

## IV Jornada de Iniciação Científica do INCA

Data: 26 e 27 de junho de 2007 - das 9h às 17h

Local: Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Auditório da Coordenação de Pesquisa

Rua André Cavalcanti, 37 - 1º andar - Centro - Rio de Janeiro - RJ

### OBJETIVOS

Divulgar os trabalhos realizados pelos estudantes de Iniciação Científica (IC) do Instituto Nacional de Câncer (INCA)  
Avaliar o Programa de IC do INCA

### COORDENAÇÃO

Adriana Bonomo - Medicina Experimental/CPQ

### CONSULTORES EXTERNOS

Cristina Marcia Dias - Pneumologia/HFAG

Patricia Bozza - Farmacologia/FIOCRUZ

Robson Monteiro - Bioquímica/UFRJ

Marcelo Bozza - Imunologia/UFRJ

Jacyara Macedo - Hematologia/UERJ

Ana Gianninni - Genética/UFRJ

Mariano Zalis - DIP/UFRJ

Flávia Carvalho - Anatomia/UFRJ

Cristiane Ramos - Anatomia/UERJ

Cláudia Benjamim - Farmacologia/UFRJ

### COMITÊ INSTITUCIONAL

Etel Gimba - Medicina Experimental/CPQ

Anke Bergmann - Fisioterapia/HC III

Claudete Klumb - Hematologia/HCI

Luiz Claudio Santos Thuler - CEDC

Rosane Viana Jorge - Farmacologia/CPQ

Rocio Hassan - CEMO

### COLABORAÇÃO

Cecília Herculano Ferreira

Danielle Cristina da Silva Brito

### DIVULGAÇÃO

Serviço de Divulgação Científica (SDC) /CEDC/INCA

# Caracterização Funcional do Wnt4 no Câncer de Próstata

Faget DV, Matos LC, Gimba ERP.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

O câncer de próstata (CaP) é a segunda maior causa de morte por neoplasias e o segundo tipo de câncer mais incidente em homens no Brasil (dados do Instituto Nacional de Câncer). Atualmente, há tratamento efetivo para a doença clinicamente localizada através de cirurgia e radioterapia, mas a doença metastática permanece incurável. Quanto mais precocemente for detectado o CaP, maiores são as chances de cura; entretanto, atualmente, o diagnóstico precoce do CaP se tornou um grande desafio. Apesar do advento do PSA (antígeno específico da próstata), que melhorou a detecção do CaP, a maioria dos cânceres são diagnosticados em estágios avançados. Isto torna desejada a busca por novos marcadores, tanto quanto a melhoria do tratamento da doença. Proteínas superexpressas em tumores podem ser caracterizadas como biomarcadores e desempenham papéis críticos na progressão do câncer. Dados da literatura mostram, em ensaios de microarranjos de cDNA, que o gene Wnt4 é superexpresso em tecidos de CaP de alto grau de Gleason quando comparado a tecidos de baixo grau. Ensaios de imunistoquímica obtidos por este grupo de pesquisa sugerem que a proteína Wnt4 tem uma expressão maior em tecidos de CaP quando comparada a tecidos de hiperplasia prostática benigna e atrofia inflamatória proliferativa, uma lesão mais precoce ao desenvolvimento do CaP. Wnt4 pertence à família das glicoproteínas Wnt ricas em cisteína. As proteínas desta família já foram descritas por desempenhar um importante papel durante a embriogênese e a tumorigênese. As Wnt desencadeiam cascatas de sinalização através de três vias, sendo duas não-canônicas e uma canônica. A via canônica é capaz de ativar a transcrição de genes regulados pelos fatores de transcrição da família TCF/LEF e, dentre eles, estão o c-MYC e a ciclina D1, cuja participação na tumorigênese de vários tipos de câncer já foi descrita. A via de liberação de Ca<sup>2+</sup>, uma das vias não-canônicas, já foi descrita por antagonizar a via canônica. A via de polaridade, outra via não-canônica, tem o seu papel bem estudado durante a embriogênese e, mais recentemente, surgiu uma primeira evidência de que essa via seria capaz de induzir hiperproliferação em queratinócitos humanos. A proteína Wnt4 é capaz de ativar a via canônica em células de rim canino (MDCK) e a via não-canônica em células embrionárias de rim humano (HEK293). O envolvimento das proteínas Wnt no desenvolvimento de tumores despertou o interesse deste grupo em caracterizar o papel funcional de Wnt4 em CaP, tendo em vista que sua função é pouco compreendida durante o desenvolvimento desse tumor. Ensaios de qRT-PCR, gerados por este grupo, sugerem que a linhagem de adenocarcinoma prostático PC3 superexpressa o gene Wnt4. A partir desta informação, pode-se usar esta linhagem como modelo para a caracterização funcional de Wnt4 no CaP através de ensaios de interferência de RNA. O presente projeto tem como objetivo a caracterização funcional de Wnt4 no CaP, utilizando modelos experimentais de silenciamento e superexpressão do gene WNT4. Primeiramente, ensaios de interferência de RNA para o gene GAPDH foram realizados a fim de se estabelecer um protocolo de transfecção e otimizar as condições de interferência. Através de ensaios de qRT-PCR, observou-se a diminuição da expressão do mRNA de GAPDH após tratamento das células com siRNA por 15 horas e 24 horas, quando comparadas às células não-tratadas. Ensaios de *immunoblot* utilizando anticorpo específico para a proteína GAPDH demonstraram a diminuição da massa de GAPDH intracelular após 36 horas de tratamento. Este primeiro ensaio de interferência forneceu um protocolo para a transfecção do siRNA, através do qual comprovou-se a capacidade da linhagem PC3 de processar o siRNA através da sua maquinaria intracelular. As perspectivas deste grupo compreendem o estabelecimento do modelo experimental de superexpressão e o silenciamento do gene WNT4 para analisar proliferação, morte, migração celulares e as vias de Wnt ativadas em linhagens celulares de CaP PC3, DU145 e LNCaP pela sinalização de Wnt4.

Apoio: CNPq, FAF/INCA, Pronex-RIO, FAPERJ e *Swiss Bridge Foundation*

## Estabelecimento de Vetores Retrovirais para Análise do NFAT na Proliferação e Morte Celular

Cruz ALS, Robbs BK, Viola JPB.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

O fator nuclear de células T ativadas (*nuclear factor of activated T cells* - NFAT) foi inicialmente descrito como capaz de se ligar ao elemento responsivo de receptor de antígeno distal (ARRE-2) no promotor do gene de interleucina-2 (IL-2) em linhagem de células T Jurkat ativadas. Atualmente, cinco membros distintos constituem a família NFAT: NFAT1 (também conhecida como NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3) e NFAT5 (TonE-BP). Os membros clássicos da família - NFAT1-4 - são regulados por influxo de cálcio intracelular e localizados no citoplasma de células em repouso. Após estímulo que leve ao aumento do nível intracelular de cálcio, as proteínas NFAT são ativadas pela fosfatase calcineurina, cuja atividade leva à defosforilação de 13 resíduos de serinas localizadas em seu domínio regulatório. O NFAT defosforilado sofre mudanças conformacionais, levando à exposição do sinal de localização nuclear (NLS) e a sua translocação para o núcleo, onde se liga ao DNA promovendo ou inibindo a transcrição gênica. As proteínas NFAT atuam coordenando a expressão de genes envolvidos na ativação, diferenciação celular e apoptose. Com o intuito de elucidar os efeitos da regulação gênica promovida pelas proteínas NFAT no ciclo e morte celular, vetores retrovirais foram construídos, contendo os genes NFAT1 e NFAT2 ou suas formas constitutivamente ativas (CA-NFAT). As proteínas CA-NFAT foram construídas por mutações sítio-dirigidas, pela qual serinas fosforiladas, localizadas na região regulatória das proteínas NFAT e alvo da atividade da calcineurina, foram substituídas por alaninas. Estas mutações mantêm as proteínas NFAT permanentemente defosforiladas e conseqüentemente ativadas. Os vetores apresentam o gene marcador EGFP em fusão com o NFAT (pLEGFP-NFAT) ou separado por um sítio interno de entrada ribossomal (pLIRE2-EGFP-NFAT). Para comprovar a funcionalidade das construções, foram analisados a expressão, os níveis de fosforilação, a localização subcelular e a atividade transcricional das proteínas expressas. A linhagem HEK 293T foi escolhida para os três primeiros ensaios pela alta eficiência de transfecção e por não expressar NFAT1 ou NFAT2 endógeno. A expressão da proteína NFAT foi confirmada por *western blot* para todos os vetores após transfecção por fosfato de cálcio. Observou-se uma redução de peso molecular aparente das proteínas NFAT constitutivamente ativas em relação às proteínas selvagens, comprovando o estado defosforilado esperado para as proteínas mutadas. Observou-se ainda um aumento no peso molecular aparente das proteínas NFAT expressas pelo vetor pLEGFP referente à fusão com a proteína marcadora EGFP. Para avaliar a capacidade de ativação e translocação nuclear das proteínas NFAT, assim como a localização constitutivamente nuclear das proteínas CA-NFAT, a localização subcelular das proteínas expressas foi observada por microscopia de fluorescência. Como esperado, as proteínas NFAT1 e NFAT2 localizaram-se restritas ao citoplasma em células em repouso. Após estímulo com ionomicina, observou-se a translocação das proteínas NFAT selvagens, cujo efeito foi bloqueado pelo inibidor da calcineurina, ciclosporina A (CsA). As construções CA-NFAT localizaram-se no núcleo de células em repouso ou tratadas com CsA, confirmando a esperada localização constitutivamente nuclear dessas proteínas. Para avaliar a atividade transcricional das proteínas NFAT expressas, foi realizado um ensaio de transativação a partir da expressão do gene repórter luciferase, cuja expressão é regulada por um promotor contendo três regiões-consenso de ligação para NFAT baseadas no sítio ARRE-2 do promotor de IL-2. Para este ensaio, utilizou-se a linhagem de células T humanas Jurkat, por ser a linhagem na qual a regulação e transativação das proteínas NFAT foi descrita. Observou-se a atividade transcricional pelas proteínas NFAT selvagens após estímulo com PMA e ionomicina, cujo efeito foi inibido por CsA. Como esperado, as proteínas CA-NFAT apresentaram atividade transcricional na ausência de estímulo, obtendo máxima atividade transcricional com administração apenas de

