam LOH exclusivamente no loco D8S261. Portanto, os nossos resultados sugerem que há duas regiões candidatas em tumores gástricos de pacientes

da população paraense: (i) às proximidades do marcador D8S261, não delimitado neste trabalho em sua porção distal e (ii) entre os marcadores LPL-3' e D8S282.

4.4 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DOS GENES CONTIDOS NAS REGIÕES CANDIDATAS

Consideramos apenas as regiões entre LPL-3' e D8S282 por ter sido possível defini-la em sua porção distal e proximal. Este intervalo é de aproximadamente 1.5 Mb. Nesta região, foram identificados até o momento:

- genes (SCL18A1, ATPV1B2 e LZTS1);
- e dois clusters de ESTs (Hs.365035 e Hs.385799).

4.5 ENDOSTATINA

4.5.1 Análise do Polimorfismo D104N

Foram amplificadas 55 amostras de tecido gástrico normal dos pacientes, das quais 52 eram homozigotas (DD) e três heterozigotas (DN), isto é, 6% eram portadores do polimorfismo D104N – CG22N, CG42N e CG48N. Todos os heterozigotos detectados pelo método de enzima de restrição foram confirmados por SNuPE. A Figura 9 e 10 contêm exemplos de homozigotos (DD) e heterozigotos (DN) detectados por SNuPE e digetão enzimática.

Na população controle, foram amplificados 35 amostras pelo método de SNuPE. Nelas, foram detectados 29 homozigotos (DD), 5 heterozigotos (DN) e 1

indivíduo que apresentou os dois alelos mutantes (NN), ou seja, 17% eram portadores deste polimorfismo (DN ou NN) (Figuras 9 e 10).

As frequências genótípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas duas amostras ($X^2 = 0,043$; $GL=1$; $p=0,86$ e $X^2 = 1,49$; $GL=1$; $p = 0,22$) e não observamos diferença significativa entre estas duas amostras ($p=0,0854$).

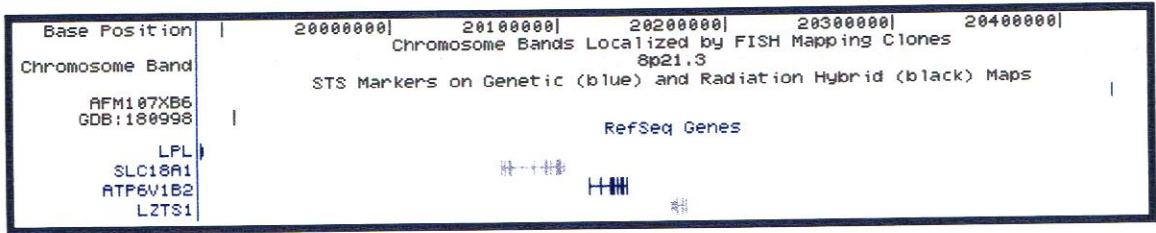


Figura 7 - Representação ilustrativa da região estudada LPL-D8S258, segundo pesquisas realizadas no banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC), utilizando a ferramenta Golden Path. Em AFM123XG5, leia-se D8S261; em AFM107XB6, D8S258; em WI-9031, LPL-3' e em SHGC-386, D8S282.

