Ana Elizabete Silva

Estudo citogenético e molecular em doenças genéticas humanas



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Elizabete Silva

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS

1910001316

Texto apresentado ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Livre-Docente em Genética Humana.

São José do Rio Preto – SP

2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Elizabete Silva

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM DOENÇAS GENÉTICAS HUMANAS



t. 1.316/04

Texto apresentado ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Livre-Docente em Genética Humana.

São José do Rio Preto – SP

2004

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída".

MAHATMA GANDHI

Ao meu esposo, João Ricardo, e aos meus filhos, Davi e Viviane, pelo amor e compreensão em todos esses anos...

CERTEZA De tudo, ficaram três coisas: - A certeza de que estamos sempre começando... - A certeza de que precisamos continuar... - A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar... Portanto devemos: - Fazer da interrupção um caminho novo... - Da queda um passo de dança... - Do medo, uma escada... - Do sonho, uma ponte... - Da procura, um encontro...

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Aos alunos, estagiários e pós-graduandos que convivi durante esses anos e com os quais também aprendi.

Aos atuais pós-graduandos Lucimari, Fernanda e Márcia, pela colaboração inestimável.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Josué Rodrigues dos Santos e Simone Carvalho Fernandes, pela presteza e ajuda nesses anos de trabalho.

Aos colegas do Departamento de Biologia, pelo convívio agradável e por compartilharem tantos momentos nessa caminhada.

Às Professoras Doutoras Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Eloiza Helena Tajara da Silva, Cláudia Márcia Aparecida Carareto, Maria Tercília Vilela Azeredo Oliveira e Mary Matsumi Oyama, pela amizade e incentivo, contribuindo de alguma forma para meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor Doutor Sebastião Roberto Taboga, Chefe do Departamento de Biologia, pela conduta no encaminhamento das providências necessárias para a realização do Concurso.

À Direção desta Instituição, representada pelo Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri e Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela seriedade e competência.

Aos funcionários e corpo administrativo, em especial à Seção de Pós-Graduação, Seção Técnica Administrativa e Biblioteca, pelo desempenho em suas atividades.

Ás amigas e colaboradoras Professoras Doutoras Agnes Cristina Fett-Conte e Eny Maria Goloni Bertollo, pelo convívio e amizade ao longo desses anos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES, CNPq e FUNDUNESP, pelo suporte financeiro na forma de auxílios e bolsas, possibilitando a realização das pesquisas.

A todos aqueles que contribuíram para minha formação estimulando, impulsionando e tornando está trajetória mais agradável.

Ao meu esposo, João Ricardo, e aos meus filhos, Davi e Viviane, pelo carinho e amor recebido, o bem maior.

PREFÁCIO

O texto ora apresentado está organizado na forma de capítulos, que correspondem aos trabalhos desenvolvidos e publicados nas linhas de pesquisa, Genética de Doenças Humanas e Genética e Câncer, a partir de 1994, referindo-se o último capítulo as pesquisas em andamento.

O Capítulo I enfoca as pesquisas em autismo e outros transtornos invasivos do desenvolvimento. O interesse nessa área surgiu a partir de um contato inicial com um grupo de profissionais que atua na Escola Municipal do Autista, em São José do Rio Preto, que me procurou em busca de informações sobre o envolvimento de fatores genéticos no autismo. Juntamente com a colaboração da Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte, da Faculdade de Medicina de S. J. Rio Preto, elaboramos um projeto para avaliação clínica e genética dos indivíduos daquela escola que apresentavam autismo e outros transtornos invasivos do desenvolvimento que, posteriormente, foi estendido para outras escolas e clínicas particulares. Houve, então interesse daqueles profissionais em formar um grupo de pesquisa, possibilitando um estudo multidisciplinar e discussões mais abrangentes e enriquecedoras com a experiência de cada um na sua área de pesquisa. Esse grupo, do qual tenho participado, tem contribuído na realização dos projetos. Portanto, neste capítulo há uma breve introdução atualizada sobre os aspectos genéticos mais relevantes associados na etiologia do espectro autístico, com destaque os principais resultados encontrados nesses projetos, acompanhada por oito artigos, dos quais quatro já publicados, e os outros quatro submetidos à publicação. O primeiro artigo trata-se de uma revisão ampla sobre o assunto e nos demais, encontram-se os resultados obtidos pela avaliação clínica, citogenética e molecular nos indivíduos estudados.

Concomitantemente às pesquisas com autismo, também foram iniciados os trabalhos em genética do câncer, primeiramente com tumores ósseos e câncer de bexiga, mas, posteriormente, concentrando-se nos cânceres de esôfago e gástrico. Os trabalhos foram apresentados seqüencialmente conforme o desenvolvimento das pesquisas, constando, portanto, no Capítulo II, treze artigos e uma pequena introdução sobre os aspectos gerais dessas neoplasias e a relevância dos resultados obtidos. Foram publicados alguns artigos de revisão enfocando os aspectos genéticos relacionados aos tipos de



tumores avaliados, atendendo, dessa forma, o interesse dos médicos que têm colaborado nesses projetos, por esses temas específicos. Dos treze artigos apresentados, seis já estão publicados e os demais *in press* ou submetidos à publicação. Os estudos em carcinoma do esôfago e megaesôfago chagásico e em adenocarcinoma gástrico e lesões gástricas benignas revelaram alterações genéticas interessantes nas lesões benignas com potencial pré-canceroso, indicando a necessidade de realização de exames genéticos nesses tipos de lesões, podendo, assim, auxiliar, mais precocemente, na detecção de uma condição maligna.

O último capítulo apresenta as perspectivas futuras, com um resumo e objetivos dos projetos em andamento. Essas pesquisas focam avaliações citogenéticas, moleculares e imuno-histoquímicas em oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos no controle da proliferação celular e na expressão das proteínas correspondentes, assim como a avaliação de polimorfismos em genes de reparo do DNA. Todos esses eventos, com possível relação à carcinogênese gástrica, do esôfago e do megaesôfago chagásico.



SUMÁRIO

I. CAPÍTULO I

INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM AUTISMO E OUTROS TRANSTORNOS INVASIVOS DO DESENVOLVIMENTO.. 10

1. Introdução..... 10
2. Relevância da genética na etiologia do autismo..... 15
3. Polimorfismos cromossômicos das regiões organizadoras de heterocromatina constitutiva e organizadora de nucléolo em distúrbios autísticos e síndrome de Down..... 23
4. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with Pervasive developmental disorders..... 35
5. Tetrasomy 15q11-q13 identified by fluorescence *in situ* hibridization in a patient with autistic disorder..... 42
6. Investigação de malformações físicas menores em portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento..... 47
7. Analysis of familial aggregation of the broad phenotypes in relatives of patients with Pervasive Developmental Disorders..... 61
8. Syndrome of Cohen associated with autism..... 72
9. MOMO Syndrome associated with autism: a case report..... 78

II. CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM NEOPLASIAS HUMANAS E LESÕES BENIGNAS PRÉ-CANCEROSAS.. 84

1. Introdução..... 84
2. Aspectos genéticos-moleculares dos tumores ósseos..... 93
3. *TP53* mutations in a recurrent unicameral bone cyst..... 101
4. Carcinoma de células transicionais da bexiga (CCT): detecção precoce de alterações genéticas como fator diagnóstico e prognóstico da progressão tumoral..... 103

5. Chromosomal aneuploidies in bladder cancer, chronic cystitis and normal urothelium detected by fluorescence *in situ* hybridization..... 117
6. A acalasia e o câncer esofágico..... 123
7. Cytogenetic alterations in chagasic achalasia compared with esophageal carcinoma..... 125
8. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica..... 131
9. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma..... 138
10. Aneuploidies, deletion and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer..... 155
11. Genetic alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. 161
12. *GSTT1, GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a brazilian population..... 179
13. Apoptose: implicações na carcinogênese gástrica..... 185
14. Apoptosis in different gastric lesions and association with *Helicobacter pylori*, aneuploidy and expression of p53..... 210

III. CAPÍTULO III

PERSPECTIVAS FUTURAS..... 239

1. Estudo da amplificação, expressão e localização dos oncogenes *Ciclina D1* e *c-ERBB2* nos domínios interfásicos cromossômicos em tumores de esôfago e estômago pela técnica de FISH..... 239
2. Avaliação de polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* e suscetibilidade ao câncer gástrico..... 244
3. Investigação molecular dos genes *TP53, FHIT* e *MTS-1* em megaesôfago chagásico e associação com variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi*..... 247

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 251

CAPÍTULO I

INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM AUTISMO E OUTROS TRANSTORNOS INVASIVOS DO DESENVOLVIMENTO

1. INTRODUÇÃO

O autismo também conhecido como distúrbio autístico ou Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID) não é uma doença, mas uma síndrome complexa com múltiplas causas genéticas e não genéticas (MUHLE et al., 2004). No grupo de TID, juntamente com o autismo, estão incluídos as síndromes de Asperger e de Rett, o Transtorno Desintegrativo da Infância e o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento não-especificado. Conforme o DSM-IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000) e CID-10 (WHO, 1992), o autismo é caracterizado por prejuízos em três domínios comportamentais, ou seja, interação social; linguagem, comunicação e jogos imaginativos; e um repertório restrito de interesses e atividades.

Dependendo dos critérios de inclusão, a prevalência do autismo tem variado de 40 a 130 casos para 100.000 (GILLBERG; COLEMAN, 1992; FOMBONNE, 2002), ocupando o terceiro lugar entre os distúrbios do desenvolvimento. Estudos recentes sugerem que a prevalência do TID possa ser de dois a cinco casos para 1.000 (WING; POTTER, 2002), com uma taxa sexual de três homens afetados para cada mulher (FOMBONNE, 2003). No período de 1991 a 1997, o Departamento de Serviços do Desenvolvimento dos Estados Unidos relatou um aumento de 556% na prevalência do autismo (STOKSTAD, 2001), taxa essa, maior que as taxas de prevalências relatadas para outras doenças pediátricas como a espinha bífida, o câncer e a síndrome de Down (FILIPEK et al., 1999). A explicação mais provável é que o aumento no número de pessoas diagnosticadas se deva a um maior reconhecimento desses transtornos em crianças menos gravemente afetadas e as diferenças nos critérios diagnósticos (GADIA, et al., 2004; MUHLE et al., 2004).

Estudos epidemiológicos indicam a participação de fatores ambientais como exposição a tóxicos, teratógenos, insultos perinatal e infecção pré-natal como rubéola e citomegalovírus, na etiologia do autismo. Contudo, há forte associação do autismo e a participação de múltiplos fatores genéticos, como alterações citogenéticas e doenças monogênicas e cromossômicas como a esclerose tuberosa (ET), a síndrome do X frágil (FRAXA) e outras doenças raras (MUHLE et al., 2004, para revisão). Embora seja observada a associação entre autismo e diversas condições patológicas, genéticas ou não genéticas, juntas, elas são responsáveis por uma pequena minoria, provavelmente menos de 10% dos indivíduos com autismo (CHAKRABARTI; FOMBONNE, 2001; FOMBONNE, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

O envolvimento dos fatores genéticos como agentes causais nos casos de autismo isolado apóia-se em algumas evidências, como concentração em determinadas famílias, alta concordância em gêmeos monozigóticos (MZ) e associação com alguns quadros sindrômicos de etiologia genética. A taxa de recorrência na irmandade de indivíduos afetados é de 2% a 8%, muito maior que a taxa de prevalência na população geral (CHAKRABARTI; FOMBONNE, 2001). Estudos em gêmeos têm relatado uma concordância de 60% em MZ e nenhuma concordância em gêmeos dizigóticos (DZ). Além disso, quando o gêmeo não afetado foi reavaliado para fenótipos autísticos mais amplos, incluindo habilidades de comunicação e distúrbios sociais, a concordância entre gêmeos MZ aumentou de 60% para 92%, enquanto para os DZ, foi de 0% para 10% (BAILEY et al., 1995; LE COUTEUR et al., 1996). Os achados de agregação familial de variantes menores, como distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio de comunicação e fobias sociais em membros da família de pacientes com autismo, mostram que os genes para autismo conferem suscetibilidade variável para a gravidade do quadro e que esse distúrbio é geneticamente heterogêneo, com mais de um mecanismo biológico envolvido. Esses estudos referem um amplo espectro fenotípico para o autismo, que segregaria independentemente em parentes (PIVEN et al., 1997; HOLLANDER et al., 2003)

Apesar das evidências genéticas dos estudos descritos, ainda não foram identificados, quais e quantos genes estão envolvidos na etiologia do autismo. Informações sobre a triagem do genoma inteiro, em famílias com mais de um membro afetado, indicam a participação de mais de 10 genes interagindo para causar o autismo (RISCH et al., 1999). A ampla variabilidade fenotípica dos distúrbios autistícos refletem possivelmente, a interação de múltiplos genes em genomas individuais, a existência de genes distintos e as combinações gênicas entre os indivíduos afetados.

Os parentes de afetados com outros distúrbios do desenvolvimento relacionados, mas não diagnosticados como autismo, podem ter herdado alguns dos genes de suscetibilidade, encontrados no membro afetado, ou ter o mesmo grupo de genes de suscetibilidade, mas sem exposição ao mesmo fator ambiental "ativador" para o autismo (MUHLE et al., 2004).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

As várias patologias associadas com o TID suportam a hipótese de que as manifestações comportamentais, que definem este complexo de sintomas, podem ser secundárias a uma grande variedade de insultos no cérebro.

Estudos citogenéticos podem direcionar as investigações moleculares indicando anomalias cromossômicas relevantes herdadas ou *de novo* em indivíduos afetados ou familiares. Essas regiões são, então, avaliadas para a presença de genes que potencialmente estejam envolvidos na patogênese do autismo. Dentre as alterações citogenéticas destaca-se a região 15q11-q13, relatada em pacientes com autismo em 1% a 4%, devido às duplicações, deleções e inversões desse lócus (COOK et al., 1998; SCHROER et al., 1998). As duplicações freqüentemente ocorrem como repetições intersticiais em tandem ou como cromossomo 15 isodicêntrico supernumerário, levando à trissomia ou à tetrassomia de genes em 15q11-q13 (SUTCLIFFE; NURMI; LOMBROSO, 2003). Outra região, freqüentemente relatada, é a 7q31-32, relacionada com distúrbio severo de linguagem (SHAO et al., 2002), sendo postulado a existência de um lócus de suscetibilidade ao autismo, denominado AUTS1, em membros da família de afetados, por meio de estudos de ligação (BRADFORD et al., 2001).

Os genes candidatos que estão envolvidos na etiologia do autismo são genes, cujos produtos desempenham função no desenvolvimento cerebral ou estão associados com estruturas cerebrais, neurotransmissores ou neuromoduladores. Entre os genes candidatos, além do *FMR1* (Xq27.3), responsável pela síndrome do X frágil, e dos genes *TSC1* (9q34) e *TSC2* (16p13.3), pela esclerose tuberosa, encontram-se os genes *FOXP2, RAY1/ST7, IMMP2L, RELN,* receptores de glutamato *GRM8, CADPS2* e *WNT2*, localizados em 7q22-q33, no lócus AUTS1, e os genes da subunidade do receptor *GABA* e *UBE3A,* na região 15q11-q13 (MUHLE et al., 2004, para revisão).

O autismo é, portanto, um transtorno genético complexo e, com base nos estudos colaborativos de genoma, tem sido sugerido que entre 5 a 100 lócus possam estar envolvidos na suscetibilidade aos transtornos autísticos (GADIA et al., 2004).

Algumas pesquisas têm mostrado que o diagnóstico precoce e a intervenção, significantemente melhora o prognóstico de indivíduos com autismo (FILIPEK et al., 2000; MOORE; GOODSON, 2003). Os programas de intervenção precoce podem fazer uma diferença importante e produzir ganhos significativos e duradouros. Deve ser considerado

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

que indivíduos com autismo e com outras patologias associadas, tais como ET e síndrome do X frágil, terão um prognóstico pior em relação àqueles sem distúrbios severos associados, mas tal fato não tem sido claramente demonstrado. No entanto, essas e outras síndromes devem ser investigadas, para o esclarecimento adequado da família.

Considerando a complexidade do desenvolvimento do cérebro e do comportamento humano, com o envolvimento de múltiplos genes e proteínas, ainda há muito a ser investigado sobre a disfunção cerebral que leva ao autismo.

Nesses oito anos de pesquisas com autismo, nosso grupo avaliou cerca de 80 indivíduos e possui oito artigos publicados ou submetidos, sendo o primeiro deles, **Artigo I.2** (ESTÉCIO; FETT-CONTE; SILVA, 2000), um artigo de revisão sobre os aspectos genéticos do autismo. Inicialmente, analisamos 30 indivíduos com autismo e outros transtornos invasivos do desenvolvimento para detectar a presença de polimorfismos cromossômicos, cujos resultados estão publicados no **Artigo I.3** (COLOMBO; FETT-CONTE; SILVA, 2000), e de anomalias cromossômicas, inclusive com pesquisa do cromossomo X frágil e de avaliação molecular para detecção de mutação dinâmica no gene *FMR-1,* pela técnica de PCR nos indivíduos do sexo masculino, com resultados publicados no **Artigo I.4** (ESTÉCIO et al., 2002). Dois indivíduos apresentaram a síndrome do cromossomo X frágil, confirmada molecularmente, e outros dois apresentaram alterações cromossômicas, consistindo em cromossomo extranumerário der(15) e em mosaicismo 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36). Essa última anomalia ainda não tinha sido descrita em associação com autismo. Portanto, com a revelação de alterações genéticas em 13% dos indivíduos avaliados, foi possível esclarecer a etiologia da doença e dessa forma, informar o risco de recorrência para a irmandade. Inclusive, em uma das famílias de paciente diagnosticado com FRAXA, foram identificados dois outros irmãos também afetados, institucionalizados na APAE de São José do Rio Preto, e uma irmã portadora heterozigota da mutação. Todos não tinham, ainda, diagnóstico confirmado.

O cromossomo extranumerário derivado do 15 foi, posteriormente, indentificado em outra paciente com quadro autístico, que não fazia parte da amostra inicial, e esse estudo foi publicado conforme pode ser verificado no **Artigo I.5** (SILVA et al., 2002). Com o auxílio da técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), foi evidenciada a tetrassomia da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

região 15q11-q13. A ocorrência dessa alteração tem sido associada com os distúrbios autísticos, constituindo outra anomalia que deve ser pesquisada neste grupo de indivíduos.