PMA. Não houve inibição de transativação por tratamento com CsA. Juntos, estes resultados mostram a funcionalidade esperada das proteínas NFAT expressas, tanto selvagens quanto constitutivamente ativas, e assim comprovam a funcionalidade dos vetores retrovirais construídos. O uso abrangente dessas ferramentas visa, como objetivo final, a elucidar o papel dos membros NFAT1 e NFAT2 na proliferação e morte celular.

# Biogênese de Autofagossomos em Resposta à Radiação em Células de Adenocarcinoma de Cólon Humano, HCT-116

Albuquerque-Xavier AC, Morgado-Díaz JA.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** Autofagia é uma via de degradação intracelular de macromoléculas e organelas, que pode ser induzida por privação de aminoácidos, tratamento hormonal e irradiação ionizante. A biogênese de autofagossomos induzida por privação de aminoácidos inicia-se com a formação do fagopóro, uma membrana dupla derivada de retículo endoplasmático que seqüestra organelas citoplasmáticas e porções de citossol, formando um vacúolo conhecido por autofagossomo inicial. Em seguida, ocorre o amadurecimento dessa organela após fusão com vesículas endolisossomais, onde o autofagolisossomo contendo hidrolases lisossomais digere conteúdo citoplasmático. Em câncer, nos últimos anos, o estudo de autofagia tem apresentado duas faces antagônicas: a eliminação de tumor através de estímulo de morte celular não-apoptótica ou uma resposta adaptativa de células tumorais. Por outro lado, os mecanismos moleculares que estariam mediando esses eventos não são muito conhecidos. **Objetivo:** Estudar a biogênese de autofagossomos após radiação ionizante em células de adenocarcinoma de cólon humano, HCT-116, e identificar as vias de sinalização celular que estariam regulando esse processo. **Resultados:** Análise por citometria de fluxo não mostrou diferenças significativas nos níveis de apoptose em células irradiadas, comparadas ao grupo-controle 48 horas após irradiação, indicando um mecanismo de proteção celular. Neste mesmo período de tempo, foi possível observar a formação de grandes organelas com material eletrondenso variado em seu interior, ocupando grande parte do citoplasma, como visto por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Análise usando BSA-Au e monodansilcadaverina como marcadores autofágicos e inibidores específicos de vias de sinalização indicaram que PI3K, Erk 1/2 e Src participam da biogênese dessas organelas. Esses inibidores foram capazes de prevenir a formação dessas organelas, como observado por MET e microscopia de fluorescência. Análise por *immunoblotting* permitiu quantificar a expressão total e o nível de fosforilação dessas proteínas, em diferentes tempos após tratamento com radiação. Resultados mostraram aumento significativo na atividade das proteínas Erk 1/2, Akt e Src 12 horas após radiação, como visto pela análise das formas fosforiladas dessas proteínas, apresentando queda nos tempos posteriores, o que indica a participação dessas proteínas em estágios iniciais de biogênese de autofagossomos. É importante salientar que, na análise por microscopia de fluorescência em células pré-tratadas com inibidor de PI3K e irradiadas, observou-se intensa formação de corpos apoptóticos, sugerindo que a inibição de autofagia como um mecanismo protetor de morte celular por irradiação induziria apoptose em células HCT-116. Análise por microscopia eletrônica de amostras de tecidos colorretais de pacientes mostrou células enterocíticas bem diferenciadas, com microvilosidades e formação de brush borders em epitélio normal. Em contraste, no epitélio maligno, a camada de células epiteliais apresentou morfologia alterada, com microvilosidades escassas, distribuição e formato irregulares. Além disso, o epitélio tumoral apresentou intensa vacuolização citoplasmática, apresentando lamelas envolvendo material residual digerido e organelas, e vesículas contendo material eletrondenso em seu interior, estruturas estas que caracterizam a formação de autofagossomos em diferentes estágios de sua biogênese. **Conclusão:** Os resultados indicam o envolvimento das proteínas PI3K, Src e Erk 1/2 na biogênese dessas organelas após radiação e sugerem que esta resposta estaria relacionada à proteção de morte celular por apoptose. Assim, estes resultados podem contribuir para melhor compreensão do desenvolvimento e função dessas organelas e poderia ser útil nas terapias de cânceres epiteliais.

Apoio financeiro: CNPq, INCA/MS, FAF, FAPERJ

# Correlação dos Polimorfismos Gênicos da Família GST com a Resposta ao Tratamento da LLA na Infância

Briggs B, Faccion RS, Kwee JK, Emerenciano M, Pombo de Oliveira MS, Maia RC, Klumb CE.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

As enzimas do sistema glutationa-S transferase (GST) participam da fase II da detoxificação celular, e estão envolvidas no metabolismo de diversos quimioterápicos empregados no tratamento do câncer. Certos membros dessa superfamília possuem polimorfismos associados à suscetibilidade a algumas doenças hematológicas malignas e a outros tipos de tumores. Este projeto tem por objetivo estudar a frequência de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 em uma série de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda (LLA), e a sua associação ao risco de desenvolver a doença e a resposta ao tratamento quimioterápico. Para isso, amostras de DNA de 73 pacientes com diagnóstico de LLA e 177 indivíduos saudáveis foram analisadas por PCR Multiplex, sendo determinada a frequência dos diferentes genótipos. Os resultados preliminares apontam para uma frequência da deleção do gene GSTT1, inferior à relatada na população caucasiana e também inferior ao relatado previamente na população brasileira. Por outro lado, a frequência da presença de ambos os genótipos GSTM1 e GSTT1, no presente estudo, foi superior ao observado previamente nas populações caucasiana e brasileira. A frequência da deleção do gene GSTM1 e da deleção de ambos os genes, GSTM1 e GSTT1 foi semelhante à descrita na literatura, tanto para caucasianos quanto para brasileiros. Por essa análise, o estudo poderá contribuir para a avaliação do impacto desses genótipos na suscetibilidade à LLA infantil no Brasil. Posteriormente, tais genótipos serão correlacionados aos dados clínicos e à resposta ao tratamento, manutenção da remissão completa, e recidiva da doença ou refratariedade ao tratamento quimioterápico.