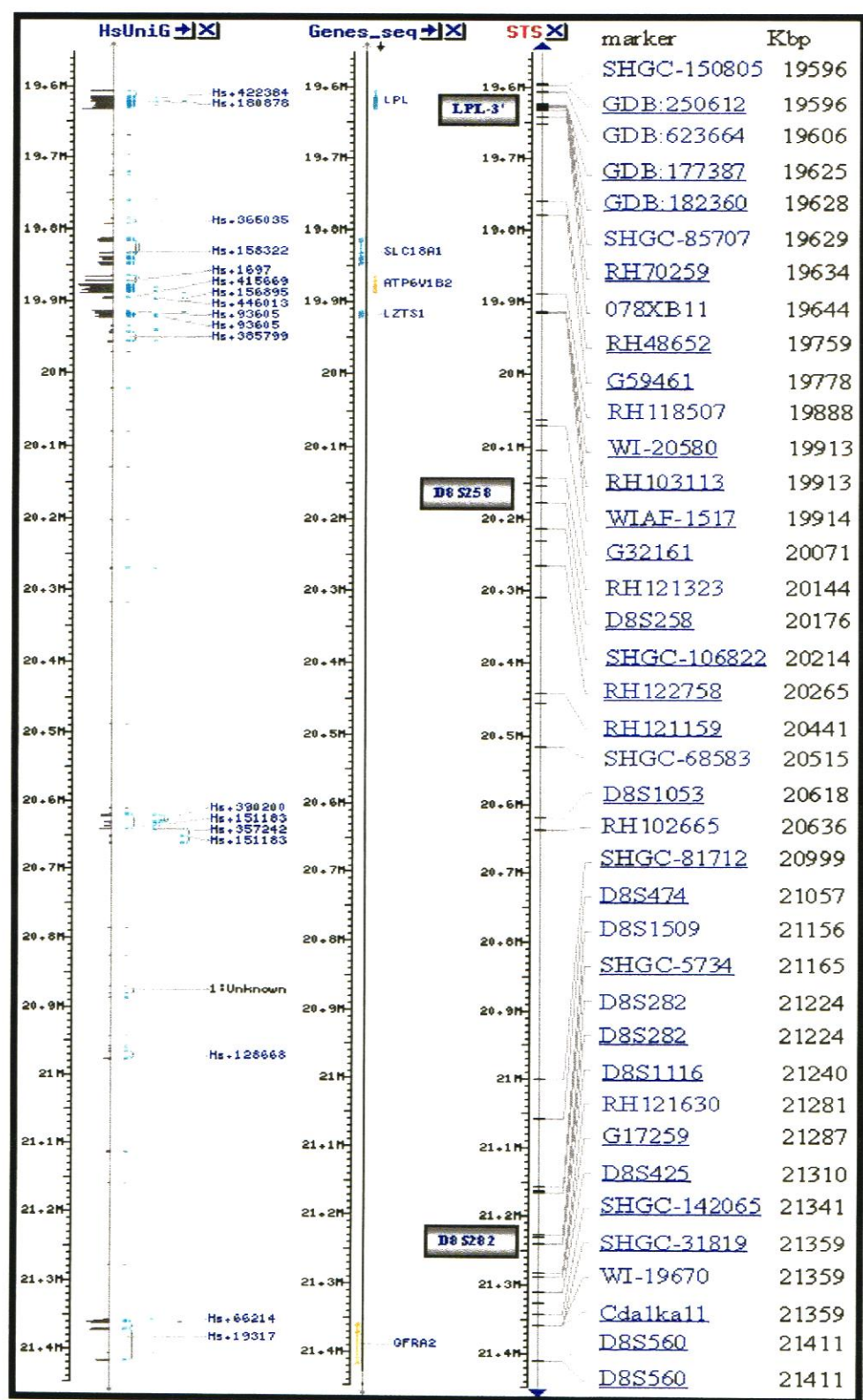


Figura 8 - Representação ilustrativa da região candidata LPL-D8S282, de acordo com pesquisas realizadas no banco de dados mundial do Projeto Genoma Humano (HGP) através da ferramenta Map Viewer.

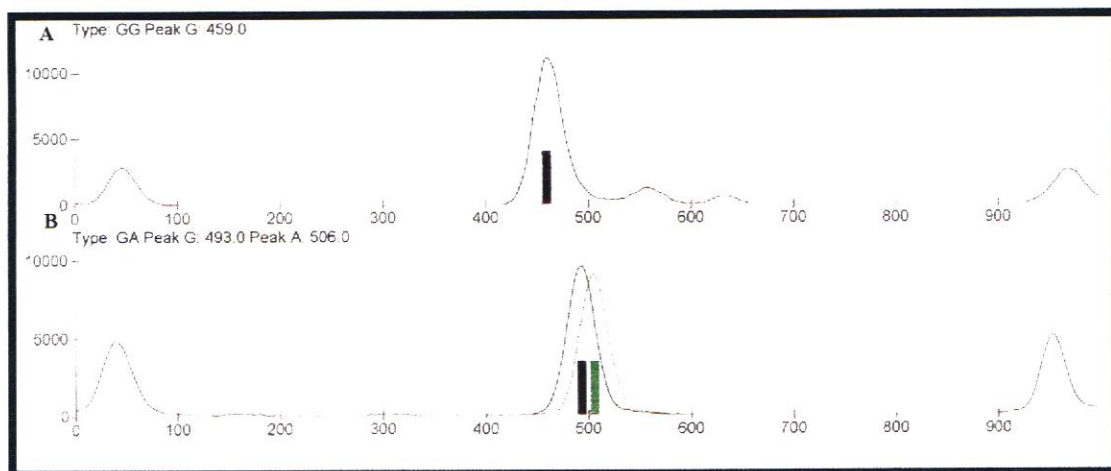


Figura 9 - Representação ilustrativa de um homozigoto (DD), em A, e um heterozigoto (DN - portador), em B, para o SNP D104N do COL18A1 através da reação de SNUPE.