Com os resultados consistentes, obtidos anteriormente, investigamos uma amostra maior, com 48 indivíduos, visando também a uma avaliação clínica minuciosa e aos antecedentes famílias para pesquisa de distúrbios psiquiátricos. Os resultados advindos dessa pesquisa foram organizados em quatro artigos submetidos para publicação (**Artigos I.6, I.7, I.8 e I.9**), relatados, resumidamente a seguir. Nesses indivíduos foram observadas malformações físicas menores, principalmente de crânio e de face, **Artigo I.6** (GIUNCO et al., 2004a, *submitted*), e uma freqüência aumentada de distúrbios psiquiátricos em seus parentes, sendo, freqüentemente, observada a depressão, **Artigo I.7** (GIUNCO et al., 2004b, *submitted*). Os achados genéticos evidenciaram oito pacientes com a síndrome do X frágil, avaliados molecularmente, um com mosaicismo 46,XX/45,X, confirmado pela técnica FISH, e outros dois pacientes com associações com síndromes gênicas não descritas na literatura, as síndromes de Cohen, **Artigo I.8** (GIUNCO et al. 2004c, *submitted*) e de MOMO, **Artigo I.9** (GIUNCO et al., 2004d, *submitted*). Justificando, portanto a avaliação genético-clínica em portadores de TID, que pode auxiliar no esclarecimento da etiologia e do espectro fenotípico dos afetados, com implicações diretas no aconselhamento genético para as famílias.

2. RELEVÂNCIA DA GENÉTICA NA ETIOLOGIA DO AUTISMO

Relevância da genética na etiologia do autismo

Relevance of genetics in autism etiology

Marcos Roberto Higino Estécio[1], Agnes Cristina Fett-Conte[2], Ana Elizabete Silva[3]

Resumo

O autismo constitui uma das principais patologias integrantes dos transtornos invasivos do desenvolvimento. É caracterizado por atraso e desvio do desenvolvimento social, de comunicação e cognitivo e se manifesta precocemente. Atualmente, é reconhecida a participação de fatores genéticos em sua etiologia. Esse distúrbio não segue padrões clássicos de herança mendeliana e apresenta grande heterogeneidade genética. Entre as síndromes gênicas observa-se forte associação com a síndrome do cromossomo X frágil (gene FMR-1) e com a esclerose tuberosa. Um número crescente de trabalhos têm relatado a ocorrência de anomalias cromossômicas em autismo, incluindo cromossomos extranumerários derivados do 15, envolvendo a região 15q11-q13 e o cromossomo 7. Na região 15q11-q13 encontram-se genes cujos produtos atuam no sistema nervoso central e que são subunidades de receptores de neurotransmissores ou de canais de íons (UBE3A, GABRA5, GABRB3, GABRG3, CHRNA7 e ITO). Algumas regiões do cromossomo 7 também contêm genes (EN-2 e HOXA) importantes para o desenvolvimento (homeogenes), com atuação na formação do sistema nervoso central. Os cromossomos 7, 15 e X, portanto, parecem conter genes relacionados com a etiologia do autismo, cuja avaliação genética pode gerar conhecimentos sobre os mecanismos biológicos envolvidos neste grave distúrbio.

Unitermos: autismo; genética; cromossomo X frágil; cromossomo 7; cromossomo 15

Summary

Autism constitutes one of the most important pathologies of the pervasive developmental disorders (PDDs). It has early age-onset and is characterized by delay and deviance of social, communicative and cognitive development. Today, the presence of genetic factors in its etiology is well known, with familial recurrence of autism and other psychiatric conditions. Autism does not have usual Mendelian inheritence and presents genetic heterogeneity. Strong association has been found between autism and the fragile X syndrome (FMR-1 gene) and with tuberous sclerosis (Bourneville's syndrome). However, many different chromosomal abnormalities were recently described in autistic patients, mainly of chromosome 7 and 15. There are some genes on 15q11-q13 whose products have expression in the central nervous system, mainly synapses, which are subunits of neurotransmitters or ion channels (UBE3A, GABRA5, GABRB3, GABRG3, CHRNA7 e ITO). Some regions of chromosome 7 also have important developmental genes, as EN-2 and HOXA, which act on central nervous system formation. There seems then to exist genes associated with autism etiology on chromosomes 7, 15 and X. The detailed study of these chromosomes can produce knowledgment about the biological mechanisms involved in this disturbance.

Uniterms: autism; genetic; fragile X syndrome; chromosome 7; chromosome 15

[1] Mestre em Genética, doutorando do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Genética, IBILCE/UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Bolsista FAPESP
[2] Professor Adjunto do Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina – FAMERP, São José do Rio Preto-SP
[3] Professor Assistente Doutor do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, SP

Recebido em 1.7.99
Aprovado em 9.6.00

© 2000 — MCR-Editora Científica Nacional Ltda

Aspectos gerais do autismo

O autismo é uma afecção classificada entre os transtornos invasivos do desenvolvimento. Afeta cerca de dois a cinco indivíduos em cada 10.000 da população em geral. Há desvio na taxa sexual, com três a quatro homens afetados para cada mulher, o que sugeriu inicialmente a presença de pelo menos um loco ligado ao cromossomo X relacionado à sua manifestação[43].

As crianças autistas apresentam, desde seus primeiros meses de vida, comportamento retraído e tímido, sendo comum a rejeição à amamentação e ao toque. A manifestação dessa afecção ocorre invariavelmente antes dos três anos de idade, o que é considerado um fator diagnóstico fundamental. Dentre suas características mais importantes destacam-se os padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, a fala ausente ou pouco desenvolvida, com vocabulário restrito e normalmente utilizado de forma inadequada, as brincadeiras e os gestos estereotipados, com movimentos constantes e repetitivos de mãos e do corpo, assim como a fixação por objetos giratórios e pelas partes de objetos, em vez do todo. Em situações de mudanças de rotina esses indivíduos geralmente têm acessos de fúria[36].

Fisicamente, os indivíduos com autismo não apresentam um quadro característico, podendo ser observadas algumas anomalias discretas. Quando foram comparadas crianças normais, autistas e crianças portadoras de outras anomalias do desenvolvimento com suas irmandades, foi verificado que o grupo de autistas apresentava alguns sinais, como rotação posterior do ouvido externo, pés pequenos, mãos de tamanho aumentado, redução da distância interpupilar, sem contudo haver redução da distância intercantal ou da circunferência craniana[59].

O autismo foi inicialmente descrito pelo psiquiatra Léo Kanner, em 1943, tendo sido considerado uma característica psicodinâmica, desenvolvida em resposta a estímulos ambientais, principalmente o familial. Posteriormente, em 1968, o próprio Kanner reconheceu que o autismo era decorrente de defeito inato e que a abordagem psicodinâmica era insuficiente para explicar todas as suas características. Essa conclusão reforçou as suposições de causas orgânicas e genéticas na etiologia dessa afecção[9].

Várias condições médicas estão associadas ao autismo e podem ter papel significativo na sua manifestação. Dentre os fatores pré e perinatais avaliados destacam-se a ocorrência de infecções durante a gestação, como rubéola, toxoplasmose e citomegalovírus, hipotiroidismo congênito, complicações durante a gravidez e o parto, toxemia, uso de medicamentos, prematuridade e baixo peso ao nascimento[45].

As anomalias neurológicas são freqüentes em autismo. A associação com retardo mental é relatada em aproximadamente 75% dos casos, convulsões em 15% a 35% e eletroencefalograma anormal em 20% a 50% dos mesmos[61]. Em um estudo com 40 crianças autistas, De Long e Nohria[14] encontraram 50% delas com alterações neurológicas que incluíram malformações cerebrais, epilepsia pós-encefalite e epilepsia sem origem neurológica determinada.

As regiões do sistema nervoso central encontradas como alteradas em autistas são principalmente o cerebelo e os lobos temporais e parietal[12, 40, 44]. Os lobos temporais contêm uma variedade de neurônios especializados na recepção e compreensão da identidade facial, de expressões, de gestos e de ações afetivas. A compreensão desses sentimentos tem papel fundamental no comportamento social e seus significados são memorizados no hipocampo. Uma vez que a interação social se desenvolve com o aprendizado, consistindo na recepção dos estímulos sócio-emocionais, na sua compreensão e memorização, presume-se que as anomalias nas áreas cerebrais envolvidas nesses processos podem predispor o indivíduo ao autismo[54]. Alguns indivíduos portadores da esclerose tuberosa, síndrome autossômica dominante caracterizada por lesões hamartomatosas em diferentes órgãos (mais notavelmente em sistema nervoso central, pele, retina, rins e coração), apresentam autismo ou sinais autísticos[42]. Nesses indivíduos, a porção do cérebro mais afetada pelos hamartomas são os lobos temporais.

Apesar da forte contribuição de fatores orgânicos na etiologia do autismo, já está bem estabelecida a sua associação com fatores genéticos. Essa associação foi determinada principalmente a partir de alguns estudos que observaram agregação familial do autismo e sua recorrência na irmandade dos afetados[34,53]. Também foi descrita agregação familial de outras doenças psiquiátricas nos membros de famílias de autistas, principalmente em parentes em primeiro grau, assim como associação do autismo com doenças de etiologia genética conhecida[39].

O risco de recorrência de autismo para a irmandade é cerca de 50 a 100 vezes maior do que o risco da população em geral, sendo que nas famílias com vários membros afetados tal risco ultrapassa 200 vezes[28]. Os estudos de gêmeos mono e dizigóticos têm demonstrado taxas de concordância para o autismo que variam de 36% a 100% em gêmeos monozigóticos e de 0% a 24% em gêmeos dizigóticos, com taxa média de 64% de concordância para os primeiros e de 9% para os segundos[51, 62]. O risco de recorrência após o nascimento de um afetado varia de 4,5%[12] a 8,6%[33].

Os estudos de agregação familial mostraram também que, entre os parentes em primeiro grau de um indivíduo autista, são comumente encontrados distúrbios afetivos. Aproximadamente 15% dos irmãos de autistas apresentam dificuldades cognitivas[31]. Sinais autísticos discretos, como distúrbios de humor, atraso do desenvolvimento da fala, ansiedade e interação social abaixo da média, também podem estar presentes nas irmandades[61].

As condições genéticas conhecidas em associação com o autismo são responsáveis por cerca de 34% dos casos. O autismo recorrente ou familial é observado em 7% dos pacientes, enquanto o idiopático ocorre em 59% deles. Entre as condições de origem genética associadas com o autismo e mais freqüentemente descritas na literatura estão as alterações cromossômicas envolvendo os

cromossomos sexuais (XO, XXY e XYY), as trissomias do 21 e do 22 e a presença de cromossomos marcadores. Entre as doenças gênicas, destacam-se as síndromes do cromossomo X frágil, esclerose tuberosa, Goldenhar, Noonan, Moebius, Williams, Cornélia de Lange, fenilcetonúria e hipomelanose de Ito[7, 19].

Os diversos estudos mostram, portanto, grande heterogeneidade genética na etiologia do autismo. Provavelmente, essa heterogeneidade se deve à contribuição de vários genes que, de formas diferentes e específicas, levam à expressão dessa patologia. Smalley[54] e Jorde et al.[34] propuseram modelos poligênicos e multifatoriais, respectivamente, para explicar a etiologia do autismo. Hallmayer et al.[27] avaliaram a transmissão familial dessa condição e encontraram tanto evidências de ligação com o cromossomo X como de padrão de transmissão autossômico. Assim, os dados disponíveis até o momento indicam que o autismo não segue padrões clássicos de herança mendeliana.

Associação entre autismo e síndrome do cromossomo X frágil

A condição gênica mais freqüentemente associada ao autismo é a síndrome do cromossomo X frágil ou síndrome de Martin-Bell. Essa síndrome afeta aproximadamente um em cada 2.000 homens e uma em cada 2.500 mulheres, constituindo na principal causa gênica de retardo mental hereditário. Os portadores apresentam alguns sinais clínicos característicos, como face alongada, orelhas grandes e em abano e macrorquidismo associados com retardo mental e hiperatividade[25]. Apesar de ser uma síndrome gênica, apresenta um marcador citogenético expresso como um sítio frágil no braço longo do cromossomo X na região Xq27.3, denominado FRAXA.

A freqüência da síndrome do cromossomo X frágil em populações de autistas do sexo masculino é bastante variável. Em alguns estudos não foi observada associação entre o fra(X) e o autismo[33, 51], porém, vários outros encontraram tal associação[24, 40, 47, 63, 68]. Similarmente, alguns trabalhos indicaram a ocorrência da fra(X) também em autistas do sexo feminino[24,44]. Há descrições da presença de autismo entre os indivíduos diagnosticados primeiramente como o X frágil[37, 40]. Conforme Hagerman e Silverman[25], quando vários estudos são considerados, a freqüência média de indivíduos autistas com fra(X) é cerca de 7,7%, sugerindo portanto uma contribuição significativa da síndrome do cromossomo X frágil na etiologia do autismo.

O gene responsável pela síndrome do cromossomo X frágil (*FMR-1*; Fragile X Mental Retardation 1) mapeado na região Xq27.3 foi caracterizado molecularmente em 1991 por três grupos independentes e quase ao mesmo tempo[16, 63, 71]. Nos indivíduos normais, o número de trinucleotídeos CGG presentes no gene *FMR-1* varia de seis a 50 cópias, *in tandem*, sendo considerada uma região polimórfica na população. Em alguns indivíduos, essas unidades de repetição estão repetidas de 50 a 200 vezes e essa condição é conhecida como pré-mutação. Ao ser passada à prole, principalmente pela meiose feminina, a pré-mutação pode sofrer amplificação e ser convertida em mutação completa (muitas centenas ou até milhares de cópias), que leva à expressão citogenética e clínica da síndrome do X frágil[57].

A repetição de trinucleotídeos CGG está localizada na porção 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMR-1*. Quando o número de cópias do trinucleotídeo CGG ultrapassa 200, os níveis de RNA mensageiro do *FMR-1* estão diminuídos ou ausentes. Essa mudança na expressão do gene está correlacionada com a metilação das citosinas no dinucleotídeo 5'-CpG-3' na porção terminal 5' do gene[25].

Embora a ausência da proteína fmr-1 pareça ser a causa da síndrome, a patogênese da doença e a função da proteína normal ainda não estão totalmente esclarecidas. Sabe-se que esse gene é expresso ativamente e de modo generalizado no início do desenvolvimento embrionário em camundongos, mas com expressão mais restrita nos adultos, concentrando-se principalmente no cérebro e túbulos seminíferos. Em humanos, sua expressão também ocorre de forma semelhante. No cérebro fetal humano, a proteína fmr-1 está presente em áreas envolvidas no processo de aprendizagem, como o núcleo basal magnocelular e em neurônios piramidais do hipocampo[1, 32]. Nos túbulos seminíferos, a expressão do gene parece estar relacionada com a proliferação das espermatogônias, o que poderia explicar o baixo número de espermatozóides maduros nos indivíduos com fra(X) e, também, a raridade da transmissão da mutação completa de pai portador da pré-mutação para suas filhas[52].

Associação entre autismo e anomalias cromossômicas

As descrições de anomalias cromossômicas em autismo mostram uma grande variabilidade de achados, como alterações numéricas e estruturais envolvendo vários cromossomos, além de rearranjos complexos. As primeiras alterações citogenéticas relatadas em indivíduos autistas indicaram anomalia do cromossomo 22[64] e trissomia do 21[69].

Li et al.[38] investigando 104 crianças autistas com técnicas citogenéticas e moleculares, observaram anomalias cromossômicas em 12 (11,5%), das quais oito (7,7%) apresentaram o cromossomo X frágil, duas (1,9%) tinham síndrome de Down e outras duas (1,9%) mostraram translocação envolvendo os cromossomos 5 e 6 e inversão pericêntrica do cromossomo Y. Outros trabalhos ressaltaram a associação entre anomalias do cromossomo Y e comportamento autístico[4, 21]. Contudo, a maioria dos indivíduos XYY não são psicóticos ou autistas. Possivelmente, o cromossomo Y adicional predisponha-os ao atraso de fala e de linguagem, aos problemas de relacionamento social e à imaturidade do desenvolvimento cerebral[21].

Os cromossomos extranumerários derivados do cromossomo 15 são achados freqüentes em indivíduos com distúrbio autístico. Gillberg et al.[20] discutiram os achados citogenéticos em seis pacientes jovens não aparentados, do sexo masculino, com autismo ou traços autísticos, que apresentavam cromossomos dicêntricos extranumerários. Com aplicação de diferentes tipos de técni-

cas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), os autores identificaram tais marcadores como isocromossomos do 15, caracterizados pela duplicação do braço curto e parte do braço longo do 15 [iso(15)(pterq13,q13pter)]. Tal anomalia inclui a região gênica envolvida na etiologia das síndromes de Prader-Willi e de Angelman, ou seja, a região cromossômica 15q11-q13. Esses autores propuseram, então, a existência de uma síndrome de retardo mental moderado a severo, comportamento autístico e alguns sinais clínicos discretos associados com duplicações de 15q. Relatos semelhantes foram descritos, com variações cromossômicas estruturais diversas, mas sempre resultando em trissomia ou tetrassomia da região 15q11-q13[9, 14, 41, 58]. Esses marcadores, quando investigados, apresentavam origem materna[9, 14], enquanto que os de origem paterna não estavam associados com fenótipo alterado[58], sugerindo a ocorrência de *imprinting* genômico, ou seja, variabilidade de expressão clínica conforme a origem parental do cromossomo 15 extranumerário.

O número crescente de estudos citogenéticos em autismo tem revelado a ocorrência de alterações afetando diferentes cromossomos, que podem indicar regiões cromossômicas com genes candidatos a um papel relevante em sua etiologia.

Marcadores genéticos em autismo

A investigação de marcadores genéticos também é outro aspecto que tem merecido atenção. Alguns trabalhos têm trazido interessantes propostas de estudo, com resultados promissores na detecção de novos genes candidatos à susceptibilidade ao autismo.

Algumas dessas investigações têm relatado a associação de genes do HLA (complexo principal da histocompatibilidade – MHC) e autismo[13, 70]. Os locos HLA caracterizam-se como regiões hipervariáveis, herdadas como haplótipos, nos quais raramente ocorrem rearranjos. Daniels et al.[13] descreveram freqüência aumentada do haplótipo B44-SC30-DR4 em autismo, enquanto Warren et al.[70] relataram forte associação envolvendo alelos da terceira região hipervariável do haplótipo DR beta 1.