# Expressão de Transcritos para Herstatina, um Inibidor Natural de HER2, em Linhagens Hematopoéticas Malignas Humanas e em Mononucleares de Sangue Periférico de Indivíduos Normais

Souza AC, Rios GP, Moraes CS, Freitas SC.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** HER2 é o único receptor da família HER/ErbB (ligantes dos fatores de crescimento da família do EGF) para o qual não foi descrito um fator ativador solúvel. No entanto, HER2 funciona eficientemente como tirosina-quinase em heterodímeros com os outros HER (1, 3 e 4). Ativa-se também "espontaneamente", formando homodímeros, especialmente quando superexpresso, relacionando-se assim à proliferação celular em diversos tipos de câncer. **Objetivos:** Observou-se, anteriormente, a expressão de transcritos para HER2 em linhagens celulares hematopoéticas (leucemias e linfomas humanos), e também em mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais. Aqui, busca-se a expressão de transcritos para herstatina nessas células. **Métodos:** RT-PCR: RNA total das linhagens celulares foi extraído, cDNA sintetizado com poli-T, e amplificado com seqüências iniciadoras específicas para HER2 ou herstatina. Mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais foram obtidos pela centrifugação em *Ficoll*. A linhagem HEK293T de rim fetal humano foi usada como controle positivo para herstatina. **Resultados:** Todas as células co-expressavam transcritos para HER2 e herstatina, inclusive as mononucleares de indivíduos normais, sendo exceções a HL60, duplo-negativa e a CCRF-CEM, que expressava apenas herstatina. **Conclusões:** Caso os transcritos observados sejam traduzidos na proteína HER2 (ainda não estudado), a atividade desta em homo ou heterodímeros poderá ser regulada pela herstatina, tanto nas células do sangue normal como nas malignas. Através de ensaios quantitativos futuros (real-time-PCR), poder-se-á avaliar a proporção de transcritos HER2:herstatina nas células hematopoéticas; a resultante dessa proporção, se traduzida em proteínas, define a indução ao crescimento celular ou seu bloqueio através dessa via, em linhagens malignas não-hematopoéticas.

# Expressão de Receptores da Família HER e seus Ligantes em Malignidades Hematopoéticas Humanas

Rios GP, Moraes CS, Freitas CS.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** Receptores da família HER, assim como seus ligantes solúveis (fatores de crescimento da família do EGF) são essenciais ao desenvolvimento de diversos tecidos. Sua expressão ubíqua é mantida nas células maduras, à exceção das células do sangue. Sua superexpressão acha-se ligada à proliferação celular em diversos tipos de câncer. **Objetivo:** Busca-se a expressão de receptores HER e seus ligantes em uma coleção de linhagens hematopoéticas malignas humanas. **Métodos:** RT-PCR: RNA total das linhagens celulares foi extraído, cDNA sintetizado com poli-T, e amplificado com seqüências iniciadoras para HER, EGF, HB-EGF e TGF alfa. A identidade do produto de RT-PCR para HER2 foi confirmada por seqüenciamento. Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais, obtidas pela centrifugação em *Ficoll*, foram tomadas como controle negativo. **Resultados:** Transcritos para HER1 foram observados em três dos quatro linfomas de Burkitt testados (Daudi, Ramos e Raji), além da linhagem eritróide K562. Observou-se ainda transcritos para HER4 em Raji e para HER2 em todas as linhagens, exceto HL60 e CCRF-CEM, e nos mononucleares normais. Os ligantes transcritos para EGF, TGF alfa e HB-EGF achavam-se amplamente expressos nas linhagens, assim como em mononucleares normais, que, no entanto, não expressavam receptores HER1/4. **Conclusões:** A co-expressão dos receptores HER1/4 e seus ligantes sugere que possam utilizar essa via de estimulação em alça de crescimento autóloga. A ausência de receptores HER1/4 nas linhagens linfóides pré-B sugere que essa via seja de fato "desligada", reaparecendo no desenvolvimento linfóide B maligno como um evento secundário, posterior ao rearranjo da cadeia pesada de imunoglobulina.



# Análise da Importância da Survivina e da Smac/DIABLO na Resistência à Idarubicina em Células Leucêmicas de Origem Mielóide

Nestor de Moraes G, Silva KL, Maia RC.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

A resistência à apoptose é uma das principais causas de falha no tratamento das neoplasias malignas. A superexpressão da Survivina relaciona-se com a resistência às drogas e a prognóstico desfavorável nas leucemias. A Survivina também atua na transição da fase G2/M do ciclo celular e pode ser regulada pela Smac/DIABLO. Para explorar a relação entre a expressão da Survivina e da Smac com a resistência às drogas foi investigada a modulação da expressão dessas proteínas em três linhagens mielóides HL60, K562 e U937 tratadas com idarubicina. O ensaio de viabilidade celular MTT foi realizado para determinar a concentração da droga capaz de inibir a viabilidade de 50% das células tratadas (DL50). O perfil de distribuição do ciclo celular e de indução de apoptose após a incubação com idarubicina foi verificado por citometria de fluxo. *Western blotting* foi aplicado para examinar as mudanças nos níveis de Survivina e de Smac antes e após o tratamento. A linhagem HL60 foi a mais sensível para a droga testada. A idarubicina provocou um aumento da expressão da Survivina na DL50 nas três linhagens estudadas. Esse aumento só foi capaz de prevenir a apoptose nas células da U937, uma vez que a K562 e a HL60 foram passíveis de sofrer esse tipo de morte, significando que a linhagem U937 poderia estar sofrendo algum outro tipo de morte celular. A idarubicina foi ainda capaz de induzir aumento do número de células na fase G2/M em todas as linhagens, depois de incubação por 48 horas.

*Texto truncado.*

# Análise da Atividade Macropinocítica em Macrófagos Infectados com *Leishmania Amazonensis* e *Leishmania Major*

Zarattini JB, Deolindo P, Wanderley JLM, Barcinski MA.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Como descrito para células apoptóticas, amastigotas de *Leishmania amazonensis* expõem fosfatidilserina (PS) na face externa de sua membrana plasmática, mecanismo descrito como mimetismo apoptótico. Essa exposição induz uma resposta antiinflamatória, atividade macropinocítica e inibição da produção de óxido nítrico nos macrófagos, facilitando a infecção. Esses mecanismos são dependentes da densidade de PS exposta na superfície do parasita. Em interações com macrófagos, amastigotas de *L. major* ocupam vacúolos individuais e justos, com vários pontos de contato entre a membrana do parasita e a do vacúolo. Em contrapartida, amastigotas de *L. amazonensis* encontram-se em vacúolos largos, normalmente contendo mais de uma amastigota, cuja interação com a membrana do vacúolo parece ser apenas em uma região da membrana do parasita. Por ser a exposição de PS importante na formação de grandes vacúolos de macropinocitose, comparou-se, neste trabalho, a exposição de PS em amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* purificados de macrófagos infectados *in vitro* e sua possível correlação com a diferença de vacúolos observada. Nas infecções com *L. amazonensis*, ocorre um aumento na exposição de PS pelo parasita intracelular, com valores máximos de exposição observados entre 72-96 horas. Após o aumento de exposição de PS, ocorre aumento da atividade macropinocítica do macrófago infectado e aumento no tamanho dos vacúolos contendo os parasitas. Em infecções com *L. major*, a exposição de PS na superfície dos amastigotas é sempre menor do que aquela observada em *L. amazonensis*. Em macrófagos infectados com *L. major*, não foi observada atividade macropinocítica relevante.

*Texto truncado.*

## Estudo Fase II de Gencitabina e Cisplatina Neo-adjuvantes Seguidas de Cirurgia em Pacientes com Câncer de Bexiga Localmente Avançado: Avaliação Molecular para Predição de Resposta à Quimioterapia através da Relação mRNA *XIAP/XAF-1*

Séllós J, Pinho M, Costas F, Small I, Herchenhorn D, Affonso F, Campos F, Quirino R, Guimarães D, Ferreira CG.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** Vários estudos demonstraram a correlação *in vitro* entre a expressão das proteínas inibidoras de apoptose (IAP) e a quimiossensibilidade. Dentre as IAP, a XIAP demonstrou ser a mais importante e potente inibidora da caspase-9 (uma caspase essencial na apoptose induzida por quimioterapia). Recentemente, foi descrita uma molécula inibidora da XIAP, chamada XAF1. Já foram descritas duas isoformas de XAF1 geradas por *splicing* alternativo, sugerindo que possa haver outras isoformas de XAF1. Mais recentemente (2006), foi publicada uma terceira isoforma de XAF1 gerada também por *splicing* alternativo denominada XAF1C. A mesma isoforma havia sido identificada simultaneamente por este grupo, uma vez que o novo éxon teve sua seqüência obtida de três diferentes linhagens celulares. Nenhum estudo, até o momento, foi realizado para avaliar a função dessa isoforma ou seu potencial impacto na indução da apoptose. **Métodos e Resultados:** 1) Amplificação, seqüenciamento e análise da primeira metade do cDNA da isoforma *XAF1C*; 2) Amplificação da segunda metade do cDNA da isoforma através da técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*); 3) Inibição da expressão de RNA-m de *XAF1C* pela técnica de RNA de interferência analisada pela técnica de PCR em tempo real; 4) Indução de morte celular por cisplatina na linhagem CaLu-1 *XAF1C*-silenciada, avaliada em citômetro de fluxo por marcação com iodeto de propídeo, anexina e 7-AAD e por PCR em tempo real quanto à expressão de *XAF1C*. **Conclusão:** Os estudos funcionais de *XAF1C*, atualmente em andamento, poderão ser úteis na elucidação do papel biológico dessa isoforma na mediação da apoptose.