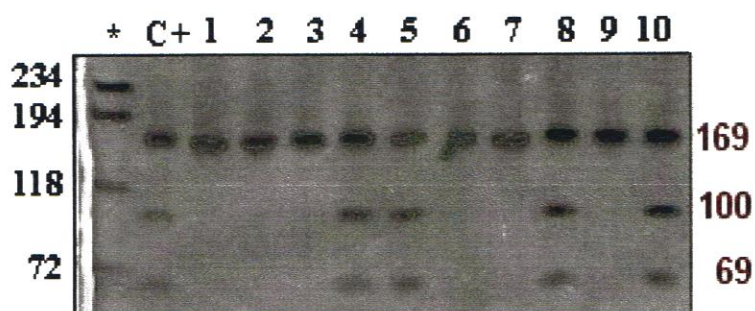


Figura 10. Representação ilustrativa de homozigotos – DD (1,2,3,6,7 e 9) e heterozigotos – DN (4,5, 8 e 10) por digestão enzimática. Os símbolos * e C+ referem-se ao *DNA ladder* e ao controle positivo, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

5.1 TAXAS DE LOH EM TUMORES GÁSTRICOS DO TIPO DIFUSO E EM TUMORES GÁSTRICOS DO TIPO INTESTINAL

Dentre as amostras que foram incluídas, inicialmente, na análise de LOH, 21% (18 amostras) são do tipo difuso (11 do Pará e 7 de SP) e 79% (66 amostras) do tipo intestinal (45 do Pará e 21 de SP). Interessantemente, VECCHIONE⁵⁷ et al. (2001) observaram que a maioria dos casos era do tipo difuso (67 %). Notamos que há uma diferença na composição da amostragem bastante significativa ($p < 0.001$).

As amostras apresentando perda de heterozigosidade em pelo menos um loco são do:

- Tipo difuso
 - i. População do Pará: 21%
 - ii. População de São Paulo: 33%

- Tipo intestinal
 - i. População do Pará: 79%
 - ii. População de São Paulo: 67%

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de LOH destas duas populações no tipo difuso ($p=0,52$) e/ou intestinal ($p=0,52$). Não foi encontrado ainda desproporção entre os dois tipos histológicos na população do Pará ($p=0,28$) e de SP ($p=0,54$); sugerindo que o evento de LOH nesta região é importante nos dois subtipos histológicos, possivelmente, em uma fase inicial do desenvolvimento tumoral.

5.2 TAXAS DE LOH OBTIDAS COMPARADAS ÀS DESCRITAS NA LITERATURA

As taxas de LOH¹ obtidas neste projeto não são diferentes daquelas obtidas por BAFFA⁵ et al. (2000) e VECCHIONE⁵⁷ et al. (2001) em adenocarcinomas gástricos, conforme dados representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Representação das taxas de LOH(%) obtidas em adenocarcinomas gástricos neste trabalho, por BAFFA⁵ et al. (2000) e por VECCHIONE⁵⁷ et al. (2001) nos marcadoresD8S261, LPL e D8S258. Para a verificação de diferença estatística entre os dados resultantes deste trabalho e os dos outros dois autores, foram realizados X² e Teste Exato de Fisher (*p*).

Origem dos Dados	D8S261 (%)	<i>p</i>	LPL (%)	<i>p</i>	D8S258 (%)	<i>p</i>
TESE	35 (11 de 31)		25 (7 de 28)		32 (7 de 22)	
Baffa et al. ⁵ (2000)	29 (10 de 34)	<i>p</i> =0,31	33 (11 de 28)	<i>P</i> =0,29	39 (11 de 33)	<i>p</i> =0,23
Vecchione ⁵⁷ et al. (2001)	18 (3 de 17)	<i>p</i> =0,18	16 (3 de 18)	<i>P</i> =0.50	**	

*Os números entre parênteses significam o número de amostras com perda de heterozigosidade dividido pelo número de retenções, conforme fórmula de cálculo de taxa de LOH. Assim, em (x de y), leia-se x como número de amostras com LOH e y como retenções.**Vecchione⁵⁷ et al. (2001) não analisou o marcador D8S258 em suas amostras. As taxas de LOH obtidas a partir de nossas análises, nesta tabela representada como TESE, são referentes aos índices de perda de heterozigosidade detectadas na população do Pará.