A associação de polimorfismos de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do oncogene *H-RAS* (C-Harvey-ras) e autismo também já foi descrita por alguns autores[8, 31], sugerindo que defeitos nesse gene e possivelmente em outros componentes de proteínas mensageiras do tipo G podem ter papel importante em algumas doenças neuropsiquiátricas. Hérault et al.[31], por meio da análise por *Southern blotting* e reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), obtiveram associação positiva entre autismo e dois marcadores *H-RAS*. Os produtos desse oncogene, mapeado em 11p15.5, estão envolvidos na proliferação e diferenciação de células nervosas. A proteína ras exerce atividade GTPase, estando relacionada com a atividade do fator de crescimento neuronal. Esse fator de crescimento tem função essencial na sobrevivência e manutenção dos neurônios simpáticos e sensoriais durante o desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados. Portanto, presume-se que alterações nessa proteína possam afetar o funcionamento do sistema nervoso e conseqüentemente levar à manifestação de sinais autísticos.

Outros genes que têm despertado o interesse dos pesquisadores são os relacionados com produção, transporte e recepção da serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5HT). A serotonina é um neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico. Após ser liberada nas sinapses cerebrais, pode ligar-se a receptores específicos ou ser recapturada para o neurônio pré-sináptico pelos seus transportadores. Investigações quanto aos genes responsáveis pelas diversas etapas da transmissão neuronal mediadas pela serotonina, em autismo e em outros transtornos neuropsiquiátricos, estão sendo realizadas, com achados relevantes para o esclarecimento da etiologia desses transtornos. Não foram encontradas evidências de ligação entre alterações nos genes da serotonina (*5HT*) ou de um de seus receptores (*5HT2A*) em autismo[10, 35]. Porém, estudos de polimorfismos de VNTR (Variable Number of Tandem Repeated DNA sequences) observaram associação entre uma variante do promotor do gene do transportador da serotonina (*5HTT*) e autismo[10], e do alelo tipo 1 desse transportador com o transtorno obsessivo-compulsivo[43].

Estudos de ligação de microssatélites do cromossomo X não mostraram a região Xq27-28, na qual está mapeado o gene *FMR-1* (síndrome do cromossomo X frágil) como um loco de efeito principal para o autismo[28, 50]. Porém, não foi excluída a participação do cromossomo X, pois evidenciou-se alguns segmentos com fraca associação que podem estar localizados entre os marcadores DXS453 e DXS1001[28], ou próximos ao DXS287[50], compreendidos entre as regiões Xq12-q24.

Algumas regiões cromossômicas do 7 contêm genes importantes para o desenvolvimento, com marcante atuação na formação do sistema nervoso central. Em 7q36 está mapeado o homeogene *EN-2*, relacionado ao desenvolvimento cerebelar. O *EN-2* humano é homólogo ao homeogene de *Drosophila*, cujos homólogos em camundongo, os genes *En-1* e *En-2*, são expressos no cerebelo de fetos e de adultos dessa espécie, com papel na diferenciação morfológica neuronal[49]. Em camundongos, os mutantes para esses homeogenes apresentam fenótipos diferentes, sendo que o mutante *En-1* morre logo após o nascimento, com grandes anomalias cerebrais, enquanto o mutante *En-2* sobrevive, apresentando defeitos no cerebelo[29]. Petit et al.[29], estudando um grupo de 100 crianças autistas comparadas com 100 crianças normais, encontraram associação de um tipo específico de polimorfismo do homeogene *EN-2* denominado de alelo tipo 2 da sonda MP4, com o autismo. O envolvimento do homeogene *EN-2* em anormalidades do cerebelo associado à função dessa estrutura do sistema nervoso central faz desse gene um importante candidato na etiologia das alterações neurológicas associadas ao autismo.

Outros importantes genes do desenvolvimento, os homeogenes *HOXA*, estão mapeados no cromossomo 7, em 7p15 (54). Nessa região eles formam uma família gênica com as variantes *HOXA-1* a *HOXA-11*.

A possibilidade dos genes *HOXA* humanos estarem envolvidos nos transtornos invasivos do desenvolvi-

mento provém da observação de pacientes vítimas da talidomida que apresentaram autismo[54]. Embora o autismo não seja uma condição encontrada com freqüência entre as vítimas desse fármaco, essa condição apareceu em aproximadamente 30% dos casos em que a exposição à talidomida ocorreu entre o 20º e 24º dia de gestação, sendo ausente a sintomatologia autística nos pacientes cuja exposição fora em outro período. Segundo Rodier et al.[54], as alterações neurológicas ocasionadas pela talidomida, em virtude de exposição nesse período gestacional, mimetizam as anomalias observadas em animais-modelos com deleção do gene *Hoxa-1*.

Na região 15q11-q13 e suas adjacências são encontrados vários genes com expressão no sistema nervoso central, nas sinapses e que são subunidades de proteínas receptoras de neurotransmissores ou de canais de íons[42, 47]. Embora existam fortes sugestões de que alterações envolvendo essa região predisponham aos sinais autísticos, ainda está pouco esclarecida a participação dos genes localizados nesse segmento cromossômico. Em todos os casos descritos até o momento em que havia co-ocorrência de comportamento autístico e presença de cromossomo derivado do 15, esse era de origem materna, levando à sugestão que somente os genes de expressão materna desse segmento contribuem para a manifestação do quadro autístico[57]. Nessa região cromossômica encontram-se mapeados os genes da ubiquitina-ligase E3A (*UBE3A*)[42], os genes que codificam as subunidades GABRA5, GABRB3 e GABRG3 do receptor GABA[47], da subunidade alfa-7 do receptor colinérgico neuronal nicotínico (*CHRNA7*)[13] e, possivelmente, um gene envolvido na manifestação da hipomelanose de Ito (*ITO*)[48].

O gene *UBE3A* é o principal candidato na etiologia da síndrome de Angelman[42]. Esse gene tem expressão bialélica em fibroblastos, linfoblastos, rins e outros tecidos, com *imprinting* restrito ao cérebro[56]. Os principais sinais da síndrome de Angelman estão relacionados com a perda da expressão materna desse gene no hipocampo e cerebelo[2]. Fung et al.[18] relataram a presença de retardo mental, alterações de linguagem e ataxia em um caso de deleção de 14 pares de bases em uma região não-transcrita do gene *UBE3A*. Tais observações permitiram a sugestão de papel do gene *UBE3A* em transtornos do comportamento, como os apresentados pelos portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento. Dessa forma, é possível que a presença de cromossomo extranumerário derivado do 15 materno propicie, no cérebro, a expressão aumentada da proteína ube3a, cuja ação nas área do hipocampo e do cerebelo pode alterar seu funcionamento normal, levando aos distúrbios autísticos.

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro de mamíferos. Nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman, o gene da subunidade beta3 (*GABRB3*) está deletado, sugerindo o envolvimento do GABA na etiologia dessas síndromes[57]. Em ratos, o gene *GABRB3* têm expressão no córtex cerebral, no cerebelo, no hipocampo, nos núcleos caudado e talâmico paraventriculares. Assim, defeitos na sua função podem produzir convulsões e distúrbios de movimento, como aqueles do fenótipo Angelman. Da mesma forma que o *UBE3A*, esse gene tem expressão em áreas do sistema nervoso central com possível associação aos transtornos invasivos do desenvolvimento, ou seja, o cerebelo e o hipocampo. Cook et al.[11], em estudos de ligação de nove locos da região 15q11-q13 em indivíduos com quadro autístico, encontraram desequilíbrio de ligação apenas em relação ao alelo 155CA-2 do gene *GABRB3* indicando, portanto, ser esse gene um candidato à predisposição aos distúrbios autísticos. Os genes das outras duas subunidades do receptor GABA mapeados nessa região, o *GABRA5* e o *GABRG3*, também foram observados como deletados nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman, sugerindo efeito sinergístico dessas subunidades na manifestação fenotípica dessas síndromes[22, 23].

Chini et al.[6] sugeriram que o gene *CHRNA7* também pode ter papel nas crises convulsivas em pacientes com duplicação do cromossomo 15 e Freedman et al.[17] mostraram ligação entre um polimorfismo de dinucleotídeos em 15q11-q14, o sítio do gene *CHRNA7* e a esquizofrenia. Os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) são membros de uma superfamília de canais de íons que mediam a transmissão de sinais rápidos nas sinapses. Esses receptores são formados por subunidades, das quais a subunidade alfa-7 é a mais importante, com marcante atividade na permeabilidade desses canais aos íons cálcio[15]. Em pacientes esquizofrênicos, as alterações psicofisiológicas estão relacionadas com resposta alterada aos estímulos sensoriais. Por exemplo, em indivíduos normais sujeitos seguidamente a um mesmo estímulo sonoro, a resposta ao segundo estímulo é menos intensa, enquanto nos indivíduos esquizofrênicos a reposta inibitória está diminuída[17]. Os estudos em animais-modelo permitiram a identificação do padrão de alteração semelhante quanto à inibição aos estímulos sonoros, em função de decréscimo da expressão do *CHRNA7*. Seu papel regulador da permeabilidade de canais de íons e sua participação ativa na transmissão neuronal rápida em resposta a estímulos sensoriais reforçam seu envolvimento em crises epilépticas.

A região 15q11-q13 também é sugerida como loco gênico da hipomelanose de Ito, um tipo específico de incontinência pigmentar com anormalidades do sistema nervoso central e que está associada ao autismo[5]. Em indivíduos com autismo e hipomelanose de Ito foram encontrados espasmos (8%), convulsões (49%) e, em alguns casos, hipoplasia cerebelar. A região gênica 9q33-qter parece conter um loco da hipomelanose de Ito e foi sugerido que essa patologia pode resultar da perda de genes de pigmentação específicos, em diferentes locos gênicos[21, 44]. Uma vez que a perda desses genes podem levar a anormalidades neurológicas, é aceitável que os mesmos, quando presentes em excesso, possam de alguma forma alterar a estrutura do sistema nervoso central, com prejuízo de áreas do desenvolvimento, provocando o autismo.

Conclusão

Os estudos familiais, cromossômicos e moleculares em autismo têm tornado evidente a contribuição de

fatores genéticos em sua etiologia. Esses fatores são os responsáveis pela grande maioria dos distúrbios autísticos, em associação com fatores ambientais, principalmente pré e peri-natais.

As avaliações epidemiológicas em autismo têm constatado a agregação familial dessa patologia, assim como a ocorrência de outras doenças psiquiátricas e até mesmo de doenças genéticas. Outras investigações têm mostrado claramente a contribuição de diferentes anomalias cromossômicas, como o fra(X)(q27.3), a inv-dup(15)(q11-q13), a trissomia 21 e alterações dos cromossomos sexuais, no aparecimento do quadro autístico. Mais recentemente, estudos de marcadores genéticos, estudos de ligação e polimorfismos, dentre outros, têm propiciado um amplo espectro de informações, indicando alguns genes candidatos à susceptibilidade ao autismo. Dentre esses destacam-se os genes do sistema HLA, genes relacionados com a produção, o transporte e a recepção da serotonina (*5HT*), o gene *FMR-1*, os genes do desenvolvimento embrionário envolvidos na formação do SNC, como o *EN-2* e os da família *HOXA*, e diversos genes mapeados na região 15q11-q13 expressos no SNC (*UBE3A*, receptores GABA, *CHRNA7* e *ITO*)

A forte associação entre autismo e fatores genéticos reforça a necessidade de investigação genética, especialmente da síndrome do cromossomo X frágil em pacientes autistas. A análise molecular detalhada de regiões dos cromossomos 7, 15 e X, com marcadores moleculares conhecidos, é uma possibilidade de investigação bastante interessante, em vista da associação mais evidente entre alterações estruturais e gênicas desses cromossomos e o espectro autístico. Os conhecimentos gerados pela análise genética podem fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na gênese dessa grave doença e auxiliar no aconselhamento genético às famílias e no estabelecimento de terapias futuras.

Nota: Este artigo de revisão resultou da análise de uma coletânea de trabalhos sobre autismo na área de genética utilizados na dissertação de mestrado "Avaliação Citogenética e Molecular em Autismo e Outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento", do pós-graduando Marcos Roberto Higino Estécio. Utilizou-se os bancos de dados Medline, Current Contents Life Sciences, Index Medicus e OMIM, com as palavras-chaves autism, genetics, cytogenetics, chromosome e fragile X.

Referências

1. Abitbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhynes T, Vekemans M, Mallet J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of *FMR-1* expression in the human fetal brain. Nature Genet 1993;4:147-52.
2. Albrecht U, Sutcliffe J, Cattanach B, Beechey C, Armstrong D, Eichele G, Beaudet A. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. Nature Genet 1997;17:75-8.
3. Berquez G. O autismo infantil e Kanner. In: Mazet P, Lebovici S, orgs. Autismo e psicoses da criança. Porto Alegre (RS): Artes Médicas; 1991.
4. Blackman JA, Selzer SC, Patil S, Van Dyke DC. Autistic disorder associated with an iso-dicentric Y chromosome. Dev Med Child Neurol 1991;33:153-66.
5. Castroviejo P, Roche C, Bermejo MA, Martin LV, Tendero A, Esquiroz JL, Pascula, SPJ. Hypomelanosis of Ito: a study of 76 infantile cases. Brain Dev 1998;20:36-43.
6. Chini B, Raimond E, Elgoyhen Ab, Moralli D, Balzaretti M, Heinemann S. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha-7-nicotinic receptor subunit gene (*CHRNA7*). Genomics 1994;19:379-81.
7. Comings De, Comings Bg. Clinical and genetics relationships between autism-pervasive developmental disorder and Tourette syndrome: a study of 19 cases. Am J Med Genet 1991;39:180-1.
8. Comings De, Wu S, Chiu C, Muhleman D, Sverd J. Studies of the c-Harvey-Ras gene in psychiatric disorders. Psychiatry Res 1996;63:25-32.
9. Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. Am J Hum Genet 1997a;60:928-34.
10. Cook Ej Jr, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal Bl. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorders. Mol Psychiatry 1997b;2:247-50.
11. Cook Eh Jr, Courchesne RY, Cox NJ, Lord C, Gonen D, Guter SJ, Lincoln A, Nix K, Haas R, Leventhal BL, Courchesne E. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder with 15q11-13 markers. Am J Med Genet 1998; 62:1077-83.
12. Courchesne E, Saitoh O, Yeung-Courchesne R, Press GA, Lincoln AJ, Hass RH, Schreibman L. Abnormality of cerebellar vermian lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hipoplastic and hyperplastic groups with MR imaging. Am J Roentgenol 1994; 162:123-30.
13. Daniels WW, Warren RP, Odell JD, Maciulis A, Burger RA, Warren WI, Torres AR. Increased frequency of the extended or ancestral haplotype B44-SC30-DR4 in autism. Neuropsychobiology 1995;32:120-3.
14. De Long R, Nohria C. Psychiatric family history and neurological diseases in autistic spectrum disorders. Dev Med Child Neurol 1994;36:441-8.
15. Doucette-Stamm L, Monteggia LM, Donnelly-Roberts D, Wang MT, Lee J, Tian J, Giordano T. Cloning and sequence of the human alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. Drug Dev Res 1993;30:252-6.
16. Flejter WL, Bennet-Baker PE, Ghaziuddin M, Mcdonald M, Sheldon S, Gorski JL. Cytogenetic and molecular analyses of a inv dup(15) chromosomes observed in two patients with autistic disorders and mental retardation. Am J Med Genet 1996;61:182-7.
17. Freedman Mc, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Davis A, Polymeropoulos M, Holik J, Hopkins J, Hoff M, Rosenthal J, Waldo MC *et al*. Linkage of neurophissological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. Proc Nat Acad Sci 1997;94:587-92.
18. Fung DCY, Yu B, Cheong KF, Smith A, Trent RJ. *UBE3A* "mutations" in two unrelated and phenotypically different Angelman syndrome patients. Hum Genet 1998;102:487-92.
19. GHAZIUDDIN M, BOLYARD B, ALESSI N. Autistic disorder in Noonan syndrome. J Intellect Disabilit Res 1994; 38:62-72.
20. Gillberg C, Steffenburg S, Wahlstrom J, Gillberg IC, Sjostedt A, Martinsson T, Liedgren S, Eeg-Olofsson O