# Detecção de Mutações Constitutivas em Pacientes com Retinoblastoma através da Análise do cADN do Gene *RBI*

Santos RP, Barbosa RH, Ferman S, Vargas VR.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Mutações envolvendo o gene *RBI* são responsáveis pelo desenvolvimento do retinoblastoma. O retardo no tratamento leva à enucleação do globo ocular afetado e à extensão do tumor através do nervo óptico, atingindo o cérebro. Os portadores de mutações constitutivas no gene *RBI* possuem risco aumentado de desenvolver outros tumores na vida adulta. A detecção dos eventos mutacionais que desencadeiam o processo neoplásico é de essencial importância para o aconselhamento genético e o tratamento do retinoblastoma. Devido ao extenso tamanho do gene *RBI* e à ausência de *hotspots* mutacionais, há a necessidade de utilização de técnicas mais rápidas e eficientes de detecção de mutações. A metodologia de investigação por ADN inclui o seqüenciamento dos 27 éxons e regiões intrônicas adjacentes aos éxons do gene *RBI*, que ocupam uma extensão genômica de 180kb. Detectar mutações, através do seqüenciamento direto do ARNm do gene *RBI*, otimiza o rastreamento de mutações, pois a região de análise é menor, já que o ARNm possui apenas 4,7kb, diminuindo também o custo total, além de aumentar a capacidade de rastreamento do espectro mutacional. Na primeira fase do estudo, foram utilizadas células leucocitárias controle, extraídas do sangue periférico de indivíduos não-portadores de retinoblastoma. O ARN dessas células foi extraído e em seguida tratado com DNase. Após a obtenção do ARN, o cADN foi sintetizado com a enzima *SuperScript*®, e iniciadores *random primer*® foram utilizados para esta reação. O cADN obtido foi amplificado com iniciadores para o GAPDH, um gene constitutivo utilizado como controle, a fim de verificar a qualidade do ARN obtido.

*Texto truncado.*

# Incidência e Fatores Associados ao Arco Incompleto de Movimento para Flexão do Ombro no Pós-operatório do Tratamento do Câncer de Mama

Silva MM, Ribeiro ACP, Bezerra T, Silva JG, Bourrus NS, Castro ER, Bergmann A.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Objetivo:** Avaliar a incidência de arco incompleto de movimento (AIM) para flexão do ombro e os fatores associados à sua ocorrência no pós-operatório para tratamento do câncer de mama. **Métodos:** Estudo de coorte em mulheres (n=90) com diagnóstico de câncer de mama e indicação cirúrgica de LA, que foram submetidas a avaliações fisioterapêuticas pré e pós-operatórias. Foi realizada análise univariada para descrever o perfil da população e análises bivariada e multivariada para identificar os fatores associados às patologias de ombro. **Resultados:** A idade média foi de 59,8 anos (DP=13,9), 51% casadas e 48,9% apresentaram como escolaridade mínima o primeiro grau. A maior parte das mulheres (59,3%) tinha como principal atividade afazeres domésticos e 74,4% apresentam sobrepeso e obesidade ( $IMC \geq 25$ ). A avaliação fisioterapêutica foi realizada, em média, com 30 dias de pós-operatório, sendo a incidência de AIM de 43,7%. O modelo final de risco para AIM de flexão foi composto por: seroma (RR=2,47 IC 95% 0,93-6,54) e linfonodos comprometidos (RR= 3,39, IC 95% 1,31-8,77). **Conclusão:** A incidência de AIM após LA foi de 43,7%. Após controle das variáveis de confundimento e interação, as mulheres que evoluíram com seroma e linfonodos comprometidos no exame histopatológico tiveram maior risco de evoluírem com arco incompleto de movimento no período do seguimento. Estudos são necessários para avaliar propostas fisioterapêuticas visando à recuperação dos movimentos do ombro para essa população.

# O Retinoblastoma e a Análise Mutacional do Gene *RB1*: Experiência com Pacientes do Instituto Nacional de Câncer

Aguiar FCC, Barbosa RH, Vargas FR, Ferman S, Leontina L, Bonvicino CR.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Este trabalho objetiva a detecção de mutações constitutivas em pacientes com retinoblastoma e a sua confirmação nos seus familiares, mediante análise mutacional do gene *RB1*. Para tanto, foi feita a extração de ADN de sangue periférico de 7 pacientes e seus familiares atendidos no INCA. Devido à grande extensão do gene *RB1*, os 27 éxons foram amplificados em três etapas. Primeiro foram investigados os éxons com maior frequência de relatos de mutações, e depois o restante. Em seguida, esses produtos foram verificados em gel de agarose 1,5% e processados em um seqüenciador automático ABI Prism 377™. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas à referência depositada no Genbank. A amplificação em etapas proporcionou uma maior rapidez na obtenção de resultados, pois 50% das alterações foram encontradas na primeira etapa. Foram detectadas três mutações e um polimorfismo. Duas mutações são transições C>T, afetando os éxons 10 e 23. Essas substituições de bases levaram à formação de códons de parada prematura, com geração de proteínas truncadas. A terceira mutação é uma transversão A>T detectada no éxon 25 em um paciente bilateral, levando a uma proteína truncada. O polimorfismo foi encontrado no íntron 4 de um dos pacientes bilaterais, cuja mutação patogênica não foi encontrada. Nenhuma das referidas mutações foi encontrada nos familiares, indicando que esses três pacientes são casos de novo. A análise de 81% do gene *RB1* não revelou alteração patogênica nos pacientes unilaterais.

*Texto Truncado.*

## Incidência de Escápula Alada no Pós-operatório de Linfadenectomia Axilar

Ribeiro ACP, Bergmann A, Bezerra T, Silva MM, Silva JG, Ribeiro MJP, Dias RA  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** Entre as complicações cirúrgicas da linfadenectomia axilar, encontra-se a escápula alada (EA). **Objetivo:** Avaliar a incidência de EA após a linfadenectomia axilar (LA) e analisar os possíveis fatores de risco envolvidos no seu desenvolvimento. **Metodologia:** Estudo de coorte em mulheres com indicação cirúrgica de LA (n=91). A população elegível foi submetida a avaliações fisioterapêuticas pré e pós-operatórias (PO). **Resultados:** A idade média foi de 59,8 anos (DP=13,9), 54% exerciam tarefas do lar e 75,6% das mulheres tinham IMC>25. O câncer de mama foi diagnosticado no estágio IIA em 33%, sendo a mama esquerda a mais acometida (54,9%). A maioria das mulheres foi mastectomizada (87,9%). A LA foi parcial em 27% dos casos e total em 73%. A quimioterapia neo-adjuvante foi necessária em 44% dos casos. Ao exame físico realizado no pré-operatório, 18,1% apresentavam assimetria de ombros e 19,3%, alguma dor no membro afetado. A incidência de EA no PO foi de 74,7%. Na regressão logística, o modelo final de risco para EA foi composto por: idade >60 anos (RR=3,14 IC 95% 1,01-9,77); lado direito afetado (RR=3,57 IC 95% 1,15-11,12); tempo de seguimento <90 dias (RR=3,14 IC 95 % 1,09-9,02). As demais variáveis estudadas não foram estatisticamente significativas. **Conclusão:** A incidência de EA no PO foi de 74,7%. Após controle das variáveis de confundimento e interação, foi observado que: o câncer de mama à direita teve um risco 3,57 vezes maior de evoluir com EA em relação à cirurgia do lado esquerdo; a idade  $\geq 60$  anos apresentou um risco 3,14 vezes maior em relação às mais jovens e, quanto menor o tempo transcorrido entre a cirurgia e a avaliação, maior o risco de EA (RR= 3,14).