¹ O marcador D8S282 não foi utilizado por BAFFA⁵ et al. (2000) e VECCHIONE⁵⁶ et al.(2001).
 *VECCHIONE⁵⁶ et al. (2001) não analisou o marcador D8S258.

Em alguns estudos, onde foram utilizados estes marcadores em outros cânceres de origem epitelial, observam-se taxas de perda alélica semelhantes, como resumido abaixo:

- D8S261 – tumores de:
 - i. Ovário - 45% (45);
 - ii. Laringe - 48% (17);
- LPL-3' – tumores de:
 - i. Fígado - 32% (44);
 - ii. Próstata - 37% (58);
 - iii. Colorretal – 34% (20);
- D8S258 – tumores:
 - i. Ovário - 47% (45);
- D8S282

Este marcador foi utilizado em análise de LOH em cânceres de bexiga por TAKLE et al. (1996)⁵⁶. A frequência de LOH detectada não foi descrita.

As taxas de LOH encontradas nesta região (8p22), como poder ser observado, são altas para vários tipos de tumores, demonstrando sua importância na supressão tumoral.

5.3 REGIÃO CRÍTICA

As duas regiões candidatas propostas nesta dissertação (LPL-D8S282 e D8S261) se sobrepõem à outras regiões frequentemente deletadas em outros carcinomas. EL-NAGGAR¹⁷ et al. (1998) definiram uma região mínima de deleção

entre os marcadores D8S261 e LPL (~1.2Mb) em tumores orolaringeos. CHOI¹¹ et al. (2000) identificaram uma região comumente deletada entre os marcadores D8S511 e D8S258 (~5.2 Mb) em tumores de bexiga. PRIBILL⁴⁵ et al. (2001) descreveram ainda uma região de deleção comum em tumores de ovário, flanqueada pelos marcadores D8S1992 e D8S261(~2.9 Mb).

ISHII³¹ et al. (1999) descreveram uma região de 1.5 Mb, comumente deletada (70%), próxima ao D8S261 em tumores de esôfago. Os autores ainda identificaram o gene FEZ1/LZTS1, mapeado naquela ocasião próximo ao marcador D8S261, e o indicaram como gene candidato para a região. Entretanto, ao verificarmos a posição deste gene no genoma, observamos sua proximidade com o marcador D8S258 (~260Kb), ou seja, entre os marcadores LPL e D8S282. Dessa forma, entendemos que a região candidata LPL-D8S282, delimitada por BAFFA⁵ et al. (2000) e confirmada por nós, contém o gene LZTS1. Nesta região, com 1.5 Mb, estão contidos ainda os genes SLC18A1, ATPV1B2 e dois clusters de ESTs (Hs.365035 e Hs.385799); portanto, possíveis genes supressores de tumor posicionais, envolvidos na tumorigênese gástrica.

Acreditamos que a região próxima à D8S261, a qual se refere ISHII³¹ et al. (1999), corresponde à outra região candidata encontrada neste trabalho. Contudo, compreendemos a necessidade da delimitação da mesma em sua porção distal através de estudos de LOH, utilizando outros marcadores polimórficos em adenocarcinomas gástricos.

Os genes e os clusters de ESTs contidos na região candidata LPL-D8S282 são:

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

- **SLC18A1 (solute carrier family 1-member 1)**

Membro da família de carreadores de soluto tem como função o transporte de monoaminas para vesículas sinápticas cerebrais⁴³. Dessa forma, a indicação deste gene como candidato é pouco provável.

- **ATP6V1B2 (ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B, isoform 2)**

Este gene codifica um componente (subunidade B) da ATPase vacuolar (V-ATPase), uma enzima polimérica que medeia a acidificação de organelas intracelulares eucariotas através do bombeamento de H⁺. Essa acidificação de organelas V-ATPase dependentes é necessária em processos como ativação de zimogênios e de endocitose mediada por receptores (Locus Id: 526). Não há relatos ainda de mutações ou associações deste gene com tumores, porém, é um gene recém descrito e, portanto, pouco estudado.