Autism associated with marker chromosome. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1991;30:489-94.
21. Gillberg C, Winnegard J, Wahlstrom J. The sex chromosomes: a key to autism? An XYY case of infantile autism. Appl Res Ment Retard 1984;5: 353-60.
22. Glatt Ka, Sinnet D, Lalande M - Dinucleotide repeat polymorphism at the $GABA_A$ receptor alpha-5 (*GABRA5*) locus at chromosome 15q11-q13. Hum Mol Genet 1992; 1:348.
23. Gregor V, Knoll JHM, Woolf E, Glatt K, Tyndale RF, Delorey TM, Olsen RW, Tobin AJ, Sikela JM, Nakatsu Y, Brilliant MH, Whiting OS, Lalande M. The gamma-aminobutyric acid receptor gamma-3 subunit gene (*GABRG3*) is tightly linked to the alpha-5 subunit gene (*GABRA5*) on the chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. Genomics 1995;26:258-64.
24. Hagerman RJ, Jackson C, Amiri K, Silverman AC, O'connor R, Sobesky W. Girls with fragile X syndrome : physical and neurocognitive status and outcome. Pediatrics 1992; 89:395-400.
25. Hagerman RJ, Silverman AC. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1996.
26. Hallmayer J, Pintado E, Lotspeich L, Spiker D, Mcmahon W, Petersen Pb, Nicholas P, Pingree C, Kraemer HC, Wong DL, Ritvo E, LIN A, Hebert J, Cavalli-Sforza LL, Ciaranello RD. Molecular analysis and test of linkage between the *FMR-1* gene and infantile autism in multiplex families. Am J Hum Genet 1994;55:951-9.
27. Hallmayer J, Spiker D, Lotspeich L, Mcmahon W, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, Ciaranello RD. Male-to-male transmission in extended pedigrees with multiple cases of autism. Am J Med Genet 1996a;67:13-8.
28. Hallmayer J, Hebert JM, Spiker D, Lotspeich L, Mcmahon WM, Petersen B, Nicholas P, Pingree C, Lin AA, Cavalli-Sforza LL, Risch N, Ciaranello RD. Autism and the X chromosome. Arch Gen Psychiatry 1996b;53:985-9.
29. Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. Rescue of the *En-1* mutant phehotype replacement of *En-1* with *En-2*. Science 1995;269:679-82.
30. Happle R. Incontinentia pigmenti versus hypomelanosis of Ito: the whys and wherefores of a confusing issue. Am J Med Genet 1998;79:64-5.
31. Hérault J, Petit E, Martineau J, Perrot A, Lenoir P, Cherpy C, Barthélémy C, Sauvage D, Mallet J, Müh JP. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of *HRAS* gene. Am J Med Genet 1995;60:276-81.
32. Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M. Tissue specific expression of *FMR-1* provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. Nature Genet 1993;3:36-43.
33. Jayakar P, Chudley AE, Ray M, Evans JA, Perlov J, Wand R. Fra(2)(q13) and inv(9)(p11q12) in autism: causal relationship? Am J Med Genet 1986;23:381-2.
34. Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo Er, Mason-Brothers A, Freeman BJ, Pingree C, Mcmahon WM, Petersen B, Jenson WR, Mo A. Complex segregation analysis of autism. Am J Hum Genet 1991;49:932-8.
35. Klauck SM, Poustka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? Hum Mol Genet 1997;6:2233-8.
36. Le Couteur A. Changing perspectives in autism. Br J Hosp Med 1993;50:159-61.
37. Levitas A, Hagerman RJ, Braden M, Rimland B, Mcboggs P, Matheus I. Autism and the fragile X syndrome. J Dev Behav Pediatr 1983;1:151-8.
38. Li SY, Chen YCJ, Lai TJ, Hsu CY, Wang YC. Molecular and cytogenetic analysis of autism in Taiwan. Hum Genet 1993;92:441-5.
39. Lombroso PJ, Pauls DL, Leckman JF. Genetic mechanisms in childhood psychiatric disorders. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1994;33:921-8.
40. Malmgren H, Gustavson KH, Walström J, Arpe-Henriksen I, Bensch J, Petterson U, Dahl V. Infantile autism-fragile X. molecular findings support genetic heterogeneity. Am J Med Genet 1992;44:830-3.
41. Martinsson T, Johanneson T, Vujic M, Sjostedt A, Steffenburg S, Gillberg C, Wahlstrom J. Maternal origin of invdup(15) chromosomes in infantile autism. Eur Child Adoles Psychiatry 1996;5:185-92.
42. Matsuura T, Sutcliffe Js, Fang P, Galjaard RJ, Jiang Y, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. Nature Genet 1997;15:74-7.
43. Mcdougle CJ, Epperson CN, Price LH, Gelernter J. Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (*SLC6A4*) and obsessive compulsive disorder. Mol Psychiatry 1998;3:270-3.
44. McLennan JD, Lord C, Schopler E. Sex differences in higher functioning people with autism. J Autism Dev Disord 1993;23:217-27.
45. Nelson KB. Prenatal and perinatal factors in the etiology of autism. Pediatrics 1991;87:761-6.
46. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devrys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal metilation in fragile X syndrome. Science 1991;252:1097-1102
47. Payton JB, Steele MW, Wenger SL, Murshew NJ. The fragile X marker and autism in perspective. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1989;28:417-21.
48. Pellegrino JE, Schnur RE, Kline R, Zackai EH, Spinner NB. Mosaic loss of 15q11-q13 in a patient with hypomelanosis of Ito: is there a role for the P gene? Hum Genet 1995; 96:485-9.
49. Petit E, Hérault J, Martineau J, Perrot A, Barthélémy C, Hameury L, Sauvage D, Lelord G, Muh JP. Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. J Med Genet 1995;32:269-74.
50. Petit E, Hérault J, Raynoud M, Cherpi C, Perrot A, Barthélemy C, Lelord G, Müh JC. X chromosome and infantile autism. Biol Psychiatry 1996;40:457-64.
51. Reiss AL, Feinstein C, Toomey KE, Goldsmith B, Rosenbaun K, Caruso MA. Psychiatric disability associated with the fragile X syndrome. Am J Med Genet 1986;23:393-2.
52. Reyniers E, Vitz L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, De Graaff E, Verkerk AJMH, Jorens HZJ, Darby JK, Oostra B, Willems PJ. The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in this sperm. Nature Genet 1993;4:143-6.
53. Ritvo ER, Jorde LB, Mason-Brothers A. The UCLA University of Utah epidemiologic survey of autism: recurrence risk estimates and genetic counseling. Am J Psychiatry 1989;146:1032-6.
54. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin of autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. J Comp Neurol 1996;370:247-51.
55. ROdier PM, Bryson SE, Welch JP. Minor malformation and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. Teratology 1997;55:319-25.

56. Rougeulle C, Glatt H, Lalande M. The Angelman syndrome candidate gene, *EBE3A/E6-AP*, is imprinted in brain. Nat Genet 1997;17:14-5.
57. Rousseau P, Heitz D, Biancala V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J, Tommerup N, Van Der Hagen C, Delozier-Blanchet C, Croquette MF, Gilgenkrantz S, Jalbert P, Voelckel MA, Oberlé I, Mandel JL. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. N Engl J Med 1991;325:1673-81.
58. Schroer RJ, Phelan MC, Michaelis RC, Crawford EC, Skinner SA, Cuccaro M, Simensen RJ, Bishop J, Skinner C, Fender D, Stevenson RC. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. Am J Med Genet 1998; 76:327-36.
59. Smalley SL. Genetic influences in autism. Psychiatr Clin North Am 1991;14:125-9.
60. Smalley SL, Tanguay PE, Smith M, Gutierrez G. Autism and tuberous sclerosis. J Autism Dev Disord 1992;22:339-45.
61. SMALLEY SL. Genetic influences in childhood onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Hum Genet 1997; 1276-82.
62. Spiker D, Lotspeich L, Kraemer Hc, Hallmayer J, Mcmahon W, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, Wiese-Slater S, Chiotti C, Wong DI, Dimicelli S, Ritvo E, Cavalli-Sforza LL, Ciaranello RD. Genetics of autism: characteristics of affected and unaffected children from 37 multiplex families. Am J Med Genet 1994; 54: 27-35.
63. Tranebjaerg L, Kure D. Prevalence of fra(X) and other specific diagnoses in autistic individuals in a Danish country. Am J Med Genet 1991;38:212-4.
64. Turner B, Jennings NA. Trissomy for chromosome 22. Lancet 1961;I: 49-50.
65. VERKERK AJMH, PIERETTI M, SUTCLIFF JS, *et al*. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CCG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting lenght variation in fragile X syndrome. Cell 1991; 65: 905-14.
66. Voeller KKS. Developmental neurobiological aspects of autism. J Autism Dev Disord 1996;26:189-93.
67. Wagstaff J, Knoll JMH, Fleming J *et al*. Localization of the gene encoding the GABA-A receptor b3 subunit to the Algelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. Am J Hum Genet 1991;49:330-7.
68. Wahlstrom J, Gillberg C, Gustavson KH, Holmgren G. Infantile autism and the fragile X: a Swedish multicenter study. Am J Med Genet 1986; 23:403-8.
69. Wakabayashi S. A case of infantile autism associated with Down syndrome. J Autism Dev Disord 1979;9:31-6.
70. Warren RP, Odell JD, Warren WL, Burger RA, Maciulis A, Daniels WW, Torres AR. Strong association of the third hypervariable region of HLA-DR beta 1 with autism. J Neuroimmunol 1996;67:97-102.
71. Yu S, Pritchard M, Kremer EJ, Lynch M, *et al*. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. Science 1991;252:1179-81

3. POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA E ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO EM DISTÚRBIOS AUTÍSTICOS E SÍNDROME DE DOWN

ARTIGO ORIGINAL

POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS DAS REGIÕES DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA E ORGANIZADORA DO NUCLÉOLO EM DISTÚRBIOS AUTÍSTICOS E SÍNDROME DE DOWN

Jucimara Colombo[1]
Agnes Cristina Fett-Conte[2]
Ana Elizabete Silva[3]

RESUMO

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID), especialmente o autismo, são definidos como síndromes comportamentais graves, de etiologia complexa, variável e heterogeneidade genética. A Síndrome de Down (SD) é uma das doenças genéticas mais comuns e estudadas, cuja etiologia é a trissomia do cromossomo 21. Embora sejam afecções etiologicamente diferentes, cerca de 4 a 5% dos indivíduos com SD apresentam autismo ou outros desvios comportamentais. Com o objetivo de verificar a ocorrência de polimorfismos cromossômicos constitucionais em portadores de distúrbios autísticos (DA) e comparar os achados com os da SD, este estudo investigou a freqüência e os tipos de alterações das regiões de heterocromatina constitutiva e organizadora do nucléolo (RON), pelas técnicas de bandamento CBG e Ag-NOR, em 20 indivíduos com DA e em 10 com SD. Os polimorfismos cromossômicos foram observados em 75% (15/20) dos indivíduos com DA e em 60% (6/10) daqueles com SD. As variantes de heterocromatina constitutiva observadas foram 1qh+, 9qh+, 16qh+, Yqh+, Yqh- e Dp-. Nas RON foi comum a observação de satélites aumentados como Dps+ e Gps+. As freqüências médias de cromossomos dos grupos D e G, impregnados pela prata, em ambas amostras, foram similares (4,39 e 2,87 nos indivíduos com DA e 4,14 e 3,15 nos com SD). Contudo, a freqüência média de associações de satélites por célula foi estatisticamente maior na amostra de indivíduos com DA (0,87±0,20) do que na de SD (0,63±0,36). Estes achados evidenciam uma freqüência alta de polimorfismos em ambas amostras, podendo atuarem como fatores predisponentes para estas patologias.

Unitermos: Polimorfismos cromossômicos, Autismo, Sindrome de Down, Heterocromatina constitutiva, Região organizadora do nucléolo

1. Bacharel em Ciências Biológicas, IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, SP.
2. Professora Adjunta da Disciplina de Genética. Departamento de Biologia Molecular - FAMERP, São José do Rio Preto, SP.
3. Professora Assistente Doutora da Disciplina de Genética Humana. Depto. de Biologia, IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, SP.
Trabalho realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular. Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, SP.
Aceito para publicação em 05/03/00

INTRODUÇÃO

Os transtornos invasivos do desenvolvimento se caracterizam por prejuízo severo de áreas do desenvolvimento cognitivo, como a habilidade de interação social recíproca de comunicação ou presença de comportamento estereotipado, interesses e atividades restritas. Como parte desse grupo encontram-se o autismo, as síndromes de Rett, de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS)[1].

Entre eles, pela complexidade e alta prevalência, se destaca o autismo que, segundo a Organização Mundial de Saúde, consiste em uma síndrome comportamental com sintomas presentes desde o nascimento ou que se manifestam, invariavelmente, antes dos 30 meses de idade. Caracteriza-se por respostas anormais a estímulos auditivos ou visuais e por problemas graves quanto à compreensão da linguagem falada. Em geral, há também incapacidade na interação social, envolvendo a linguagem verbal e corpórea. Ocorrem problemas graves de relacionamento social antes dos cinco anos de idade. O comportamento é usualmente ritualístico e agregado a rotinas anormais, resistência a mudanças, ligação a objetos estranhos e um padrão estereotipado de brincar. A inteligência varia de subnormal, normal à elevada[2]. O autismo é observado em todas as classes sociais e em todas as etnias, afeta cerca de 4:10.000 indivíduos, com taxa sexual de 3:1 homens afetados em relação às mulheres[3]. Apesar da facilidade relativa no estabelecimento do diagnóstico do autismo, sua etiologia é bastante complexa. Entre os diversos fatores etiológicos sugeridos, há participação de fatores ambientais e genéticos. Alguns estudos mostraram que a freqüência de processos patológicos na gravidez (metrorragias, ameaças de abortos, toxemia gravídica) ou de adversidades obstétricas (idade e paridade materna, ordem de nascimento, baixo peso ao nascimento) é significativamente mais elevada em autistas[4,5]. Entre as doenças gênicas associadas ao autismo destacam-se, principalmente, a síndrome do fra(X), a esclerose tuberosa, as síndromes de Rett, Goldenhar, Noonam, Moebius, Williams e Cornélia de Lange, a fenilcetonúria, a neurofibromatose e a hipomelanose de Ito. Outras condições não genéticas, como hipotiroidismo e doenças infecciosas (toxoplasmose congênita, encefalite herpética e citomegalovírus) também já foram associadas ao autismo[6,7,8]. A síndrome do cromossomo X frágil, é a alteração genética mais comumente associada ao autismo, sendo observada em cerca de 7% dos casos. Esta anomalia genética se traduz citogeneticamente pela ocorrência de um sítio frágil em Xq27.3 e é considerada como uma das principais causas genéticas de retardo mental no sexo masculino, sendo superada apenas pela síndrome de Down[9].

As informações disponíveis quanto a herança genética do autismo indicam que ele não segue padrões clássicos mendelianos. Alguns estudos familiais já correlacionaram com genes ligados ao X; transmissão de um gene autossômico com penetrância reduzida em mulheres; distúrbio geneticamente heterogêneo com transmissão tanto ligada ao X como autossômica e com padrões poligênicos e multifatoriais[10]. Provavelmente, o autismo resulte da combinação de fatores genéticos e ambientais[11].

A síndrome de Down (SD), por sua vez, representa a anomalia cromossômica mais comum na população (1:800) e ocorre devido a uma trissomia de um cromossomo acrocêntrico pequeno, designado cromossomo 21[12]. Sua incidência varia com a idade materna, elevando-se abruptamente a partir dos 35 anos[13]. Geralmente é diagnosticada no período neonatal em função das características dismórficas da criança, que conferem um fenótipo típico.

Alguns estudos sugerem uma associação entre distúrbios autísticos e síndrome de Down. Conforme Ghaziuddin e colaboradores[14], entre 100 indivíduos com síndrome de Down cerca de 4 ou 5 apresentam autismo ou características autísticas. Esses dados são similares aos de Gillberg e colaboradores[15] que, em um estudo realizado em crianças suecas, encontraram um índice de 5% de concordância de síndrome de Down com autismo. Além destes, muitos outros autores descreveram indivíduos com SD e autismo[16-21]. Conforme alguns estudos sobre o temperamento de indivíduos com SD, há indicações de que um subgrupo destes indivíduos apresente problemas comportamentais e que neste subgrupo estejam incluídos os indivíduos com distúrbios autísticos e outros distúrbios psiquiátricos[14,22].

Alguns achados neuropatológicos descritos em autismo e SD, embora não específicos, podem sugerir alterações da organização cerebral funcional comum para ambos. É possível que o comportamento autístico na SD ocorra como resultado direto ou indireto da trissomia 21 que, freqüentemente, é acompanhada por várias deficiências orgânicas. Além disso, as complicações físicas que ocorrem na SD poderiam contribuir para o aparecimento de características autísticas[14,22].

O polimorfismo é uma variante genética que ocorre em uma população numa freqüência maior da que poderia ser mantida por mutação recorrente[23]. Os polimorfismos mais comuns nos cromossomos humanos ocorrem nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22), envolvendo as regiões organizadoras do nucléolo (RON), e nas regiões heterocromáticas do braço longo do cromossomo Y, dos centrômeros dos cromossomos 3 e 4 e das constrições secundárias dos cromossomos 1, 9 e 16[24-26].

Segundo alguns autores, embora aparentemente não sejam a causa direta de malformações, os polimorfismos poderiam aumentar o risco de não-disjunção cromossômica e influenciar a expressividade dos genes, facilitando a ocorrência de anomalias nos descendentes de abortos e de mortes neonatais[27].

Com o objetivo de verificar a ocorrência de polimorfismos cromossômicos constitucionais em portadores de distúrbios autísticos e comparar com os achados em SD, o presente trabalho investigou a freqüência e os tipos destes polimorfismos nas RON e de heterocromatina constitutiva nestes dois grupos de indivíduos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A casuística foi constituída por vinte indivíduos da Escola Municipal do Autista "Maria Lúcia de Oliveira" de São José do Rio Preto, SP, diagnosticados, por sua equipe clínica multidisciplinar, como portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento, segundo critérios da CID 10[28] e da DSM-IV[1].

Destes, onze apresentavam autismo, oito foram diagnosticados como portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (PDD-NOS) e um apresentava a síndrome de Asperger. Como todos compartilhavam comportamento com características autísticas, foram incluídos na amostra e designados genericamente como indivíduos com distúrbios autísticos. Os cariótipos de todos os pacientes haviam sido previamente estudados pela técnica de bandamento GTG. Dezoito indivíduos apresentaram cariótipo normal, contudo dois eram portadores de alterações genéticas com manifestação cariotípica. O caso 1449 mostrou um cromossomo extra derivado do 15 e o 1461 apresentou a síndrome do fra(X). O cariótipo de ambos foi definido, respectivamente, como 47,XX,der(15) e 46,Y,fra(X)(q27.3)[29]. Além desse grupo, a casuística também foi constituída por dez indivíduos com diagnóstico de síndrome

de Down, encaminhados pelo Serviço de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Entre eles, nove apresentaram trissomia livre do 21 (47,XX ou XY,+21) e um (caso 2620) apresentou cariótipo 48,XXY,+21, manifestando também a síndrome de Klinefelter.

Dos indivíduos com distúrbios autísticos, sete eram do sexo feminino e treze do sexo masculino, com idade entre cinco e 29 anos (x±s=11,80±6,55 anos). Daqueles com SD, seis eram do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idades entre 17dias e 9 anos (x±s=13,50±30,05 meses).

Foram desenvolvidas culturas de linfócitos de sangue periférico de cada paciente por 72 horas, segundo as técnicas utilizadas pelo Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia (IBILCE-UNESP)[30].

A análise citogenética foi realizada em 15 metáfases de boa qualidade, submetidas ao bandamento CBG para identificação das regiões de constrições secundárias proximais ao centrômero dos cromossomos 1, 9 e 16 e região distal do braço longo do cromossomo Y, segundo a técnica descrita por Sumner[31], com algumas modificações.

Para a investigação de polimorfismos dos cromossomos acrocêntricos e da freqüência de associações de satélites, foram analisadas 15 metáfases de boa qualidade submetidas à técnica de marcação, pela prata amoniacal ($AgNO_3$), das regiões organizadoras do nucléolo (RON), descrita por Howell & Black[32], com algumas modificações.*

A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foram realizadas conforme normas da ISCN[33].

Para análise estatística, foram testados os parâmetros de freqüência de associação dos cromossomos acrocêntricos por célula e freqüência média de cromossomos dos grupos D e G com RON marcada (RON+). Para comparação dos valores obtidos entre as amostras, utilizou-se o teste t-Student, fixando-se em 5% o nível de significância.

RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados, respectivamente, os polimorfismos encontrados nos pacientes com distúrbios autísticos (DA) e com síndrome de Down (SD). Dos primeiros, 75% (15/20) apresentaram algum tipo de polimorfismo de heterocromatina ou das RON. Naqueles com SD, esta freqüência foi de 60% (6/10).