# Estudo Citogenético em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Tratados com Transplante de Medula Óssea Alogeneico: Citogenética Clássica e Molecular (FISH)

Pozzo AR, Corrêa D, Tavares RC, Azevedo A, Bouzas LF, Fernandez TS.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Este estudo tem como objetivo analisar as características citogenéticas e clínicas de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) primária tratados com o Transplante de Medula Óssea (TMO) alogeneico, para verificar a importância das alterações cromossômicas para o diagnóstico e seu impacto prognóstico. Foram estudados, retrospectivamente e prospectivamente (1991-2007), 90 pacientes com SMD primária, tratados com TMO alogeneico, sendo 31 crianças e 59 adultos. Os diagnósticos seguiram os critérios da classificação FAB (1982). A análise citogenética foi realizada através do bandejamento G; os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com ISCN, 1995. Para alguns pacientes, foi empregada a metodologia do FISH. Alterações cromossômicas foram detectadas em 53 pacientes (59%). As anomalias cromossômicas mais frequentes foram: alterações envolvendo cromossomo 7 (7q-/-7), del(17p), cariótipos complexos e del(12p). Outras alterações com menor frequência foram: inv(3q), del(5q), del(6q)(q21), +6, +8, alterações envolvendo o cromossomo 9 [del(9)(p21) e i(9)(q10)], del(11q), del(20q), alteração cromossômica biclonal. Neste estudo, as crianças apresentaram uma melhor resposta do que os pacientes adultos. Apenas 8 (26%) crianças faleceram e apresentaram os seguintes cariótipos: monossomia do 7, trissomia do 8, isocromossomo 9q, marcador e cariótipo normal. Dos pacientes adultos, 29 (49%) faleceram e apresentaram os seguintes cariótipos: del(5q), del(11q23), del(12p), del(17p), cariótipos complexos. Os resultados mostraram que a análise citogenética foi uma ferramenta fundamental para os pacientes com diagnóstico inconclusivo, principalmente para os casos de hipoplasia medular, sendo um diagnóstico diferencial entre anemia aplástica e SMD hipocelular. A análise citogenética desempenhou um papel prognóstico importante, selecionando pacientes com alterações cromossômicas de mau prognóstico em estágios iniciais da doença para o TMO alogeneico.



## Sarcomas Primários do Retroperitônio: Morbimortalidade e Sobrevida dos Pacientes Tratados no Instituto Nacional de Câncer

Santos CER<sup>1</sup>, Correia MM<sup>1</sup>, Rymer EM<sup>1</sup>, Stoduto G<sup>1</sup>, Kesley R<sup>1</sup>, Maluly V<sup>2</sup>, Carvalho RM<sup>2</sup>, Gruezo LD<sup>2</sup>, Dias JA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Internato em Medicina da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Objetivo:** Avaliar a morbimortalidade, a sobrevida e os fatores prognósticos dos sarcomas primários do retroperitônio.

**Método:** Análise retrospectiva de 95 pacientes com sarcoma de retroperitônio, operados na Seção de Cirurgia Abdominopélvica do Instituto Nacional de Câncer no período de junho de 1992 a setembro de 2006. **Resultados:** As queixas mais comuns foram dor abdominal e massa abdominal. A taxa de ressecabilidade foi de 78,94% e a de radicalidade entre os ressecados de 56%. Houve quatro óbitos pós-operatórios (4,21%) e 27 pacientes com complicações pós-operatórias (28,42%). Os leiomiossarcomas e os lipossarcomas foram os mais incidentes. O grau de diferenciação tumoral mais freqüente foi o G3 (33,68%) e o diâmetro tumoral médio, de 20,25cm. A sobrevida global média foi de 33 meses, e a média de sobrevida livre de doença foi de 29 meses. À análise univariada, o diâmetro do tumor (> ou ≤12cm), o grau de diferenciação tumoral ([G1 + G2] X [G3 + G4]), a ressecção radical (R0) ou paliativa (R1+R2), a hemotransfusão no ato operatório e a re-ressecção, mesmo que paliativa, nos casos de recidiva ou persistência de doença (n=51), foram significativos para a sobrevida. **Conclusão:** No momento, somente o diagnóstico precoce, a cirurgia radical R0, a ausência de hemotransfusão intra-operatória e a re-ressecção nos casos de recidiva ou persistência de doença possibilitarão a sobrevida a longo prazo.

# Carcinoma de Vesícula Biliar: Morbimortalidade e Sobrevida dos Pacientes Tratados no Instituto Nacional de Câncer

Santos CER, Correia MM, Gruezo LD, Dias JA.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Objetivo:** Avaliar a morbimortalidade, a sobrevida e os fatores prognósticos do adenocarcinoma de vesícula biliar. **Método:** Análise retrospectiva de exame histopatológico de 40 pacientes com adenocarcinoma de vesícula biliar, operados no INCA, no período de junho/1997 a julho/2006. **Resultados:** Sexo feminino predominante; idade média de 64 anos; sintomas mais comuns: dor abdominal, perda ponderal e icterícia. Onze pacientes eram assintomáticos (27,5%); 27 pacientes encontravam-se no estágio IV (67,5%), 4 no estágio III (10%), 5 no estágio II (12,5%), 2 no estágio I (5%) e 2 pacientes no estágio 0 (5%). Vinte e cinco pacientes (62,5%) apresentaram associação com colelitíase. Dezenove pacientes (47,5%) tiveram diagnóstico fortuito de carcinoma de vesícula após análise histopatológica da doença litiásica, com sobrevida global média de 33 meses. Já os 21 pacientes (52,5%) cujos tumores foram diagnosticados no pré-operatório apresentaram uma sobrevida global média de 10 meses e o estadiamento foi: 20 pacientes no estágio IV (95,2%) e 1 no estágio II (4,8%). A doença litiásica estava associada a outros tipos de câncer em 6 casos (15%). A taxa de ressecabilidade total foi de 82,5% (33 pacientes) e a de radicalidade entre os ressecados foi de 36,3% (12 pacientes). Houve 19 complicações em 11 pacientes (27,5%) e 5 óbitos pós-operatórios (12,5%). O grau de diferenciação tumoral mais frequente foi o G2 (18 pacientes [45%]). A média de sobrevida global foi de 21 meses e a média de sobrevida livre de doença foi de 35 meses. **Conclusão:** O diagnóstico de adenocarcinoma de vesícula biliar foi fortuito na maioria dos casos e a sobrevida desses pacientes foi maior do que aqueles que tiveram diagnóstico pré-operatório da doença.

## **Análise das Hepatectomias para Sarcomas - 17 Anos de Experiência do Instituto Nacional de Câncer**

Santos CER, Gruezo LD, Correia MM, Dias JA.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Sarcomas são tumores raros, de origem mesodérmica que, freqüentemente, chegam em fase avançada aos serviços cirúrgicos. Quando se apresentam com doença metastática, associam-se à sobrevida curta. Vinte a 60% dos pacientes com sarcoma retroperitoneal desenvolverão metástase hepática, o que torna o fígado um dos principais sítios metastáticos. O prognóstico em relação ao tumor primário depende do grau de diferenciação, do tamanho (pior se >5cm) e da idade (pior se >60 anos). O valor da ressecção hepática para metástases hepáticas de sarcoma é ainda desconhecido e, geralmente, são insensíveis à quimioterapia e quimioembolização. Sem tratamento, a média de sobrevida no momento do diagnóstico das metástases hepáticas é de somente 14 meses. O presente estudo analisa retrospectivamente 22 pacientes submetidos a ressecções hepáticas no Instituto Nacional de Câncer (INCA), devido a sarcomas de partes moles metastáticos para o fígado, no período de 1988-2005, com a finalidade de determinar tanto o papel da ressecção hepática em seu tratamento, quanto os fatores influentes na morbimortalidade e sobrevida. Os resultados apontam significativo aumento da sobrevida em pacientes submetidos à ressecção hepática de sarcomas de partes moles metastáticos.