- **LZTS1 (Leucine Zipper, putative tumor supresor 1)/FEZ1**

O gene LZTS1, originalmente, denominado FEZ1, codifica um transcrito de 6.8 kb e 3 exons codificantes e uma proteína de 596 aa. Sua sequência protéica contém domínios ‘*leucine-zipper*’ e homologia de 32% com fatores ativadores de transcrição –AMP-reponsivos (Atf5), o que sugeriu um importante papel deste gene na transcrição de DNA⁸.

Em 1999, foi sugerido como gene candidato com papel relevante no desenvolvimento tumoral de vários tumores através de *Northern Blotting*. Contudo, foram identificadas somente 2 mutações missense em 2 tumores esofagianos e 1

mutação de código de parada em uma linhagem celular de câncer próstata (PC3) ISHII³¹ et al. (1999). Em 2001, VECCHIONE⁵⁷ et al. tentaram confirmar estes dados, através de nova análise em adenocarcinomas gástrico. Neste trabalho, os autores encontraram 40% dos casos com expressão reduzida de LZTS1/FEZ1, 1 mutação missense em um adenocarcinoma gástrico do tipo difuso e ilhas CpGs metiladas no exon 2 em 6 de 8 linhagens analisadas, derivadas de carcinoma gástrico. Com esses resultados; os autores sugeriram que o LZTS1/FEZ1 seria um gene supressor de tumor em adenocarcinomas gástricos do tipo difuso, cuja inativação poderia ocorrer por deleção, mutação e/ou metilação.

- **O cluster de ESTs *Hs.365035***

Este cluster é formado por 5 ESTs, todas derivadas de tecido placentário normal. Não apresenta homologia com nenhum gene descrito.

- **O cluster de ESTs *Hs.385799***

Contêm 2 ORESTES derivadas de uma biblioteca de cDNA tumoral de cabeça e pescoço e 1 EST de cDNA de medula espinhal. Não foi caracterizado até o momento.

Através de análise dos transcritos contidos na região candidata LPL-D8S282, concluímos que o gene LZTS1/FEZ1 tem um grande potencial como candidato a gene supressor de tumor da região LPL-D8S282, desempenhando papel importante no desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos de subtipos histológicos difuso e intestinal. Para fins de confirmação, pretendemos, em uma próxima etapa, triar mutações no gene LZTS1/FEZ1 em cânceres gástricos. E, além disso, avaliar o grau

de metilação em seu promotor e em seus 3 exons através de seqüenciamento genômico após tratamento de bissulfito.

Entendemos ainda a importância da validação experimental e caracterização dos clusters de ESTs *Hs.365035* e *Hs.385799* por serem candidatos posicionais e, portanto, possíveis responsáveis pela supressão da tumorigênese gástrica creditada à região. Dentre estes dois clusters, julgamos importante ressaltar que o cluster *Hs.385799*, contém ESTs detectadas em mais de 1 tecido, aumentando portanto a probabilidade de ser um novo gene humano.

5.4 POLIMORFISMO D104N DA ENDOSTATINA

A frequência do polimorfismo D104N foi maior em controles (17%) do que na amostra de afetados (6%), contudo esta diferença não foi estatisticamente diferente ($p=0,0854$).

Estes dados diferem dos resultados obtidos por IUGHETTI³² et al. (2001) em câncer de próstata, onde foi encontrada uma frequência 2 vezes maior deste SNP entre os pacientes com adenocarcinoma de próstata. Contudo, 200 amostras de câncer de próstata e 198 controles foram analisadas por estes autores; sendo assim, seria importante estudarmos uma amostra maior para podermos excluir (ou não) este polimorfismo como candidato a predisposição de tumores gástricos.

6. CONCLUSÕES FINAIS

6.1. REGIÃO 8p

Esta dissertação sugere a existência de duas regiões candidatas em 8p em adenocarcinomas gástricos em duas populações brasileiras: Belém e São Paulo. A região candidata que envolve o loco D8S261 não pode ser delimitada em sua porção distal e. Portanto, será necessário um novo estudo, utilizando marcadores polimórficos nesta sub-região.