Nos indivíduos com DA foram observados: aumento da região distal do braço longo do cromossomo Y (Yqh+), redução desta região (Yqh-), aumento da constrição secundária do cromossomo 1 (1qh+) e aumento no braço curto de um dos cromossomos do grupo D (Dp+). Com relação aos indivíduos com SD, além do aumento de heterocromatina constitutiva do tipo 1qh+, Yqh+ e Dp+, foi observado aumento da constrição secundária dos cromossomos 9 e 16 (9qh+, 16qh+). Na Figura 1 estão ilustrados alguns desses polimorfismos.

Em relação às variantes da RON+, foram encontrados satélites aumentados em cromossomos dos grupos D e G em sete dos pacientes do grupo com DA (cinco com Dps+ e dois com Gps+) e em quatro com SD (dois com Dps+ e dois com Gps+).

Os números de cromossomos marcados pela prata (RON+), nas metáfases dos pacientes de ambos os grupos, foram semelhantes. Para os cromossomos do grupo D, em ambas as amostras, houve uma variação de 1 a 6, com média e desvio padrão de 4,39±0,68 e 4,14±0,67, respectivamente para os grupos com DA e SD. Quanto aos cromossomos do grupo G, esta variação foi de 0 a 4 nos autistas (2,87±0,81) e de 1 a 5 (3,15±0,87) naqueles com SD. Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($t_{(2GL)} = 0,85$; $P>0,05$).

Tabela 1 - Dados relativos à análise citogenética em bandamento CBG e coloração Ag-NOR nos pacientes com distúrbios autísticos.

Caso	Polimorfismo	
	Bamda CBG	Ag-NOR
1408	Yqh-	
1409		
1410		Dps+
1431	Dp+	Gps+,Gps+
1432	1qh+	
1447		Dps+
1448	1qh+,Yqh+	
1450		
1459	1qh+	
1460	Dp+	
1462	Dp+	
1407	Yqh+	Gps+
1426		Dps+
1427		Dps+
1428		
1430		Dps+
1449	Dp+	
1461	Dp+	
1463		
1429		

Tabela 2. Dados relativos à análise citogenética em bandamento CBG e coloração Ag-NOR nos pacientes com síndrome de Down.

Caso	Polimorfismo	
	Bamda CBG	Ag-NOR
1483	9qh+,Dp+	
1484		
1485		Gps+
2448	1qh+	
2454		Gps+
2521	Yqh+	Dps+
2529	16qh+	Dps+
2605		
2615		
2620		

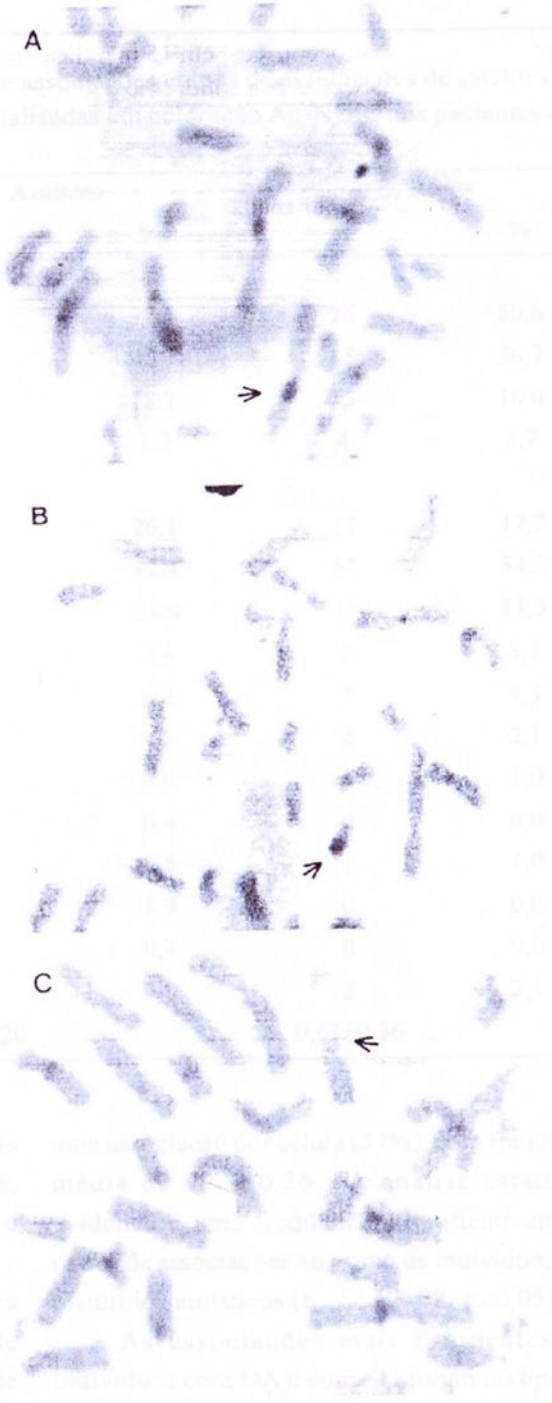


Figura 1. Metafases parciais em banda CBG apresentando: (A) cromossomo 1qh+ (caso 1448); (B) Yqh+ (caso 2521) e (C) cromossomo Dp+ (caso 1449). As setas indicam os cromossomos com polimorfismos.

Tabela 3. Distribuição das freqüências médias de associações e tipos de associações de satélites dos cromossomos acrocêntricos, em 15 metáfases analisadas em coloração Ag-NOR, nos pacientes com distúrbios autísticos e com síndrome de Down.

	Autismo		S. Down	
	n	%	N	%
Nº de associações por célula				
0	112	37,3	76	50,6
1	122	40,7	55	36,7
2	56	18,7	15	10,0
3	10	3,3	4	2,7
Tipos de associações				
DD	69	26,1	17	17,7
DG	112	42,4	52	54,2
GG	37	14,0	11	11,5
DDD	9	3,4	3	3,1
DDG	14	5,3	7	7,3
DGG	12	4,5	2	2,1
GGG	0	0,0	1	1,0
DDDD	1	0,4	0	0,0
DDDG	4	1,5	1	1,0
DDGG	5	1,9	0	0,0
DGGG	1	0,4	0	0,0
DDDDG	0	0,0	2	2,1
Associação por célula	0,87±0,20		0,63±0,36	

Na Tabela 3 estão apresentadas as freqüências médias de associações de satélites, nos cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G nos indivíduos com DA e com SD.

A maioria das metáfases dos pacientes autistas (63%) apresentou associações de satélites, sendo mais freqüente a ocorrência de uma única associação (41%). A freqüência média de associação por célula foi de 0,87±0,20. Quanto aos indivíduos com SD, a freqüência de metáfases com associações foi menor (49%) e também foi mais comum a ocorrência de apenas uma associação por célula (37%), com freqüência média de 0,63±0,36. A análise estatística evidenciou uma freqüência significativamente maior de associações no grupo de indivíduos com distúrbios autísticos ($t_{(2gL)} = 7,32$; $P<0,05$).

As associações mais freqüentes nos indivíduos com DA e com SD foram do tipo DG (42,4% e 54,2%, respectivamente) e DD (26,1% e 17,7%, respectivamente). Na Figura 2 estão ilustrados cromossomos Dps+ e Gps+, assim como alguns tipos de associações de satélites.

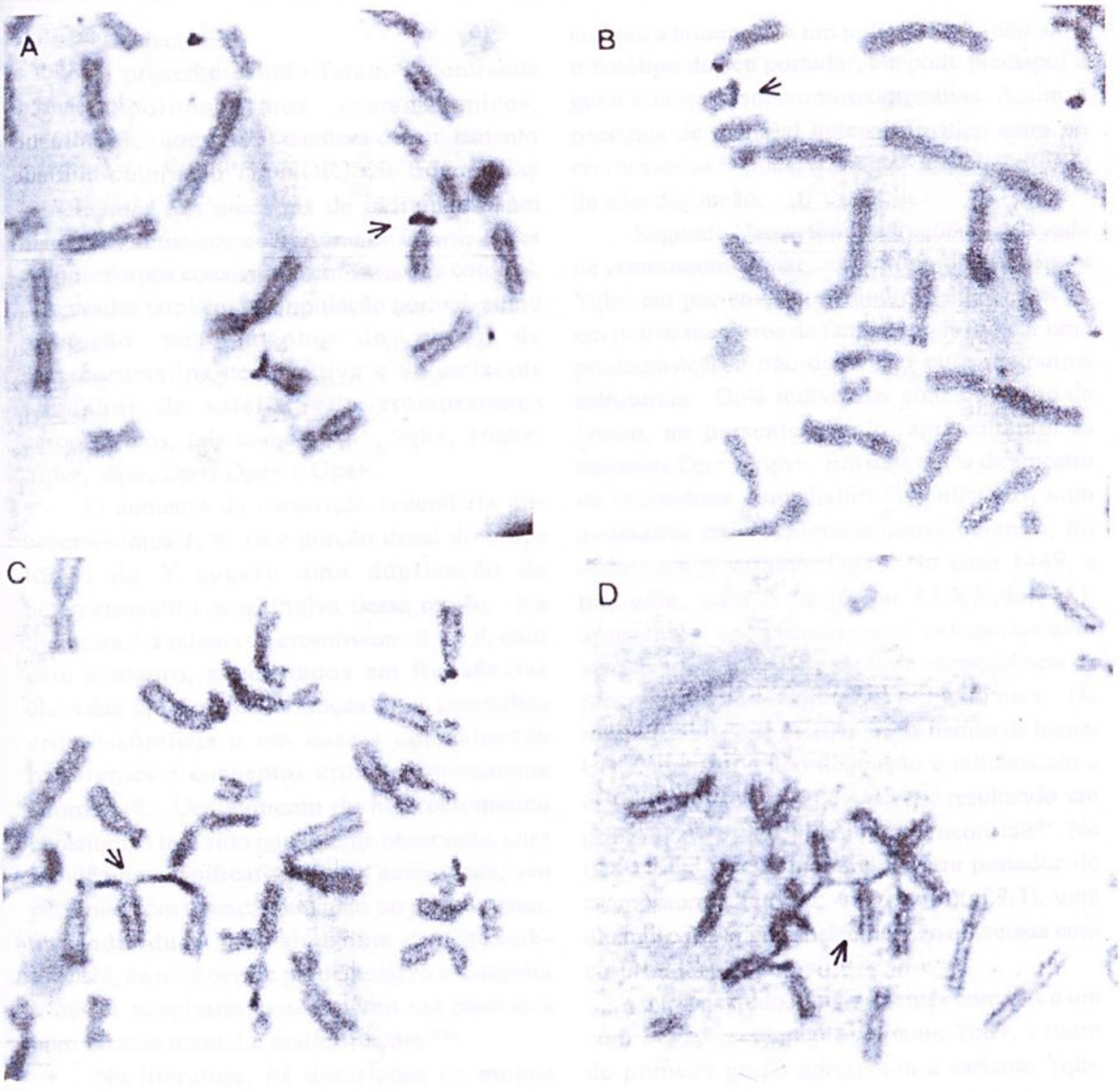


Figura 2. Metáfases parciais em coloração Ag-NOR com (A-B) satélites proeminentes em Dps+ (caso 1447) e Gps+ (caso 1485); (C) associação do tipo DDD (caso 1408) e (D) associação do tipo DDDDG (caso 2615) indicadas por setas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora de etiologias diferentes e padrões comportamentais distintos, os transtornos invasivos do desenvolvimento (TID), especialmente o autismo e a SD, compartilham características comuns, como alguns achados neuropatológicos. Além disso, 4 a 5% dos pacientes com SD apresentam autismo ou outras alterações comportamentais, representando um percentual muito superior ao encontrado na população em geral[14,22]. Portanto, devem ser realizados estudos genéticos que visem a comparação de variantes cromossômicas entre

essas duas afecções.

No presente estudo foram encontrados alguns polimorfismos cromossômicos, identificados através das técnicas de bandamento CBG e coloração Ag-NOR, em freqüências semelhantes nas amostras de indivíduos com distúrbios autísticos e síndrome de Down. Estes polimorfismos consistiram em variantes comuns, observadas também na população normal, como alteração no tamanho do bloco de heterocromatina constitutiva e variantes de tamanhos de satélites de cromossomos acrocêntricos, tais como: 1qh+, 9qh+, 16qh+, Yqh+, Yqh-, Dp+, Dps+ e Gps+.

O aumento da constrição secundária dos cromossomos 1, 9, 16 e porção distal do braço longo do Y sugere uma duplicação da heterocromatina constitutiva dessa região. Na literatura, há relatos de cromossomos 1 e 9, com este aumento, encontrados em freqüências elevadas em pais de crianças com anomalias cromossômicas e em casais com abortos recorrentes e conceptos cromossomicamente anormais[34]. Um aumento de heterocromatina constitutiva tem sido igualmente observado, com incidência significativamente aumentada, em pacientes com doenças malignas ou pré-malignas, em indivíduos com síndrome de Chediak-Higashi, na qual ocorre predisposição a leucemia e outras neoplasias, assim como em pacientes com retardo mental e malformações[35,36].

Na literatura, há descrições de muitas famílias com a variante 1qh+, nas quais a incidência de malformações raras é surpreendentemente mais alta. Nestas famílias, entretanto, tal variante estava presente também em membros normais. Há evidências de que a variante 9qh+ seja mais freqüente em indivíduos com síndrome de Down do que em adultos normais, assim como em pais de crianças com cromossomopatias[37]. No presente trabalho, esta variante foi apenas observada em um indivíduo com síndrome de Down. Conforme Lopetegui[38], embora a presença de um polimorfismo não afete o fenótipo do seu portador, ele pode predispor a gerar crianças com cromossomopatias. Assim, a presença de material heterocromático extra no cromossomo 9 pode aumentar a probabilidade de não-disjunção.

Segundo Hamerton[39], a freqüência elevada de cromossomos marcadores como Dp+, Gp+ e Yqh+ em pacientes com síndrome de Down ou em outros membros da família, pode indicar uma predisposição a não-disjunção ou a rearranjos estruturais. Dois indivíduos com síndrome de Down, no presente estudo, apresentaram as variantes Dp+ e Yqh+. Em dois casos da amostra de indivíduos com distúrbios autísticos, com anomalias cromossômicas constitucionais, foi observada a variante Dp+. No caso 1449, a paciente, com o cariótipo 47,XX,der(15), apresentou um cromossomo extranumerário acrocêntrico, que pode ser uma conseqüência de processo de não-disjunção cromossômica. Há referências de que esses polimorfismos de banda CBG facilitam a não-disjunção e influenciam a expressividade de alguns genes, resultando em prole anormal, abortos ou mortes neonatais[34]. No outro caso, 1461, o indivíduo era portador do cromossomo X frágil, 46,Y,fra(X)(q27.3), uma alteração já bem estabelecida, não associada com erros de disjunção.

Neste estudo, dois pacientes com DA e um com SD apresentaram a variante Yqh+, e outro do primeiro grupo apresentou a variante Yqh-. Não estão completamente estabelecidos a importância biológica e o significado clínico das variantes de tamanho da região heterocromática distal do braço longo do cromossomo Y, porém é importante ressaltar que em amostras de indivíduos com retardo mental e problemas psiquiátricos, a freqüência dessa variante é alta, em torno de 10%[40].

A variante Yqh- resulta, na maior parte dos casos, de deleções da região heterocromática Yqh12, enquanto que a Yqh+ origina-se de uma

duplicação dessa região. Diversos trabalhos têm tentado associar Yqh+ com estatura elevada, esterilidade, abortos e anomalias genitais, ou ainda, com aspectos psicológicos como neuroses, distúrbios comportamentais e aumento no risco para criminalidade. Porém, os estudos não são concordantes nem conclusivos[40].

Embora não se possa excluir a possibilidade de que em alguns casos específicos exista uma relação entre o tamanho aumentado do cromossomo Y e eventuais desvios de conduta, não se pode também ignorar que o comportamento depende tanto de fatores genéticos quanto ambientais, sendo as variações de cada um desses componentes extremamente diversas. Porém, não há dúvida de que os cromossomos sexuais influenciam o desenvolvimento e a capacidade mental, constatados pelas diferenças nas habilidades específicas preferenciais de cada sexo[41].

Quanto às variantes polimórficas evidenciadas pela técnica Ag-NOR, observou-se aumento de satélites em 35% dos indivíduos com distúrbios autísticos e em 40% dos com síndrome de Down. As RON grandes (s+) representam múltiplas cópias de cistrons ribossômicos 18S e 28S e expressam a funcionalidade dos genes das regiões organizadoras do nucléolo, enquanto as RON pequenas têm poucas cópias desses cistrons. As RON s+ indicam, portanto, uma maior quantidade de RNAr, estando presentes em células mais ativas. Apenas as RON que participariam na formação do nucléolo, no estágio de intérfase precedente (RON ativas), são impregnadas pela prata[42]. A expansão clonal das células neoplásicas ocorre graças à intensa atividade transcricional realizada por estas células[27,43].

Nas amostras de indivíduos com DA e SD, as freqüências de NOR+ impregnadas pela prata foram semelhantes, mesmo considerando que os indivíduos com SD apresentem um cromossomo acrocêntrico extra (+21). Tal fato pode estar relacionado com menor atividade transcricional do cromossomo 21 e menor faixa etária dos indivíduos com síndrome de Down, pois, em células de recém-nascidos, o número de NOR ativa é mais baixo que em indivíduos adultos[27]. Payão e colaboradores[44] observaram uma redução na freqüência de NOR positiva em cromossomos específicos, como o par 21, em pacientes com doença de Alzheimer. Borsatto & Smith[45] também verificaram uma diminuição na atividade de genes ribossomais com o aumento da idade em indivíduos com síndrome de Down. Esses resultados indicam uma redução na atividade de genes ribossomais em pacientes com Alzheimer e pacientes mais velhos com síndrome de Down.

A maioria das metáfases, analisadas pela técnica Ag-NOR, do grupo de autistas, apresentou associação de satélites, com freqüência média de associação por célula igual a 0,87. Contudo, esta freqüência na amostra de indivíduos com síndrome de Down foi significativamente menor (0,63). Há a hipótese de que as associações de satélites reflitam a participação dos cromossomos acrocêntricos na formação do nucléolo que, por alguma razão, falharam em se separar. Outros sugerem que as associações de satélites não estão relacionadas com a organização conjunta de um nucléolo, mas à grande homologia existente entre as regiões organizadoras do nucléolo dos diferentes acrocêntricos[46].