# Modulação da Resistência às Drogas Mediada pelo Sistema Glutation em Linhagens Tumorais Exibindo Diferentes Fenótipos de Resistência

Ferreira ACS, Vasconcelos FC, Silva KL, Maia RC, Kwee JK.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

As alterações da atividade das enzimas da família da Glutathione S transferase (GST) e altas concentrações do seu substrato Glutathione (GSH), além da superexpressão de proteínas inibidoras de apoptose como a survivina são correlacionadas com a resistência a múltiplas drogas (MDR). Neste trabalho, analisou-se, comparativamente, as concentrações de GSH e as atividades da GST nas linhagens tumorais que exibem diferentes fenótipos MDR, avaliando o seu papel nessas linhagens e o seu papel de resistência, utilizando moduladores específicos. A atividade da enzima GST e a concentração de GSH foram monitoradas por espectrofotometria. O ensaio de viabilidade celular foi realizado com K562, K562-lucena, GLC4, GLC4-ADR, MCF7, na presença ou ausência dos quimioterápicos e dos inibidores de GSH (BSO) e de GST (ácido etacrínico). Para a determinação da acumulação intracelular de espécies reativas de oxigênio, utilizou-se a citometria de fluxo, e a expressão da proteína survivina foi determinada por *Western blotting*. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que a inibição da síntese de GSH pode reverter a resistência ao trióxido de arsênico nas linhagens celulares GLC4 e GLC4 - ADR, ao passo que a inibição da GST está relacionada com a reversão da resistência à doxorubicina na linhagem K562. Observa-se que a inibição da síntese de GSH está relacionada à regulação negativa da expressão de survivina nas linhagens GLC4 e GLC4-ADR tratadas com trióxido de arsênico. Os antioxidantes exercem um importante papel na resistência celular a agentes antineoplásicos, sendo responsáveis pela extrusão celular de drogas com diferentes estruturas, indicando ser uma ferramenta importante no tratamento de pacientes que apresentam o fenótipo MDR, portanto resistentes ao tratamento convencional.

## Diversidade Genética de Papillomavirus Humano (HPV) em Amostras Cervicais de Mulheres do Estado do Rio de Janeiro

Lordello CX<sup>1</sup>, Oliveira-Silva M<sup>2</sup>, Zardo LMG<sup>1</sup>, Moreira MAM.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

O câncer do colo do útero é a segunda maior causa de morte. Infecções por HPV têm sido detectadas em 95-100% dos casos de câncer cervical. Os tipos de HPV classificam-se de acordo com o seu potencial oncogênico em: baixo risco - freqüentemente isolados de lesões genitais externas ou de lesões cervicais benignas; e em alto risco - associados com displasias de alto grau e carcinomas. Este estudo se propõe analisar a diversidade genética de amostras cervicais positivas para HPV, relacionando os genótipos virais obtidos com os dados citopatológicos e histopatológicos das mulheres incluídas neste estudo. Para tal, 175 amostras de *swab* de secreção cervical, cedidas pela Seção Integrada de Tecnologia em Citopatologia (SITEC) do INCA, foram neutralizadas e o DNA isolado. Esse material foi então submetido a reações em cadeia da polimerase (PCR), para a amplificação de três regiões do gene L1 do capsídeo viral, nas quais 44 amostras foram amplificadas. Os *amplicons* obtidos foram seqüenciados, e 31 amostras foram tipadas e as seqüências alinhadas para a análise da diversidade genética, utilizando seqüências de referência de banco de dados. Nas análises filogenéticas, foram observadas 13 amostras agrupadas com HPV16, 1 amostra com HPV31, 5 amostras com HPV33 e 6 amostras com HPV66. Foram ainda encontradas 2 amostras com co-infecção de diferentes genótipos, a amostra CH30-A agrupada com HPV83 e CH30-B agrupada com HPV16; e a amostra CH157-A agrupada com HPV16 e CH157-B agrupada com HPV66. Exceto o HPV83, todos os genótipos encontrados são classificados como de alto risco.

# Padrão de Metilação da Linhagem MCF7 nos Promotores de *BRCA1* e *MDR1*

Bagni C, Lourenço JJ, Moreira MAM.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Alteração do padrão de metilação do DNA está entre os fatores associados ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Esse fenômeno está relacionado à inativação (metilação de sítios CpG no promotor) de genes supressores tumorais e à ativação de outros genes (demetilação de CpGs no promotor de proto-oncogenes). Há diversas metodologias para estudar o padrão de metilação, entre elas o tratamento de amostras de DNA com bissulfito de sódio. O presente trabalho mostra a padronização da metodologia para detecção de metilação, utilizando a linhagem celular MCF7 derivada de câncer de mama humano, da qual a região promotora de dois genes (*BRCA1* e *MDR1*) foi estudada. A linhagem celular foi mantida em meio Dulbecco com 10% de soro fetal bovino em 5% de CO<sub>2</sub>. O DNA foi isolado por precipitação salina e 1 a 2µg de DNA foram utilizados para o tratamento com bissulfito de sódio. Dois protocolos foram utilizados: "*CpGenome Fast DNA Modification Kit*" da *Chemicon International*, e outro estabelecido em nosso laboratório. Após a transformação, os DNA foram amplificados por PCR para a região promotora de *BRCA1* e *MDR1*. Foram obtidas boas amplificações com 1, 1,5 ou 2µg de DNA tratado inicialmente. Para o fragmento amplificado de *BRCA1*, foi utilizada amplificação em ninho, resultando em um fragmento de aproximadamente 720 pares de base. O fragmento do promotor de *MDR1* corresponde a uma região de aproximadamente 230 pares de base. Sequenciamento foi feito diretamente dos produtos amplificados, no entanto apenas os fragmentos de *MDR1* resultaram em seqüências de boa qualidade.

*Texto Truncado.*

## Estabelecimento de Culturas de Curta Duração de Células Estromais Humanas Derivadas da Medula Óssea e Análise Preliminar de seu Perfil Proteômico

Costa JAC, Lazzarotto-Silva C, Binato R, Pizzatti L, Abdelhay E.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Existe na medula óssea uma população de células multipotentes, as células-tronco esqueléticas que, quando cultivadas *in vitro*, são conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM). Devido à ausência de marcadores específicos, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs critérios mínimos para definir CTM humanas: aderência ao plástico em condições-padrão de cultivo; expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34 e HLA-DR; diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Trabalhos recentes têm sugerido que a infusão de CTM co-adjuvante ao Transplante de Medula Óssea (TMO) é capaz de melhorar a "pega" e prevenir o desenvolvimento da doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH). Os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar e estabelecer culturas de CTM, determinando-se protocolos específicos, a partir de amostras de doadores de medula óssea; 2) utilizar ferramentas proteômicas para caracterizar molecularmente as CTM. Para isolar CTM, células mononucleares da Medula óssea (MO) de doadores foram colocadas em cultura, em DMEM de baixa glicose (1g/L) e 15% de soro bovino fetal (passagem 0). A densidade inicial de células plaqueadas foi determinada através do plaqueamento de concentrações sucessivas de células mononucleares, e contagem das colônias obtidas após 13 dias. As culturas isoladas foram expandidas após tripsinização, e caracterizadas como CTM de acordo com a definição da SITC. Foram processadas e colocadas em cultura 34 amostras de MO, segundo o protocolo descrito. Das amostras de CTM estabelecidas, foram realizados ensaios de caracterização *in vitro*, utilizando os parâmetros da SITC e, em 95% das culturas testadas, esses ensaios confirmaram o sucesso no protocolo de isolamento e expansão.

*Texto Truncado.*

# A Influência de fatores sociais e da alimentação no desenvolvimento de câncer de próstata (CaP) no Rio de Janeiro

Souza DRS<sup>1</sup>, Sandim V<sup>1,2</sup>, Ornellas AA<sup>1,3</sup>, Quirino R<sup>1</sup>, Alves G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>3</sup>Hospital Mario Kroeff - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

**Introdução:** O papel dos fatores ambientais na gênese do câncer de próstata (CaP) ainda não está bem compreendido; sugere-se que componentes dietéticos específicos, como gorduras e carnes, além do consumo de álcool e o tabagismo sejam possíveis fatores de risco. **Objetivos:** Estabelecer relação de causa-efeito entre os fatores de risco selecionados com o CaP e identificar o perfil dos pacientes acometidos por CaP de dois hospitais públicos do Rio de Janeiro. **Métodos:** Estudo comparativo descritivo entre casos e controles. Como instrumento foi utilizado um questionário a pacientes portadores de CaP (tratados em dois hospitais públicos: Instituto Nacional de Câncer e Hospital Mário Kröeff) e aos controles voluntários (doadores do banco de sangue do INCA). Esse questionário, aplicado de fev/2006 a jun/2007, incluiu informações referentes à idade, etnia, herança genética, tabagismo, etilismo e hábitos alimentares. **Resultados e Conclusões:** Foram entrevistadas 197 pessoas, sendo 159 pacientes e 38 controles; utilizados, até o momento, 38 pares caso-controle, chegando a um n=76. Foram encontrados 52,63% brancos, entre 42-59 anos (84,27%), não possuem herança genética (84,21%), tabagistas (44,73%). Em relação aos hábitos alimentares: consumo de enlatados e embutidos, entre uma e duas vezes/semana, em 39,47% dos pacientes; e a falta do consumo de frutas na dieta diária (39,46%). Em relação ao uso de açúcar refinado, 61,98% dos pacientes consomem-no diariamente. Quanto à alimentação em geral, destaca-se o consumo em larga escala de produtos agressores ao DNA em relação aos produtos protetores, sugerindo que a influência desses fatores pode ser um grande contribuinte no desenvolvimento do CaP.