A segunda região candidata, que dista do marcador LPL'3 ao D8S282, confirma os dados apresentados anteriormente no estudo feito por Baffa *et al.*(2000) em pacientes com adenocarcinomas gástricos em duas populações (Itália e Japão). Nossos dados demonstram ainda que esta região é importante para os adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal e difuso, contrariando a sugestão feita por Vecchione *et al.* (2001) de que seria relevante apenas para os difuso.

Nesta região crítica (Lpl'3-D8S282), localizamos 3 genes (SCL18A1, ATP6V1B2 e FEZ1/LZTS1) e dois clusters de EST (*Hs.365035* e *Hs.385799*) ainda não caracterizados através de análises *in silico*. Dos genes contidos nesta região, concluímos que o FEZ1/LZTS1 é o candidato com maior potencial devido ao seu papel na regulação de transcrição de DNA. Contudo, sugerimos que sejam realizados estudos de triagem de mutações e de expressão deste gene nestas populações para efeitos de validação e ainda que os clusters de ESTs, localizados dentre estes locos, sejam caracterizados e investigados quanto a um possível papel na tumorigênese gástrica.

6.2. POLIMORFISMO D104N DA ENDOSTATINA

Neste estudo, observamos maior frequência na população paraense controle do que nos pacientes. Estes dados diferiram bastante dos resultados obtidos por Iughetti *et al* (2001) que detectaram uma frequência duas vezes maior em seus pacientes em relação aos seus controles.

Entretanto, o número amostral analisado é pequeno e os resultados obtidos não foram significativos estatisticamente. Assim, concluímos que há uma necessidade de aumentar este número amostral para excluir (ou não) a participação do polimorfismo D104N no desenvolvimento do câncer gástrico.

6.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. **Cytokine Growth Factor Rev** 2000; 11:273-82.
2. Alexander HR, Kelsen DG, Tepper JC. Cancer of the stomach. In: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles & practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.1021-49.
3. Arbieva ZH, Banerjee K, Kim SY, et al. High-resolution physical map and transcript identification of a prostate cancer deletion interval on 8p22. **Genome Res** 2000; 10:244-57.
4. Ascano JJ, Frierson Jr H, Moskaluk CA, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. **Mod.Pathol** 2001; 14:942-9.
5. Baffa R, Santoro R, Bullrich F, Mandes B, Ishii H, Croce CM. Definition and refinement of chromosome 8p regions of loss of heterozygosity in gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1372-7.
6. Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. **Surg Oncol** 2000; 9:5-11.
7. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. **Int J Cancer** 2000; 87:200-3.
8. Cabeza-Arvelaiz Y, Sepulveda JL, Lebovitz RM, Thompson TC, Chinault AC. Functional identification of LZTS1 as a candidate prostate tumor suppressor gene on human chromosome 8p22. **Oncogene** 2001; 20:4169-79.

9. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. **J Med Genet** 1999; 36:873-80.
10. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, et al. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. **Oncogene** 1999; 18:2747-54.
11. Choi C, Kim MH, Juhng SW, Oh BR. Loss of heterozygosity at chromosome segments 8p22 and 8p11.2-21.1 in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder. **Int J Cancer** 2000; 86:501-5.
12. Chung YJ, Kim KM, Choi JR, Choi SW, Rhyu MG. Relationship between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. **Int J Cancer** 1999; 82:782-8.
13. Cunningham C, Dunlop MG, Wyllie AH, Bird CC. Deletion mapping in colorectal cancer of a putative tumour suppressor gene in 8p22-p21.3. **Oncogene** 1993; 8:1391-6.
14. Dani R, Castro LP. **Gastroenterologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara; 1998. Tumores; p.545-62.
15. Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 258:345-52.
16. Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood** 2000; 95:340-11.
17. El Naggar AK, Coombes MM, Batsakis JG, Hong WK, Goepfert H, Kagan J. Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. **Oncogene** 1998; 16:2983-7.