Assim, como os polimorfismos de heterocromatina constitutiva, os polimorfismos da região organizadora do nucléolo, apesar de aparentemente não serem a causa direta de malformações, podem refletir na vida reprodutiva do indivíduo, facilitando a ocorrência de não-disjunção cromossômica durante a meiose, com aparecimento de aneuploidias ou malformações, incluindo aborto e morte neonatal, ou ainda, um decréscimo na capacidade de produção de descendentes férteis. Há indicações de que os cromossomos 21 e 13 participam mais freqüentemente em associações de satélites em

mulheres. As trissomias dos cromossomos 21 e 13, responsáveis pelas síndromes de Down e Patau, respectivamente, podem ter como causa a não-disjunção desses cromossomos em conseqüência de sua participação em associações de satélites[47].

Apesar dos polimorfismos cromossômicos estarem relacionados com variações interindividuais e serem também observados em indivíduos normais, verifica-se que estes eventos citogenéticos são mais freqüentes em grupos de indivíduos com retardo mental, malformações e neoplasias. No presente trabalho, verificou-se uma alta freqüência de polimorfismos cromossômicos nos indivíduos com DA e naqueles com SD, sendo que as variantes 9qh+ e 16qh+ foram observadas apenas em indivíduos com SD. Estes polimorfismos podem ser mais freqüentes em SD e atuarem como um dos fatores predisponentes para sua etiologia. Por outro lado, os indivíduos com DA apresentaram uma freqüência maior de associação de satélites, o que pode refletir uma atividade transcricional mais elevada e capacidade de síntese protéica. Também deve-se considerar que a freqüência mais baixa de associação de satélites em indivíduos com síndrome de Down seja devido a faixa etária reduzida dos pacientes, refletindo, portanto, uma redução na atividade de genes ribossomais. Apesar do significado biológico dos polimorfismos não estar totalmente esclarecido, são interessantes investigações em diferentes grupos de indivíduos para que se possa estabelecer uma associação mais precisa entre estas variantes e as diferentes patologias.

Agradecimentos:
Agradecimentos especiais: Doutorando Marcos Roberto Higino Estécio, pela colaboração no estabelecimento do cariótipo dos indivíduos; Josué Rodrigues dos Santos e Brasilina de Fátima Mafei Martins, pela assistência técnica.
Apoio Financeiro: FUNDUNESP, PIBIC/CNPq.

Endereço para correspondência:
Jucimara Colombo
IBILCE-UNESP - Depto. de Biologia
Rua Cristovão Colombo, 2265
CEP: 15.054-000
São José do Rio Preto, SP

ABSTRACT

Chromosome Polymorphisms in Regions of Constitutive Heterochromatin and Nucleolar Organizer in Autism and Down's Syndrome

While pervasive developmental disorders (PDD), in particular autism, are defined as serious behavioral syndromes with a complex, variable and genetically heterogeneity etiology, Down's Syndrome (DS) is one of the most common and most studied genetic diseases. The etiology of DS is the trisomy of chromosome 21. Although these disorders are etiologically different, between 4% and 5% of individuals with DS also present autism or other behavioral deviations. With the aim to verify the occurrence of constitutional chromosome polymorphisms in autistic disorder carriers (AD) and to compare the findings with those of DS, this study investigated the frequency and the types of polymorphisms in the constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) using CBG and Ag-NOR

16. Wing L, Gould J. Severe impairment of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. J Autism Dev Disord 1979; 9: 11-29.

17. Wakabayashi S. A case of infantili autism associated with Down's syndrome. J Autism Dev Disord 1979; 9: 31-6.

18. Gath A, Gumley D. Behaviour problems in retarded children with special reference to Down's syndrome. Br J Psychiat 1986; 149: 156-61.

19. Bregman JD, Volkmar FR. Autistic social dysfunction and Down syndrome. J Am Acad Child Adoles Psychiatry 1988; 27: 440-1.

20. Myers BA, Pueschel SM. Psychiatric disorders in persons with Down syndrome. J Nerv Ment Dis 1991; 179: 609-13.

21. Howlin P, Wing L, Gould J. The recognition of autism in children with Down's syndrome: implications for intervention and some speculations about patology. Dev Med Child Neurol 1995; 37: 406-14.

22. Ghaziuddin. M. Autism in Down's syndrome: family history correlates. J Intellec Disabilit Res 1997; 41: 87-91.

23. Futuyma DJ. Biolologia evolutiva. Ribeirão Preto, SP: Ed. Sociedade Brasileira de Genética; 1992. p. 631.

24. Miklos GL, John B. Heterochromatin and satellite DNA. Am J Hum Genet 1979; 31: 264-80.

25. Gusden JR, Lawrie SS, Coke HJ. A cloned repeated DNA sequence in human chromosome heteromorphism. Cytogenet Cell Genet 1981; 29: 32-9.

26. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 1975; 53: 37-50.

27. Babu LA., Verma RS. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chomosomes. Int Rev Cytol 1985; 94: 151-76.

28. CID 10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Coord. Organiz. Mundial da Saúde; Trad. Dorgival Caetano. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

29. Estécio MRH. Avaliação citogenética e molecular em autismo e outros transtornos invasivos do desenvolvimento [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP; 1999.

30. Varella-Garcia M, Tajara EH. Métodos para análise de cromossomos humanos - manual de protocolos. Laboratório de Citogenética Humana. São José do Rio Preto: Departamento de Biologia, UNESP; 1991. p. 60.

31. Sumner AT. A simple technique for demonstating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 1972; 75: 305-6.

32. Howell WM, Black DA. A rapid technique for producing silver-stained NORs and trypsin-Giemsa bands on human chromosomes. Hum Genet 1980; 43: 53-6.

33. Mitelman F. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S Karger; 1995. p. 114.

34. Nielsen J, Friedrich U, Kreidarsson AB, Zeuthen E. Frequency of 9qh+ and risk of chromosome aberrations in the progeny of individuals with 9qh+. Humangenetick 1974; 2: 211-6.

35. Salamanca-Gomez F, Salazar-Mallen M, Anezeua ME. Chromosome one polymorphism in a girl with the Chediak-Higashi syndrome. Acta Cytologica 1978; 22: 402-5.

36. Buretic-Tomljanovic A, Radojcic-Badovinac A, Vlastilic I, Randic L. Quantitative analysis of constitutive heterochromatin in couples with fetal wastage. Am J Reprod Immunol 1997; 38: 201-3.

37. Blanco B, Castillo J, Frías S, Carnevale A. Polimorfismos de bandas C en los cromosomas 1, 9 y 16 en familias con hijos con trisomia 21 por no disyunción. Rev Invest Clin 1982; 34: 49-52.

38. Lopetegui PH. 1,9 and 16 C-bands heteromorphisms in parents of Downs's syndrome patients: distribution and etiological significance. Jpn J Human Genet 1980; 25: 29-37.

39. Hamerton JL. Human cytogenetics. II - clinical genetics. New York: Academic Press; 1970. p. 236.

40. Buckton KE, O'Riordan ML, Ratcliffe S, Slight J, Mitchell M, McBeath S. A G-band study of chomosomes in liverborn infants. Ann Hum Genet 1980; 43: 227-39.

41. Bühler EM. A synopsis of the human Y chromosome. Hum Genet 1980; 55: 145-75.

42. Miller OJ, Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Croce CM. Expression of human and supression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 4531-5.

43. Nikiciez EP, Norback DH. Spectrum of argyrophilic nucleolar organizer region (Ag-NOR) stainin patterns in chronic and transformed B-cell leukemias. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 265-8

44. Spencer SLM, Smith MAC, Kormanin-Bortolotto MH, Toniolo J. Investigation of nucleolar organizer regions in Alzhmeimer's diasease. Gerontology 1994; 40: 13-7.

45. Borsatto B, Smith MAC. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's syndrome. Gerontology 1996; 42: 147-54.

46. Nazareth HRS. Efeito do cloreto de cobalto em não-disjunção. Ciênc Cult 1976; 28: 1472-5.

47. Mamaev NN, Mamaev SE. Nucleolar organizer region activity in human chromosomes and interphase nuclei of normal, leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining. Int Rev of Cytol 1990; 121: 233-66.

4. MOLECULAR AND CYTOGENETIC ANALYSES ON BRAZILIAN YOUTHS WITH PERVASIVE DEVELOPMENTAL DISORDERS

Journal of Autism and Developmental Disorders, Vol. 32, No. 1, February 2002 (© 2002)

Molecular and Cytogenetic Analyses on Brazilian Youths With Pervasive Developmental Disorders

Marcos Roberto Higino Estécio,[1] Agnes Cristina Fett-Conte,[2] Marileila Varella-Garcia,[3] Cíntia Fridman,[4] and Ana Elizabete Silva[1,5]

The Pervasive Developmental Disorders (PDDs) constitute a group of behavioral and neurobiological impairment conditions whose main features are delayed communicative and cognitive development. Genetic factors are reportedly associated with PDDs and particular genetic abnormalities are frequently found in specific diagnostic subgroups such as the autism spectrum disorders. This study evaluated cytogenetic and molecular parameters in 30 youths with autism or other PDDs. The fragile X syndrome was the most common genetic abnormality detected, presented by 1 patient with autism and 1 patient with PPD not-otherwise specified (PPD-NOS). One girl with PDD-NOS was found to have tetrasomy for the 15q11-q13 region, and one patient with autism exhibited in 2/100 metaphases an inv(7)(p15q36), thus suggesting a mosaicism 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36) or representing a coincidental finding. The high frequency of chromosomopathies support the hypothesis that PDDs may develop as a consequence to chromosomal abnormalities and justify the cytogenetic and molecular assessment in all patients with PDDs for establishment of diagnosis.

KEY WORDS: Cytogenetic analysis; PDD; PDD-NOS; fragile X; genetic factors

INTRODUCTION

Genetic factors are prevalent in the etiology of mental disabilities (Folstein & Piven, 1991; Lombroso, Pauls, & Leckman, 1994). Thus, it is possible that genetic alterations play an important role in the cause of Pervasive Developmental Disorders (PDDs). This group of behavioral and neurobiological disorders comprises autism, Rett's and Asperger's syndromes, childhood disintegrative disorder, and pervasive developmental disorder not-otherwise specified (PDD-NOS) (American Psychiatric Association, 1994). Autism differentiates itself among them owing to early clinical manifestation, which usually occurs within the first 3 years of life. According to Gillberg and Wing (1999), autism is considerably more common than was previously believed, occurring in about 1:1000 children in the general population.

Familial and linkage studies have shown a strong influence of genetic factors in the etiology of autism (Folstein & Piven, 1991; Jorde *et al.*, 1991; Lombroso *et al.*, 1994; Smalley, 1997). Fragile X syndrome is the most frequent cause of inherited mental retardation in males (Sherman, 1996) and is caused by an

[1] Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas–UNESP Campus de São José do Rio Preto, SP, Brazil.
[2] Laboratório de Genética, Departamento de Biologia Molecular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
[3] University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA.
[4] Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
[5] Address all correspondence to Ana Elizabete Silva, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas–UNESP, Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil; e-mail: anaeste@dbio.ibilce.unesp.br

0162-3257/02/0200-0035/0 © 2002 Plenum Publishing Corporation

expansion of a trinucleotide repeat [(CGG)n] in the *FMR-1* gene. Normal individuals carry between 6 to 48 repeats in each allele, whereas affected individuals have alleles with above 200 repeats, which are known as "full mutation." Pre-mutated alleles display from 50 to near 200 repeats and are predisposed to be converted into full mutation during female gametogenesis. Autism was firstly reported in patients with other chromosomopathies, such as trisomy 21 (Wakabayashi, 1979), trisomy 22 (Turner & Jennings, 1961) and, most recently, with marker chromosomes (see Schroer *et al.*, 1998, for references). These findings confirm the genetic heterogeneity of this disease. Whether the same abnormalities found in autism can also participate in PDDs phenotypes is not yet well-demonstrated. This paper reports the cytogenetic and molecular investigation of a Brazilian group of youths with PDDs that was performed in an attempt to identify genetic problems involved in etiology of these diseases.

MATERIALS AND METHODS

Population

Karyotypic and DNA analyses were performed on 30 youths enrolled at the School for the Autist in São José do Rio Preto, SP, Brazil. The group was composed of 18 males and 12 females ranging in age from 5 to 30 years. The clinical diagnosis was achieved by a multidisciplinary professional staff in accordance with the criteria of *DSM-IV* (American Psychiatric Association, 1994). Table I summarizes the number of cases per diagnosis, gender, and age. Only mild dysmorphism was observed in the patients, except for those with genetic abnormalities; clinical features for the latter are presented in the Results section.

Table I. Population of Patients with PDD Under Investigation

Clinical diagnostic	Range of age (years)	Sex		Total
		Male	Female	
Autism	5–22	13	6	19
PDD-NOS	7–30	3	5	8
Rett's syndrome	20	0	1	1
Asperger's syndrome	7–18	2	0	2
Total		18	12	30

PDD-NOS = pervasive developmental disorder not-otherwise specified.

Cytogenetic Studies

Chromosome Analysis

Chromosomes were obtained from phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood lymphocyte cultures, in accordance with standard procedures. Cells were cultured for 72 h in TC199 medium with 5% or 15% fetal calf serum, phytohemagglutinin, and antibiotics. Fluorodeoxyuridine (FudR) and trimethoprim in final concentrations of 2×10^{-7}M and 26 μg/mL, respectively, were introduced for the last 24 h of culture to enhance the appearance of the fra(X). At least 100 GTG-banded metaphases from each patient were scored for the fra(X) and at least 20 metaphases were karyotyped.

FISH Procedure

Cell suspensions fixed on slides were submitted to a dual-target, single-color FISH assay, according to standard procedures. Briefly, three sets of DNA probes manufactured by Oncor (Gaithersburg, MD) were used: (a) D15Z1; (b) D15S11 and PML; (c) GABRB3 and PML. D15Z1 is centromeric, D15S11 and GABRB3 are mapped at 15q11-q13 and PML is mapped at 15q21-22. All probes were labeled with digoxigenin, prepared following the manufacturer's instructions, and applied to selected areas of the slides. These areas were covered with glass coverslips, sealed with rubber cement and hybridization was performed for 20 h in a humidified chamber at 37°C. Probe D15Z1 was detected by fluorescein isothiocyanate (FITC) and the other two sets were detected by Rhodamine (Oncor's Digoxigenin-Rhodamine Detection Kit or Digoxigenin-FITC Detection Kit). Finally, slides were washed in PBS, dehydrated in ethanol series, air dried, and counterstained with DAPI in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). For documentation, gray scale images for single color signals were captured using a cooled CCD camera (SenSys, Photometrics, Tucson, AZ), and were pseudocolored and merged using Quips XL Genetics Workstation (Applied Imaging, Santa Clara, CA).

DNA Analysis

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of patients with PDDs following protocol described in Peaa *et al.* (1991). The (CGG)n repeat was studied using PCR-based tests in all male patients. The molecular diagnosis of fragile X syndrome was conducted according Haddad *et al.* (1994). In brief, 100 ng of genomic DNA was submitted to PCR reaction with three primers, Eag-U, Eag-L, and F.

Two types of amplicons were generated, one monomorphic product with 223bp (internal control of productive PCR) and another with 500-600bp, which contained the region enable to CGG expansion. The product of amplification was resolved on 6% non-denaturing PAGE and visualized with silver staining. Because alleles with full mutation were too large to be amplified by PCR, the absence of a 500 to 600 bp band is indicative of full mutation.

The methylation status of the PWS/AS region was assessed by Southern blotting. Genomic DNA (5 μg) was digested with XbaI + NotI, run on a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized as described (Nicholls *et al.*, 1989). The probe used was a 0.6 kb EcoRI–NotI fragment that contained the exon 1 of the SNRPN gene (Glenn *et al.*, 1996). This probe detects the 0.9kb paternal unmethylated band and the 4.2 kb maternal methylated band.

RESULTS

Of the 30 individuals analyzed, 3 (10%) showed genetic abnormalities confirmed by cytogenetic and molecular methods (Table II). Two male patients, one with autism (Case 1397) and one with PDD-NOS (Case 1461), were found with karyotype 46,Y,fra(X)(q27.3). The cytogenetic results were confirmed by PCR-based test for *FMR-1* expansion (Fig. 1). Both patients presented the physical aspects of fragile X syndrome.

One female patient (case 1449) with PDD-NOS associated with mental retardation and epilepsy was identified with the karyotype 47,XX,+mar. This marker was a small, acrocentric chromosome, with Ag-NOR positive satellites in the end of the short arm. By CBG-banding, constitutive heterochromatin was visualized on both terminal ends. The parents had normal karyotypes. Using fluorescent probes for chromosome 15, we showed that the marker chromosome was an inverted duplication of the proximal portion of a chromosome 15, an inv dup(15)(q11q13). Confirmatory results were found for three FISH probes tested (Fig. 2). Preparations hybridized with probes D15Z1, D15S11/PML, and GABRB3/PML exhibited the expected signals in both copies of the normal chromosome 15 and the extra chromosome was demonstrated as a der(15). It displayed a bright centromeric signal and a signal at the distal region of the long arm in both chromatids when hybridized with the probe D15Z1. In addition, it exhibited two closely related fluorescence signals near the centromere in the hybridization assays with probes D15S11 and GABRB3. The duplicated D15S11 and GABRB3 signals are located in a faint DAPI band between the two centromeric signals. These results indicated that the patient had tetrasomy 15q11-q13. The methylation analysis in this patient disclosed both maternal and paternal bands. However, the maternal band is clearly more intensely stained compared with the normal control, suggesting inheritance of two maternal alleles and one paternal allele (Fig. 3). Therefore, it was concluded that the der(15) is maternally derived. In addition autistim, this patient had mental retardation, convulsions with a Lennox-Gastaut-like encephalographic pathway, ocular hypertelorism,

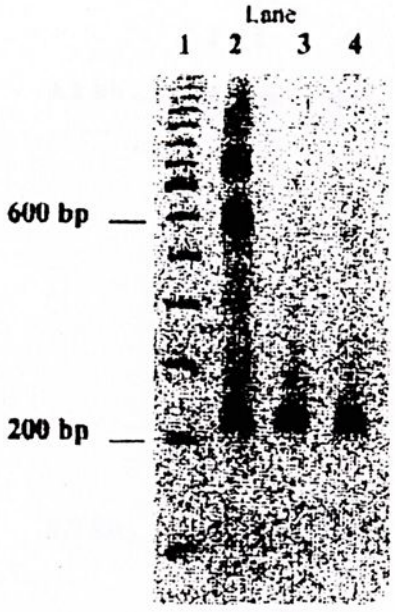


Fig. 1. PCR amplification of the CGG repeat at the *FMR-1* locus in male PDD patients. Lane 1, normal male control; lanes 2 and 3, individuals 1397 and 1461 with full mutation. Note the absence of the approximately 550 bp band in affected individuals (arrow).