## Análise de variantes por *splicing* alternativo do gene GBP-2 humano selecionadas por uma abordagem de bioinformática em um painel de linhagens celulares de câncer humano

Machado ACD, Moreira MAM, Ferreira CG, Passetti F, Guimarães DP.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Proteínas ligadoras de guanilatos (GBP) são GTPases de alto peso molecular capazes de se ligar à GTP, GDP e GMP. Foram descritas, até o momento, sete diferentes GBP humanas (HuGBP-1- HuGBP-7) que apresentam dois domínios conservados entre as GTPases, o de ligação aos guanilatos na região N-terminal e outro de isoprenilação na região C-terminal. As GBP mais bem estudadas são GBP-1 e GBP-2. A superexpressão de MuGBP-2 em fibroblastos leva ao aumento da proliferação celular e induz a transformação oncogênica, sendo identificado um aumento da expressão de HuGBP-2 no tumor de esôfago quando comparada ao do epitélio adjacente ao tumor, sugerindo uma relação de GBP-2 com carcinogênese. Foi demonstrada a expressão diferencial de variantes por *splicing* alternativo de *HuGBP-5* em tecidos tumorais. Não existe descrição de variantes por *splicing* alternativo em *GBP-2* com funções e suas expressões diferenciadas. Este trabalho teve como objetivo investigar variantes por *splicing* alternativo no gene *GBP-2* em linhagens celulares originadas de diferentes tecidos tumorais humanos. Utilizando uma base de dados, pode-se verificar indícios de eventos de *splicing* alternativo no gene *GBP-2* através do alinhamento de seus mRNA ao seu respectivo genoma. Foi possível observar quatro variantes por *splicing* alternativo. Dentre estas, a variante *GBP-2d* tem inserção de 12 nucleotídeos e é traduzida em uma proteína com 4 aminoácidos a mais na região C-terminal quando comparada à GBP-2 constitutiva. Para validar a existência dessa variante, a expressão gênica da mesma foi analisada em diferentes linhagens tumorais humanas através de RT-PCR, utilizando *primers* específicos.

*Texto Truncado.*

# Análise da Expressão do Gene Regulado pelos *Interferons Gbp-2* e Mutação do Gene *Tp53* no Carcinoma Epidermóide de Esôfago

Marques CB, El-Jaick KB, Simão TA, Rossini A, Pinto LFR, Moreira MAM, Olmedo DB, Carvalho RT, Ferreira MA, Small IA, Ferreira CG, Guimarães DP.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

A mutação no gene *TP53* é uma das principais alterações genéticas encontradas no carcinoma epidermóide de esôfago (CEE). Já foi demonstrado um aumento significativo da expressão da proteína humana regulada pelos Interferons, HuGBP-2, no tecido tumoral do esôfago quando comparada à expressão no epitélio normal adjacente ao tumor, indicando um possível papel da HuGBP-2 no câncer de esôfago. O presente estudo teve como objetivo principal correlacionar a expressão de GBP-2 em biópsias endoscópicas de tecido tumoral de esôfago e de tecido não-tumoral adjacente com dados clínicos de pacientes com CEE; e analisar a frequência e o padrão de mutação no gene *TP53* nessas amostras. A expressão gênica de *GBP-2* foi quantificada através da PCR em tempo real e as características clinicopatológicas foram obtidas através da revisão dos prontuários. A análise mutacional nos éxons 5-9 do gene *TP53* foi feita pelas técnicas de DHPLC e SSCP. As amostras alteradas foram submetidas ao seqüenciamento automático. Em 13/19 (68,4%) dos pacientes, *GBP-2* apresentou-se mais expresso no tecido tumoral em relação ao tecido não-tumoral adjacente, sendo a média da razão de  $2,58 \pm 2,67$ . A idade mediana dos pacientes foi de 57 anos (41-74 anos), predominando o sexo masculino (78,9%). O seguimento mediano foi de  $15 \pm 2,57$  meses. Dezoito, dentre os 19 pacientes, foram estadiados de acordo com a classificação TNM em: *in situ* - 1 paciente (5,6%); IIA - 7 (38,9%); IIB - 1 (5,6%); III - 6 (33,3%); IVA - 1 (5,6%); IVB - 2 (11,1%). Não houve correlação estatística entre os dados clinicopatológicos com a média da razão T/N.

*Texto Truncado.*

## Identificação de Mutações Germinativas no Gene VHL em Famílias com a Doença de von Hippel-Lindau

Barreto EA<sup>1</sup>, Vidal JPCB<sup>1</sup>, Gomy I<sup>2</sup>, Casali da Rocha JC.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Câncer - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) - Ribeirão Preto (SP), Brasil

O desenvolvimento tumoral é o resultado de alterações genéticas nas quais pode estar envolvida a ativação de proto-oncogenes, assim como a inativação de genes supressores de tumor e de reparo do DNA. A perda da função por mutação germinativa nesses genes dá origem às síndromes de câncer hereditário, como por exemplo, a síndrome de von Hippel-Lindau. Essa síndrome de padrão autossômico dominante é causada por mutações constitutivas no gene *VHL*, e predispõe o paciente ao desenvolvimento de uma série de tumores malignos e benignos. Os sintomas podem aparecer a partir dos primeiros anos de vida e incluem: angioma de retina, hemangioblastoma de sistema nervoso central, feocromocitoma, carcinoma renal do tipo células claras e cistos múltiplos renais, pancreáticos, hepáticos e de epidídimo. A análise molecular das mutações germinativas é uma ferramenta que possibilita o diagnóstico precoce de familiares de afetados que não apresentam sintomas clínicos da doença. Os diagnósticos clínico e molecular da doença baseiam-se em critérios que consideram a história familiar e a apresentação clínica das lesões. Para a análise das mutações foram empregadas técnicas para a extração de DNA genômico de sangue periférico, PCR com uso de *primers* específicos para o gene *VHL* e seqüenciamento das regiões amplificadas por PCR. Das 19 famílias estudadas até o momento, foram identificadas oito mutações diferentes (pequenas deleções, *frame shift*, *nonsense*, *missense* e sítio de *splicing*) nos probandos. O teste preditivo foi aplicado aos familiares assintomáticos sob risco. Em 8 familiares estudados, 4 eram portadores de mutação e foram incluídos em um programa de rastreamento de lesões.

*Texto Truncado.*

# Geração de Células Citotóxicas contra a Leucemia e Utilização do Sistema de Gene Suicida CD20/Rituximab para o Enriquecimento e Eliminação das Células Alo-reativas

Chicaybam L<sup>1</sup>, Leal AC<sup>1</sup>, Bonamino M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

A utilização de componentes do sistema imunológico para o tratamento das leucemias representa uma alternativa promissora. Um dos tratamentos baseado nessa estratégia é a infusão de linfócitos do doador (DLI), que tem tido particular sucesso na leucemia mielóide crônica (LMC), mas não se mostrou eficaz quando utilizado em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). O objetivo desse projeto é a geração de linfócitos T específicos contra o tumor que podem, hipoteticamente, ser utilizados na eliminação de clones leucêmicos residuais, evitando uma recaída do paciente após Transplante de Medula Óssea (TMO) ou tratamento com quimioterápicos. Neste modelo experimental, incubaram-se células dendríticas (DC) com células leucêmicas CD40L+ em apoptose e depois com linfócitos T. Nesse sistema, o CD40L atua como sinal maturativo para a DC e os corpos apoptóticos como fonte de antígenos, ativando e induzindo a proliferação dos linfócitos responsivos. Para isso, DC foram geradas a partir de monócitos purificados de doadores saudáveis, apresentando uma média de 52% (20%-95%) de expressão de CD1a (marcador de DC) após sete dias de cultura. A cinética de proliferação de linfócitos T em um contexto autólogo foi estabelecida com base na diluição do corante CFSE. Nesse experimento, as DC maduras (média de 34% de expressão de CD83) induziram uma maior resposta proliferativa das células T, entre os dias 3 e 5, após o início do co-cultivo, nos quais aproximadamente 40% dos linfócitos tornaram-se CFSE<sup>low</sup>. Para diminuir as chances de desenvolver doença enxerto-contra-hospedeiro após a transferência desses linfócitos, o sistema de gene suicida CD20/Rituximab será utilizado.