18. Emi M, Fujiwara Y, Ohata H, et al. Allelic loss at chromosome band 8p21.3-p22 is associated with progression of hepatocellular carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 1993; 7:152-7.
19. Fielding JW, Hallissey MT, Timothy AR, Wrigley PFM. Cancer of the stomach. In: Peckham M, Pinedo HM, Veronei U, editors. **Oxford textbook of oncology**. New York: Oxford University; 1995. p.1116-26.
20. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature** 1989; 339:58-61.
21. Fujiwara Y, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. **Cancer Res** 1993; 53:1172-4.
22. Goldstone AR, Quirke P, Dixon MF. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. **J Pathol** 1996; 179:129-37.
23. Graziano F, Cascinu S, Staccioli MP, et al. Potential role and chronology of abnormal expression of the Deleted in Colon Cancer (DCC) and the p53 proteins in the development of gastric cancer. **BMC Cancer** 2001; 9:1.
24. Grundei T, Vogelsang H, Ott K, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma. **ClinCancer Res** 2000; 6:4782-8.
25. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. **Nature** 1998; 392:402-5.
26. Gustafson CE, Wilson PJ, Lukeis R, et al. Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. **Cancer Res** 1996; 52:5238-45.

27. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. **Lancet** 2000; 355:165-9.
28. Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. **Cancer Res** 1991; 51:6180-4.
29. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. **N Engl J Med** 2001; 344:1904-9.
30. Ichikawa T, Nihei N, Suzuki H, et al. Suppression of metastasis of rat prostatic cancer by introducing human chromosome 8. **Cancer Res** 1994; 54:2299-302.
31. Ishii H, Baffa R, Numata SI, et al. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:3928-33.
32. Iughetti P, Suzuki O, Godoi PH, et al. A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:7375-8.
33. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition. **Gastric Cancer** 1998; 1:10-24.
34. Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. **Am J Pathol** 1999; 155:337-42.
35. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature** 1993; 362:841-4.

36. Knowles MA, Shaw ME, Proctor AJ. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. **Oncogene** 1993; 8:1357-64.
37. Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. **Cancer** 1993; 71:2926-33.
38. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. **Oncogene** 2001; 20:1525-8.
39. Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T, Powell IJ. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. **Cancer Res** 1995; 55:5390-5.
40. Musso O, Rehn M, Theret N, et al. Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. **Cancer Res** 2001; 61:45-9.
41. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell** 1997; 88:277-85.
42. Park WS, Oh RR, Park JY, et al. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. **Cancer Res** 1999; 59:4257-60.
43. Peter D, Finn JP, Klisak I, et al. Chromosomal localization of the human vesicular amine transporter genes. **Genomics** 1993; 18:720-3
44. Pineau P, Nagai H, Prigent S, et al. Identification of three distinct regions of allelic deletions on the short arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. **Oncogene** 1999; 18:3127-34.

45. Pribill I, Speiser P, Leary J, et al. High frequency of allelic imbalance at regions of chromosome arm 8p in ovarian carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 129:23-9.
46. Rosai J. **Ackerman's surgical pathology**. Missouri: Mosby; 1996. Gastrointestinal tract; p.633-43.
47. Sambrook J., Fritsch EF; Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989; p.9.14-9.23.
48. Sato K, Qian J, Slezak JM, et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1574-80.
49. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin 1. **FASEB J** 2001; 15:1044-53.
50. Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. **Trends Mol Med** 2001; 7:76-80.
51. Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva. **Endoscopia digestiva**. Rio de Janeiro: Medsi; 1994. Tumores; p.139-53.
52. Strachan T, Read AP. **Human molecular genetics**. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1996. Somatic mutations and cancer; p.457-77.
53. Syvanen AC. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat** 1999; 13:1-10.
54. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. **World J Surg** 1995; 19:484-8.
55. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. **Semin Oncol** 1996; 23:307-15.

56. Takle, L.A.; Knowles, M.A. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. **Oncogene** 1996; 12:1083-7.
57. Vecchione A, Ishii H, Shiao YH, et al. Fez1/lzts1 alterations in gastric carcinoma. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1546-52.
58. Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, et al. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. **Cancer Res** 1996; 56:2411-6.
59. Wang JC, Radford DM, Holt MS, et al. Sequence-ready contig for the 1.4-cM ductal carcinoma in situ loss of heterozygosity region on chromosome 8p22-p23. **Genomics** 1999; 60:1-11.
60. Wright K, Wilson PJ, Kerr J, et al. Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. **Oncogene** 1998; 17:1185-8.
61. Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. **EMBO J** 1999; 18:4414-23.
62. Yustein AS, Harper JC, Petroni GR, Cummings OW, Moskaluk CA, Powell SM. Allelotype of gastric adenocarcinoma. **Cancer Res** 1999; 59:1437-41.
63. Zorick TS, Mustacchi Z, Bando SY, et al. High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. **Eur J Hum Genet** 2001; 9:811-4.