Table II. Chromosome Abnormalities

Case	Clinical diagnosis	Karyotype
1397	Autism	46, Y, fra(X) (q27.3)[a]
1461	PDD-NOS	46, Y, fra(X) (q27.3)[a]
1449	PDD-NOS	47, XX, +invdup (15q11-q13)mat[b]

[a] positively confirmed by PCR analysis.
[b] confirmed by FISH and molecular analysis.
PDD-NOS = pervasive developmental disorder-not otherwise specified.

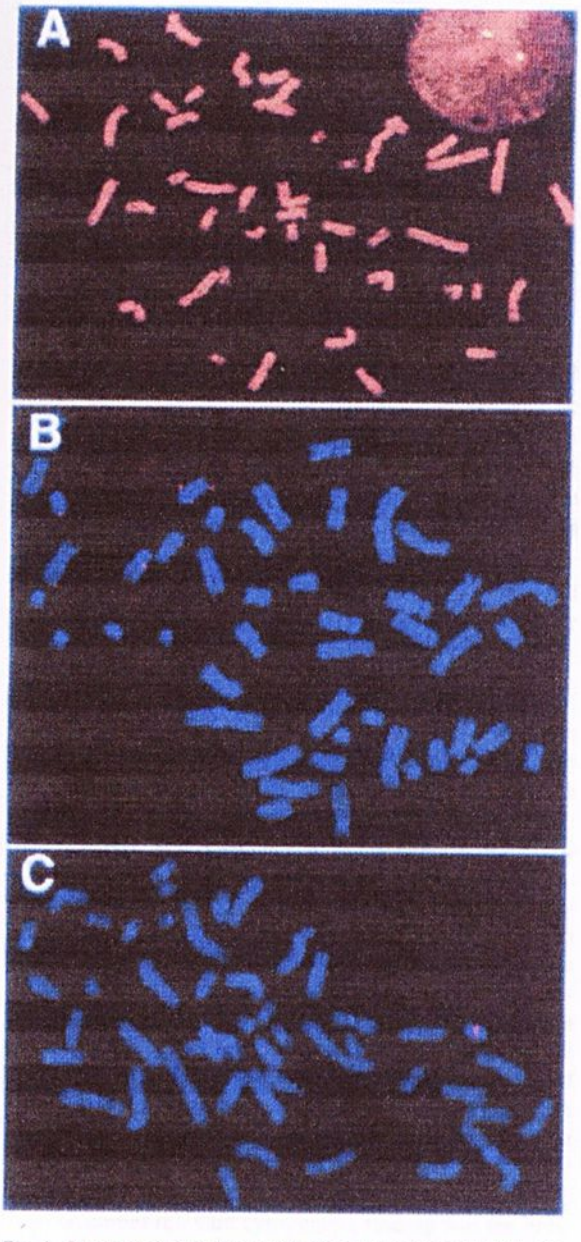


Fig. 2. Metaphases hybridized with D15Z1 (A), D15S11/PML (B), and GABRB3/PML (C) showing two normal copies of chromosome 15 and the small acrocentric der(15). The normal chromosomes exhibit one centromeric signal and one signal for each probe mapped at 15q11-q13 and 15q21-22. The der(15) display two copies for the fluorescence signals that identify the centromeric sequences (A), as well as two fluorescent signals between them (B, C), which suggest duplication of D15S11 and GABRB3 signals, respectively. Interphase nucleus in A also shows four centromeric signals. Chromosomes were pseudocolored in red (A) or blue (B, C) for better visualization of green and red probe signals.

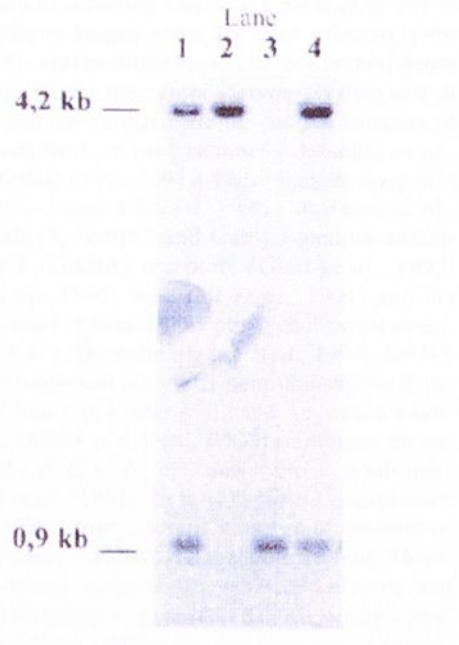


Fig. 3. SNRPN exon 1 methylation analysis. Lane 1, normal control; lane 2, PWS patient due to uniparental disomy; lane 3, AS patient due to deletion; lane 4, Case 1449. Note that the patient's maternal band (4.2kb) showed the same intensity of the PWS patient band (lane 2), which includes two copies of the maternal allele.

generalized hypertrichosis, anteverted nose, and low posterior hairline.

Besides these three cases with chromosomal abnormalities molecularly confirmed, one female patient (case 1394) with autistic disorder showed an inv(7)(p15q36) in two metaphases (2/100) obtained from different culture flasks (Fig. 4). Thus, the karyotype was suggested as mosaicism 46,XX/46,XX,inv(7)(p15q36), but this abnormal chromosome can represent a coincidental finding. Clinical examination revealed the patient had low posterior hairline, upslating palpebral fissures, beaked nose, prognathism, coarse lips, halux valgum, kyphosis, and lordosis.

DISCUSSION

The contribution of genetic factors in the etiology of behavioral and developmental disorders is strongly supported by epidemiological studies involving monozygotic and dizygotic twins, familial segregation, and linkage analysis (Lombroso *et al.*, 1994). Some of these diseases had a previously elucidated genetic component, whereas others are still under investigation. In

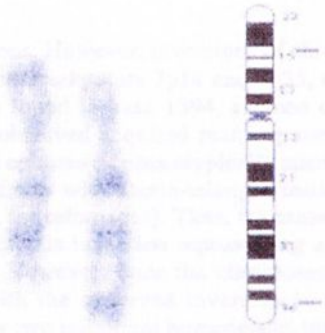


Fig. 4. Normal (at left) and the rearranged chromosome 7 found in case 1394. The breakpoints are indicated on the idiogram.

the present study, cytogenetic and molecular evaluation showed the presence of fragile X syndrome and constitutional chromosome aberration in 3 of the 30 (10%) patients with PDDs. These frequencies are similar to those previously described by Cantú *et al.* (1990) and Li *et al.* (1993) in autistic and autistic-like populations, and also support the significance of chromosomal aberrations in the etiology of PDDs.

Two youths had the fra(X)(q27.3), which was confirmed by molecular test as the FRAXA. The incidence of fra(X) in autism varies among different studies, and the mean is approximately 5.4% to 7.0% in the male autistic population (Fisch, 1992; Hagerman & Silverman, 1996). The frequency found in this survey was 2 of 19 (11%), which did not differ from the literature. The exact mechanism of this association is not clearly delineated: however, it was suggested that alterations in the fmr-1 protein expression can cause neuroanatomic anomalies in the cerebellum and hipoccampus, two important brain areas related to cognitive development (Abitbol *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993). Regardless the true nature of this association, the high incidence of autistic and autistic-like cases patients with the FRAXA is notable, thus justifying a molecular screening of these disturbances to possibly clarify the cause in specific cases and to direct genetic counseling.

Another relevant cytogenetic finding was the presence of a supernumerary chromosome der(15) causing a tetrasomy of the 15q11-q13 region in a PDD-NOS patient. Trisomy and tetrasomy of 15q11-q13 in autism and other PDDs have been reported in several studies (Gillberg *et al.*, 1991; Konstantereas & Homatidis, 1999; Schinzel, 1990), with frequencies ranging from 1.0% to 3.0% (Cantú *et al.*, 1990; Konstantereas & Homatidis, 1999; Schroer *et al.*, 1998; Weidmer-Mikhail *et al.*, 1998). Although strong evidence exists that alterations affecting 15q11-q13 predispose one to autism, little is known about the gene effectively involved. This chromosome region harbor several genes with expression in the central nervous system and in synapses and others that code for protein subunits of neurotransmitters or ions channel (Matsuura *et al.*, 1997; Wagstaff *et al.*, 1991). These include the genes for ubiquitin-ligase E3A (*UBE3A*) (Matsuura *et al.*, 1997), Gabra5, Gabrb3 and Gabrg3 gamma-aminobutiric acid (GABA) receptors (Glatt *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1995; Wagstaff *et al.*, 1991) and the alpha-7 subunit of neuronal nicotinic cholinergic receptors (*CHRNA7*) (Doucette-Stamm *et al.*, 1993). GABA is the most important inhibitory neurotransmitter in the mammals' brain. In Prader-Willi and Angelman's syndromes, *GABRB3* is deleted, which reinforces the involvement of GABA in neurological syndromes (Wagstaff *et al.*, 1991). In rats, *GABRB3* is expressed in the cerebral cortex, cerebellum and hipoccampus, paraventriculars, caudate, and thalamic nucleus. Therefore, functional defects can generate seizures and movement disturbance, as observed in Angelman's phenotype. Similarly, *UBE3A* that has been shown to trigger Angelman's syndrome, is expressed in central nervous system areas with possible association with PDDs, the cerebellum and hippocampus (Matsuura *et al.*, 1997). Chini *et al.* (1994) suggested that the gene *CHRNA7* is involved in convulsive crisis in patients with extra copies of chromosome 15, while Emslie *et al.* (1997) suggested this is a major gene in juvenile myoclonic epilepsy. Freedman *et al.* (1997) showed linkage between a dinucleotide polymorphism on 15q11-q14, locus of *CHRNA7* gene, and schizophrenia, which was also confirmed by Adler *et al.* (1998). The neuronal nicotinic acetilcholine receptors (nAChRs) are members of a superfamily of ion channels, which mediate the fast signals on synapses. These receptors are constituted of subunits, of which alpha-7 is the most important (Doucette-Stamm *et al.*, 1993). Their regulatory function in ion channel permeability and in fast neuronal transmission reinforces their possible participation in epileptic crisis.

One patient with autism showed an inv(7)(p15q36) in 2% of the dividing cells, represented by two metaphase cells obtained from different culture flasks. Fibroblast culture was not possible because the parents did not authorize a skin biopsy. Abnormalities on chromosome 7 were found in other patients with autism. Mariner *et al.* (1986) reported 1 patient with a supernumerary chromosome 7p-, whereas Lopreiatjo and Wulfsberg (1992) observed a rearrangement between chromosomes 1, 7, and 21, involving the 7q11.33 and

7q36.1 regions. However, inversions of chromosome 7 involving the breakpoints 7p14 and 7q35, close to the breakpoints found in case 1394, are one of the most commonly observed acquired rearrangements both in lymphocyte cultures of phenotypically normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia (see Kojis *et al.*, 1991, for references). Thus, we cannot reject the possibility of this inversion representing a coincidental finding. However, once the chromosomal regions involved with the observed inversion in the present study harbor two important homeogenes involved with central nervous system formation, the homeogenes *EN-2* and *HOXA*, the participation of chromosome 7 aberrations in autism must be considered. The homeogene *EN-2*, related to cerebellar development, is mapped at 7q36 (Hanks *et al.*, 1995) and specific polymorphism involving this locus was associated with autism (Petit *et al.*, 1995). The involvement of *EN-2* in cerebellar abnormalities and the possible role of this brain structure in autism are significant, and further investigation is needed to elucidate this matter. Other important developmental genes, the *HOXA* homeogene cluster, are mapped on 7p15, and they are active during neural tube enclosure in mammals (Clagett-Dame & Plum, 1997; Min *et al.*, 1998). According to Rodier *et al.* (1996), the neurological injuries caused by deletion of this gene in model-animals generated identical effects to the thalidomide exposure in human when it occurs between the 20th to 24th gestational day. Interestingly, autism is an associated condition in nearly 30% of the thalidomide victims with exposure on this developmental period. Therefore, it is possible to hypothesize an involvement of *HOXA* genes in PDD. Recently, a large familial study (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998) identified six chromosomes (4, 7, 10, 16, 19, and 22) harboring loci with high frequency of linkage, and several mapped near 7q32. Philippe *et al.* (1999) performed a genome-wide screen with 264 microsatellites markers in 51 multiplex families and found significant association for 7q and 15q11-q13. Thus, it is suggestive of the participation of genes on chromosome 7 in autism and other developmental disorders.

In conclusion, our findings strengthen the need for a systematic genetic evaluation not only in autism but also in other PDDs. The cytogenetic and molecular analyses reinforce the participation of candidate genes localized at 15q11-q13 and Xq27.3 in susceptibility for PDDs. Therefore, this study supports further efforts for molecular analysis of these chromosomal regions as an approach to clarify the cause of these disorders and to contribute to the establishment of therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Robert D. Nicholls for kindly providing the SNRPN exon 1 probe; Dr. Simone Secco da Rocha for psychiatric assessment of the patients; and Dr. Andrea B. C. Salles and Mr. Josué R. Santos for technical assistance. The study was sponsored by the Brazilian agencies CNPq, CAPES, and FUNDUNESP.

REFERENCES

Abitbol M., Menini C., Delezoide A. L., Rhyner T., Vekemans M., & Mallet J. (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of *FMR-1* expression in the human fetal brain. *Nature Genetics, 4*, 147–152.

Adler, L. E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J. G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S., & Freedman, R. (1998). Schizophrenia, sensory gating and nicotinic receptor. *Schizophrenia Bulletin, 24*, 189–202.

American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Press.

Cauli, E. S., Stone, J. W., Wing, A. A., Langes, H. R., & Williams, C. A. (1990). Cytogenetic survey for autistic fragile X carriers in a mental retardation center. *American Journal of Mental Retardation, 94*, 442–447.

Chini, B., Raimond, E., Elgoyhen, A. B., Moralli, D., Balzaretti, M., & Heinemann, S. (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha-7-nicotinic receptor subunit gene (*CHRNA7*). *Genomics, 19*, 379–381.

Clagett-Dame, M., & Plum, L. A. (1997). Retinoid-regulated gene expression in neural development. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 7*, 299–342.

Doucette-Stamm, L., Monteggia, L. M., Donnelly-Roberts, D., Wang, M. T., Lee, J., Tias, J., & Giordano, T. (1993). Cloning and sequence of the human alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. *Drug Developmental Research, 30*, 252–256.

Emalfie, P., Williamson, M. P., Rees, M., Kerr, M., Kjeldsen, M. J., Pang, K. A., Sendqvist, A., Friis, M. L., Chadwick, D., Richens, A., Curtis, D., Whitehouse, W. P., & Gardiner, R. M. (1997). Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Medizinische Genetik, 9*, 15.

Fisch, G. S. (1992). Is autism associated with the fragile X syndrome? *American Journal of Medical Genetics, 43*, 47–55.

Folstein, S. E., & Piven, J. (1991). Etiology of autism: Genetic influences. *Pediatrics, 87*, 767–771.

Freedman, M. C., Coon, H., Myles-Worsley, M., Orr-Urtreger, A., Olincy, A., Davis, A, Polymeropoulos, M., Holik, J., Hopkins, J., Hoff, M., Rosenthal, J., Waldo, M. C., Reimherr, F., Wender, P., Yaw, J., Young, D. A., Breese, C. R., Adams, C., Patterson, D., Adler, L. E., Kruglyak, L., Leonard, S., & Byerley, W. (1997). Linkage of neurophisiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proceedings of the National Academy of Science, 94*, 587–592.

Gillberg, C., & Wing, L. (1999). Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica, 99*, 399–406.

Gillberg, C., Steffenburg, S., Wahlstrom, J., Gillberg, I. C., Sjostedt, A., Martinsson, T., Liedgren, S., & Eeg-Olofsson, O. (1991). Autism associated with marker chromosome. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 30*, 489–494.

Glatt, K. A., Sinnet, D., & Lalande, M. (1992). Dinucleotide repeat polymorphism at the $GABA_A$ receptor alpha-5 (*GABRA5*) locus at chromosome 15q11-q13. *Human Molecular Genetics, 1*, 348.

Glenn, C. C., Saitoh, S., Jong, M. T. C., Filbrandt, M. M., Surti, U., Driscoll, D. J., & Nicholls, R. D. (1996). Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *American Journal of Human Genetics, 58*, 335–346.

Gregor, V., Knoll, J. H. M., Woolf, E., Glatt, K., Tyndale, R. F., Detorey, T. M., Olsen, R. W., Tobin, A. J., Sikela, J. M., Nakatsu, Y., Brilliant, M. H., Whiting, O. S., & Lalande, M. (1995). The gamma-aminobutiric acid receptor gamma-3 subunit gene (*GABRG3*) is tightly linked to the alpha-5 subunit gene (*GABRA5*) on the chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics, 26*, 258–264.

Haddad, L. A., Mingroni-Netto, R. C., Vianna-Morgante, A. M., & Pena, S. D. J. (1996). A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among retarded males. *Human Genetics, 97*, 808–812.

Hagerman, R. J., & Silverman, A. C. (1996). *Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A. B., & Joyner, A. L. (1995). Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science, 269*, 679–682.

Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., & Schalling, M. (1993). Tissue specific expression of *FMR-1* provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genetics, 3*, 36–43.

International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. (1998). *Human Molecular Genetics, 7*, 571–578.

Jorde, L. B., Hasstedt, S. J., Ritvo, E. R., Mason-Brothers, A., Freeman, B. J., Pingree, C., McMahon, W. M., Petersen, B., Jenson, W. R., & Mo, A. (1991). Complex segregation analysis of autism. *American Journal of Human Genetics, 49*, 932–938.

Kojis, T. L., Gatti, R. A., & Sparkes, R. S. (1991). The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genetics and Cytogenetics, 56*, 143–153.

Koumanteras, M. M., & Hourtidis, S. (1999). Chromosomal abnormalities in a series of children with autistic disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders, 29*, 275–285.

Li, S. Y., Chen, Y. C. J., Lai, T. J., Hsu, C. Y., & Wang, Y. C. (1993). Molecular and cytogenetic analysis of autism in Taiwan. *Human Genetics, 92*, 441–445.

Lombroso, P. J., Pauls, D. L., & Lockman, J. F. (1994). Genetic mechanisms in childhood psychiatric disorders. *Journal of the American Academy Child and Adolescent Psychiatry, 33*, 921–928.

Lopreiatjo, J. O., & Wulfsberg, E. A. (1992). A complex chromosome rearrangement in a boy with autism. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics, 13*, 281–283.