*Texto Truncado.*

## Mecanismos Inibitórios de Granulócitos Ativados sobre a Doença Enxerto-Contra-Hospedeiro em Modelos Experimentais

Galvani RG<sup>1</sup>, Lemos R<sup>1,2</sup>, Vasconcelos Z<sup>1,2</sup>, Bonomo A<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

A doença enxerto-contra-hospedeiro aguda (DECHA) é a principal complicação do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH). As principais fontes de CTH são a medula óssea e o sangue periférico mobilizado com G-CSF (SG-G). Recentemente demonstrou-se que a fração de baixa densidade de SG-G possui por volta de 85% de granulócitos (GDB). Essas células além de inibirem a atividade de células T *in vitro*, *in vivo* inibem a DECHA experimental. O mecanismo de ação *in vivo* é pouco claro, pois sabe-se que a meia-vida dessas células é muito curta para manter a inibição de uma doença que pode se manifestar até 100 dias pós-transplante. Uma possibilidade seria a ação dos GDB sobre a infecção inicial, conseqüente à radioterapia que permite a translocação de bactérias intestinais e seus produtos que ativarão as células da imunidade inata favorecendo a ativação das células T. O objetivo do trabalho foi estudar qualitativa e quantitativamente a atividade fagocítica e ativação dos GDB tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, os resultados preliminares indicam que tanto a atividade fagocítica quanto o metabolismo oxidativo de GDB são quatro vezes mais alto do que os granulócitos não tratados com G-CSF. *In vivo*, foram examinados os linfonodos mesentéricos de animais irradiados que receberam ou não GDB (24 horas após) quanto à presença ou não de bactérias intestinais. Encontrou-se uma enorme variabilidade nos ensaios em cultura de Agar-sangue, levando a procurar outras técnicas para abordar o assunto.

# Estudo para a Transdução Preferencial de Linfócitos Alo-ativados com o Sistema de Gene Suicida para o Tratamento da Doença Enxerto-Contra-Hospedeiro

Leal AC<sup>1</sup>, Chicaybam L<sup>1</sup>, Bonamino M<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

A doença enxerto-contra-hospedeiro é o fator responsável pelas elevadas taxas de mortalidade e morbidade pós-transplante alogênico de precursores hematopoéticos. Este efeito, exercido pelo reconhecimento por parte de células T do doador contidas no enxerto de antígenos expressos nos tecidos do receptor, acomete cerca de 70% dos pacientes submetidos a esse tipo de tratamento. A simples eliminação das células T do enxerto previne o desenvolvimento da DECH, mas está associada ao aumento nos índices de recorrência da doença de base. Assim, são necessários protocolos nos quais se possa controlar os efeitos exercidos por essas células no hospedeiro. Neste trabalho, propõe-se a introdução de um gene suicida nas células T, por meio da utilização de vetores retrovirais, de modo que essas células possam ser eliminadas quando for conveniente. Para tal, foram estabelecidos protocolos para a produção e concentração dos vetores lentivirais e derivados do MuMLV. Foi também determinada a melhor forma de fornecer o estímulo alogênico às células T, através de células dendríticas maduras ou imaturas ou através de esplenócitos irradiados. Para isso, foram desenvolvidos protocolos para a geração de células dendríticas e indução de maturação nessas células. A avaliação da cinética de proliferação dos linfócitos revelou que o estímulo vis DC madura parece ser o mais apropriado, com a proliferação dos linfócitos ocorrendo entre os dias +3 e +5 pós-estímulo. Além disso, determinou-se a relação entre DC e linfócito T que gera a melhor resposta proliferativa, sendo a proporção 1/5 a melhor condição. Baseado nestes dados, realizou-se a transdução de linfócitos T nas condições estabelecidas.

## Rastreamento de Mutações no Éxon 4 do Gene *GATA1* em Desordens Hematológicas

Herszterg SH, Amorim M, Pombo-de-Oliveira MS.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Doenças hematológicas herdadas e adquiridas foram associadas a mutações em diferentes regiões do gene *GATA1*. Este gene está localizado no cromossomo X e codifica a proteína GATA-1, fator de transcrição imprescindível para a diferenciação eritrocítica e megacariocítica. Mutações no éxon 4 do *GATA1* foram descritas em doenças hematológicas herdadas, exemplificadas pelas anemias refratárias e trombocitopenias ligadas ao X. Mutações nos éxons 2 e 3 foram identificadas em desordens hematológicas clonais de crianças portadoras de Síndrome de Down (SD), como a leucemia megacarioblástica (LMA-M7) e a leucemia transitória (LT). No entanto, um estudo anterior demonstrou uma mutação até então não descrita em um caso de LMA-M7/LT não acompanhado de SD. Embora os resultados desse estudo quanto às mutações do *GATA1* em LMA-M7/LT encontradas na coorte brasileira corroborassem os estudos internacionais, 35% das crianças com SD e alterações hematológicas não apresentavam alterações no éxon 2. Além disso, recentemente, Holanda et al. identificaram a presença de uma mutação no éxon 2 do *GATA1* em indivíduos com anemia e trombocitopenia idiopáticas sem SD. Este fato gerou a hipótese de que mutações no éxon 4 do gene *GATA1*, associadas até então às anemias e trombocitopenias ligadas ao X, possam estar envolvidas nos casos de SD sem alteração no éxon 2, assim como em outras doenças malignas acompanhadas ou não de SD. Este trabalho se propõe à análise do éxon 4 do *GATA1* em amostras caracterizadas como distúrbios hematológicos que afetam as linhagens eritrocítica e megacariocítica, tanto em indivíduos portadores de SD como em indivíduos não-sindrômicos, a partir do rastreamento de mutações feito através do dHPLC, seguido de seqüenciamento automático.

*Texto Truncado.*

# Análise Fenotípica da Superexpressão de Claudinas em Células HEK 293T

Souza PS, Tanaka MN, Cruz ALS, Viola JPB, Morgado-Díaz JA.  
Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Proteínas da família das claudinas compreendem proteínas integrais de membrana que formam as junções *tight* em células epiteliais, conferindo-lhes polaridade e permeabilidade seletiva. O aumento e a diminuição da expressão dessas proteínas parecem contribuir no processo migratório e invasivo em diversos tipos de tumores. Este estudo visa a estabelecer uma metodologia para superexpressar claudinas em células embrionárias de rim humano, HEK 293T e avaliar alterações nos padrões morfológicos, proliferativos e de diferenciação celular. Esta linhagem celular foi escolhida por ser de origem epitelial e de viável transfecção. Análises iniciais por *immunoblotting* mostraram que essa linhagem não expressa claudinas -1 e -3 e, através de microscopias de contraste de fase e eletrônica de transmissão, verificou-se o crescimento indiferenciado dessas células, ausência de polaridade celular e não-apresentação de junções *tight*. O ensaio de vermelho de rutênio que visa a analisar a permeabilidade paracelular dessas células confirmou a não-funcionalidade das junções *tight*. Para superexpressar claudinas -1 e -3, os vetores pCCL1 e NGFP-mCld3 (cedidos pelo Dr. Mikio Furuse, Universidade de Kyoto - Japão) foram transfectados por precipitação de DNA com fosfato de cálcio. Os vetores enviados foram seqüenciados utilizando os *primers* 3'-TCGGCTTCTGGCGTGTGAC-5' e 5'TCAGTGGTATTTGTGAGCCAG-3' para a confirmação dos insertos. A superexpressão da claudina-3 foi confirmada por citometria de fluxo pela detecção da fluorescência do gene repórter EGFP fusionado à proteína. Para claudina-1, essa análise foi feita por *immunoblotting*. A localização das claudinas, analisada por microscopia de fluorescência, 48 horas após a transfecção, mostrou marcação de claudina-1 tanto no citoplasma quanto nos contatos intercelulares, enquanto que a marcação de claudina-3 foi observada somente nos contatos intercelulares.

*Texto Truncado.*