Mariner, R., Jackson, A. W., Levitas, A., Hagerman, R. J., Braden, M., McBogg, P. M., Smith, A. C. M., & Berry, R. (1986). Autism, mental retardation and chromosomal abnormalities. *Journal of Autism and Developmental Disorders, 16*, 425–440.

Matsuura, T., Sutcliffe, J. S., Fang, P., Galjaard, R. J., Jiang, Y., Benton, C. S., Rommens, J. M., & Beaudet, A. L. (1997). *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. *Nature Genetics, 15*, 74–77.

Min, W., Woo, H. I., Lee, C. S., Lee, K. K., Yoon, W. K., Park, H. W., & Kim, M. H. (1998). 307-bp fragment in HOXA7 upstream upstream sequence is sufficient for anterior boundary formation. *DNA and Cell Biology, 17*, 293–299.

Nicholls, R. D., Knoll, J. H. M., Glatt, K., Herath, J. H., Brewster, T. D., Graham, Jr. J. M., Wurster-Hill, D., Wharton, R., & Latt, S. A. (1989). Restriction fragment length polymorphisms within proximal 15q and their use in molecular cytogenetics and the Prader-Willi syndrome. *American Journal of Medical Genetics, 33*, 66–77.

Pena, S. D. J., Macedo, A. M., Gontijo, N. F., Medeiros, A. M., & Ribeiro, J. C. C. (1991). DNA blueprint: Simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis, 12*, 146–152.

Petit, E., Hérault, J., Martineau, J., Perrot, A., Barthélémy, C., Hameury, L., Sauvage, D., Lelord, G., & Mih, J. P. (1995). Association study with two markers of a human homologue in infantile autism. *Journal of Medical Genetics, 32*, 269–274.

Philippe A., Martinez, M., Guilloud-Bataille, C., Rastam, M., Sponheim, S., Coleman, M., Zappella, M., Aschauer, H., van Malldergerme, L., Penet, C., Feingold, J., Brice, A., & Leboyer, M. (1999). Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Human Molecular Genetics, 8*, 805–812.

Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., & Romano, J. (1996). Embryological origin of autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology, 370*, 247–261.

Schinzel, A. (1990). Autistic disorder and additional inv dup (15) (pter q13) chromosome. *American Journal of Medical Genetics, 35*, 447.

Schroer, R. J., Phelan, M. C., Michaelis, R. C., Crawford, E. C., Skinner, S. A., Cuccaro, M., Simensen, R. J., Bishop, J., Skinner, C., Fender, D., & Stevenson, R. C. (1998). Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *American Journal of Medical Genetics, 76*, 327–336.

Sherman, S. (1996). Epidemiology. In: Hagerman, R. J. and Silverman, A. C. (Eds.). *Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 3–87.

Smalley, S. L. (1997). Genetic influences in childhood onset psychiatric disorders: Autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *American Journal of Human Genetics, 60*, 1276–1282.

Turner, B., & Imaikaga, A. N. (1961). Trisomy for chromosome 22. *Lancet, 1*, 49–50.

Wagstaff, J., Knoll, J. H. M., Fleming, J., Kirkness, E. F., Martin-Gallardo, A., Greenberg, F., Graham, J. M. Jr., Menninger, J., Ward, D., Venter, J. C., & Lalande, M. (1991). Localization of the gene encoding the GABA-A receptor b3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *American Journal of Human Genetics, 49*, 330–337.

Wakabayashi, S. (1979). A case of infantile autism associated with Down syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders, 9*, 31–36.

Wiedmer-Mikhail, B., Sheldon S., & Ghaziuddin, M. (1998). Chromosomes in autism and related pervasive developmental disorders: A cytogenetic study. *Journal of Intellectual Disability Research, 42*, 8–12.

5. TETRASOMY 15q11-q13 IDENTIFIED BY FLUORESCENCE *IN SITU* HIBRIDIZATION IN A PATIENT WITH AUTISTIC DISORDER

Arq Neuropsiquiatr 2002;60(2-A):290-294

TETRASOMY 15Q11-Q13 IDENTIFIED BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION IN A PATIENT WITH AUTISTIC DISORDER

Ana Elizabete Silva[1], Sheila Adami Vayego-Lourenço[2], Agnes Cristina Fett-Conte[3], Eny Maria Goloni-Bertollo[3], Marileila Varella-Garcia[4]

ABSTRACT - We report a female child with tetrasomy of the 15q11-q13 chromosomal region, and autistic disorder associated with mental retardation, developmental problems and behavioral disorders. Combining classical and molecular cytogenetic approaches by fluorescence *in situ* hybridization technique, the karyotype was demonstrated as 47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1++,D15S11++,GABRB3++,PML-). Duplication of the 15q proximal segment represents the most consistent chromosomal abnormality reported in association with autism. The contribution of the GABA receptor subunit genes, and other genes mapped to this region, to the clinical symptoms of the disease is discussed.

KEY WORDS: tetrasomy 15, 15q11-q13, autism, fluorescence *in situ* hybridization, GABA receptors.

Identificação de tetrassomia 15q11-q13 por hibridação *in situ* fluorescente em uma paciente com disturbio autistico

RESUMO - Relatamos uma criança do sexo feminino com tetrassomia da regiao cromossômica 15q11-q13 e disturbio autistico associado com retardo mental, problemas de desenvolvimento e disturbios comportamentais. A combinação de metodologias da citogenética classica e molecular pela tecnica de hibridaçao *in situ* fluorescente, demonstrou o cariotipo como 47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1++,D15S11++,GABRB3++,PML). Duplicação do segmento 15q proximal representa a mais consistente anomalia cromossômica relatada em associação com autismo. A contribuiçao dos genes das subunidades do recepetor GABA, assim como outros genes mapeados nessa regiao, para os sintomas clinicos da doença e discutida.

PALAVRAS CHAVE: tetrassomia 15, 15q11-q13, autismo, hibridaçao *in situ* fluorescente, receptores GABA.

Autism is a severe disorder that predominantly affects males (4 males:1 female)[1]. The reported population prevalence ranges from 1 in 1,000 [2] to 1 in 10,000 live births[1], this large range probably being due to inaccurate data collection based on Kanner's description of this syndrome. The diagnosis of autism is based upon a number of behavioral criteria including abnormal social behavior, language and cognitive development[3]. Similar to most behavioral syndromes, autism is etiologically heterogeneous and has been associated with a diverse set of infectious diseases such as rubella embryopathy and herpes encephalitis, or genetic conditions such as phenylketonuria, tuberous sclerosis, and fragile X syndrome[3]. However, trisomy or tetrasomy of the 15q11-q13 region has also been reported in some autistic patients with varying degrees of mental retardation[4-12]. Abnormalities involving this chromosomal region are commonly identified in association to Prader-Willi syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS), usually as chromosomal deletion. Additional copies of this chromosomal segment are less frequently depicted and have been found in distinct phenotypes, including autistic disorder, a few PWS and AS cases[5,13], and even apparently normal individuals[5,6,14].

This report describes a female patient with autis-

[1]Professor Assistente Doutor - Departamento de Biologia, IBILCE, State University of São Paulo (UNESP) Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil; [2]Professor Assistente Doutor - Centro Universitario de Votuporanga, CEUV, Votuporanga, SP, Brasil; [3]Professor Adjunto - Departamento de Biologia Molecular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil; [4] Associate Professor - Department of Medicine, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA. Financial support: Partially supported by grants from FUNDUNESP (Brazil) to AES, and the National Cancer Institute [CA46934] to MVG.

Received 8 August 2001, received in final form 26 October 2001. Accepted 5 November 2001.

Dra. Ana Elizabete Silva - Departamento de Biologia - IBILCE-UNESP - Rua Cristovão Colombo 2265 - 15054-000 São José do Rio Preto SP - Brasil. E-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br

tic disorder whose karyotype displayed an extra chromosome, identified by the fluorescence in situ hybridization technique as a der(15) with a duplication of 15q11-q13. This case report reinforces the hypothesis that additional copies of this chromosomal segment may be causally related to autism.

METHOD

Case

The patient was a female, born at full term in 1988 by normal delivery, with a birth weight of 2,650 g and a body length of 46 cm. The 29-year-old mother and the 30 year-old father were non consanguineous and reported a previous first trimester spontaneous abortion. At 4 years of age, the patient presented with developmental delay, mental retardation, hyperactivity, poor motor coordination, stereotyped movements, anti social behavior, abnormal language skills, and inability to maintain social approaches. She was diagnosed as having infantile autism (DSM-IIIR)[15], and a multiprofessional therapy was initiated which resulted in pronounced improvement in the clinical picture. Physical examination at 8 years of age revealed hyperlaxity of joints, hypotonia, dolichocephaly, prominent occiput, malformed auricles, bilateral epicanthal folds, downslanting palpebral fissures, strabismus, high arched palate, micrognathia, kyphoscoliosis, pectus excavatum, and bilateral fifth finger clinodactyly. Brain tomography, X-ray, and nuclear magnetic resonance evaluations were all normal. At that time, the diagnosis of autistic disorder (DSM-IV)[1] was established.

Cytogenetic studies

Peripheral blood lymphocytes from the patient and her parents were cultured using PHA stimulated procedure, harvested and GTG banded following standard protocols. To confirm the origin of the marker chromosome that was found, dual target, single color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays were performed. Slides were washed 1 min in 70% acetic acid, rinsed in PBS, digested at 37°C in RNase A (100 µg/ml in 2xSSC) for one h and in pepsin (0.01% in 0.01M HCl) for 5 min. Slides were then fixed in formaldehyde (1% in PBS) at 37°C for 5 min, washed in PBS, dehydrated in an ethanol series, and denatured in 70% formamide/2xSSC for 3 min at 72°C.

Three sets of DNA probes manufactured by Oncor (Gaithersburg, MD) were used: (a) D15Z1; (b) D15S11 and PML; (c) GABRB3 and PML. D15Z1 is centromeric, D15S11

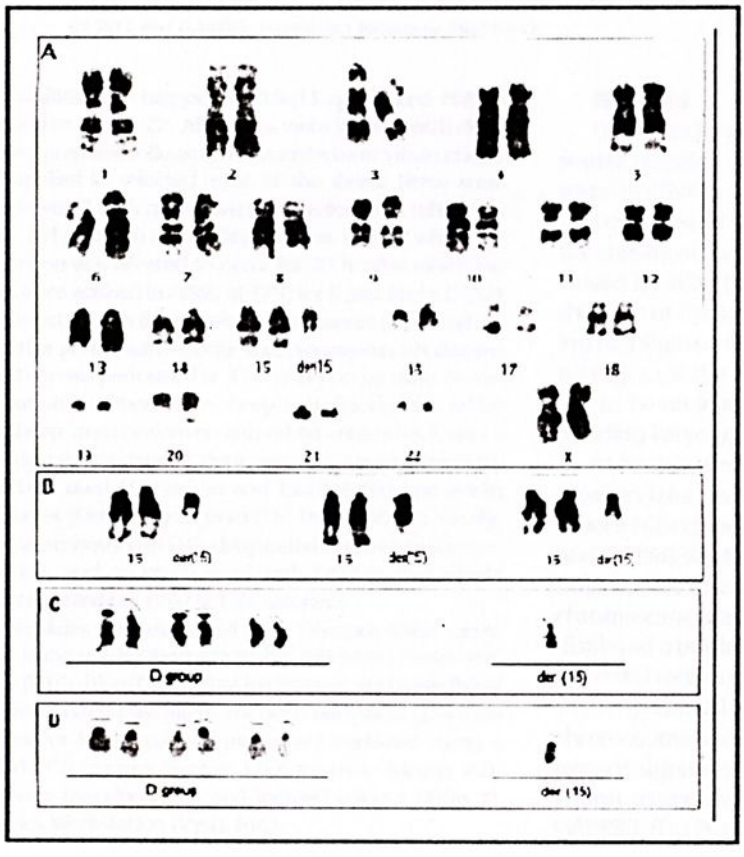


Fig 1. Complete (A) and partial (B) GTG-banding karyotypes. Partial karyotypes showing the D- group chromosomes: (C) AgNOR-banding showing a single satellite extending from the long-arm end in the extra chromosome; (D) CBG-banding highlighting the functional centromere and an additional band at the end of the long arm of this extra chromosome.

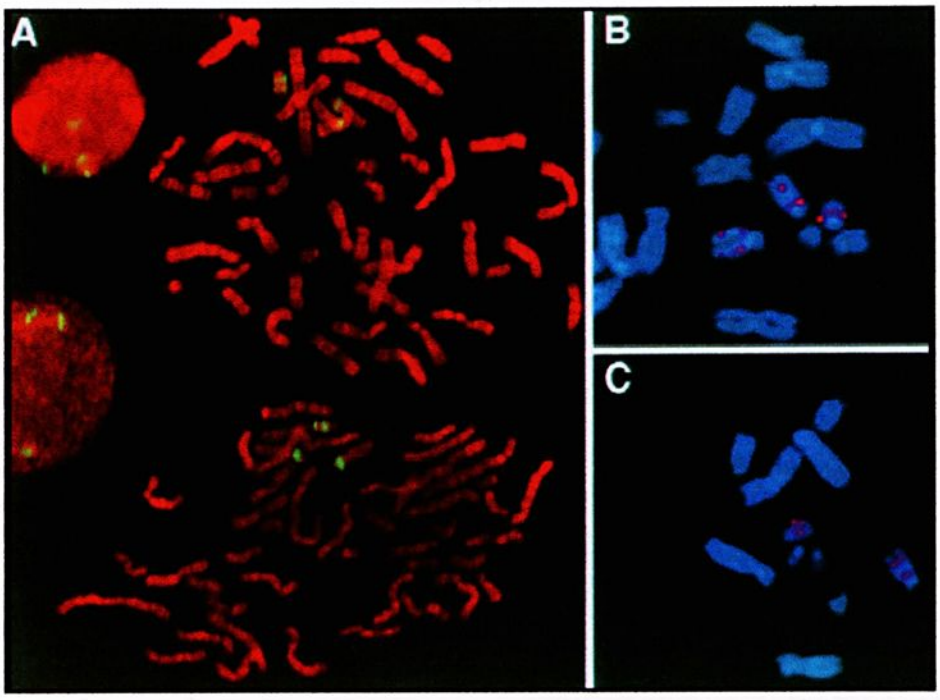


Fig 2. Metaphases hybridized with D15Z1 (A) and partial metaphases hybridized with D15S11/PML (B) and GABRB3 (C). Two normal copies of chromosome 15 displayed the expected centromeric signals and signals mapped at q11-13 and q21-22. The der(15) has two copies of the centromeric signal and a duplicated signal for D15S11 and GABRB3, suggesting tetrasomy 15q11-q13.

and GABRB3 are mapped at 15q11-q13[16], and PML is mapped at 15q21-22. All probes were labeled with digoxigenin, prepared following the manufacturer's instructions, and applied to selected areas of the slides. These areas were covered with glass coverslips, sealed with rubber cement and placed in a humidity chamber at 37°C where hybridization was allowed to occur for 20 h, after which the slides were washed in 2xSSC at 72°C for 5 min. Probe D15Z1 was detected with fluorescein isothiocyanate (FITC) and the two other probes with Rhodamine. Digoxigenin-Rhodamine detection was performed at 37°C using consecutive 30 min incubations in Rhodamine-sheep anti-digoxigenin, rabbit anti-sheep, and Rhodamine-anti-rabbit antibodies (Oncor's Digoxigenin-Rhodamine Detection Kit). Digoxigenin-FITC detection used FITC-avidin and biotinylated anti-avidin antibodies (Oncor Digoxigenin-FITC Detection Kit). Finally, slides were washed in PBS, dehydrated in an ethanol series, air dried, and counterstained with DAPI in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories).

The slides were examined in an Olympus BX60 microscope using single interference filter sets of red (Texas red), green (FITC), blue (DAPI), dual (red/green), and triple (blue/red/green) band-pass filters. For documentation, gray scale images for single color signals were captured using a cooled CCD camera (SenSys, Photometrics, Tucson, AZ), and were pseudocolored and merged using a Quips XL Genetics Workstation (Vysis, Inc.).

RESULTS

GTG-banding analysis of the patient's chromosomes revealed one small supernumerary chromosome in 20 cells scored, and the patient's karyotype was designated 47,XX,+mar (Figure 1A-B). This extra chromosome was acrocentric and, as was revealed by NOR-banding, showed satellites only at the ends of the long arm (Figure 1C). The CBG-banding highlighted the primary constriction plus an extra region at the end of the long arm, which appeared to be an inactive centromere (Figure1D). GTG-banding karyotypes of both parents were normal.

At least 30 metaphases were scored in each FISH assay and the results are illustrated in Figure 2. Preparations hybridized with probes D15Z1, D15S11/PML, and GABRB3/PML exhibited the expected signals in both copies of normal chromosome 15. The extra chromosome was demonstrated to be der(15), and displayed a bright centromeric signal and a signal at the distal region of the long arm in both chromatids when hybridized with the D15Z1 probe (Fig 2A). This chromosome also exhibited two closely located fluorescent signals near the centromere in the hybridization assays with probes D15S11 (Fig 2B) and GABRB3, (Fig 2C), the signals being located in a faint

DAPI band between the two centromeric signals, indicating that the der(15) chromosome has segment 15q11-q13 duplicated and that the karyotype of the patient is 47,XX, +mar.ish der(15) (D15Z1++, D15S11++,GABRB3++, PML-).

DISCUSSION

Although a variety of chromosomal anomalies have been described in individuals with autistic disorder[9-11], the occurrence of extra copies of 15q11-q13 has been the one most frequently reported. Despite the great clinical variation amongst autistic patients with additional copies of the proximal region of 15q, our patient shared features such as mental retardation, hyperactivity, epicanthal folds, high-arched palate, kyphosis, and strabismus with another cases. Spontaneous abortion in the family, as observed in the present case, was also previously reported[5-7]. The number of additional copies of this region and the extent of the duplicated region are some of the major factors tentatively associated with clinical severity in these patients. In most cases, including the patient reported here, an inverted duplication [inv dup(15)(pter-q13)] in an additional chromosome was responsible for the tetrasomy of this region[2,7,14]. In a smaller number of cases this region was found in trisomy[4,8,9]. Trisomic patients usually displayed a milder phenotype while tetrasomic patients have more severe clinical features[4,5,13,14].

A considerable heterogeneity in size, shape and molecular composition of the 15q proximal region was observed in the derivative chromosomes. Despite this, it is suggested that more severe features such as mental retardation and autistic behavior are associated with a longer extension of the duplication[5,6]. The der(15) found in the present patient is similar to the derivatives classified as type 3 in Cheng et al.[5] and as type 1 in Crolla et al.[6], which correspond to bi-satellited, dicentric marker with inv dup(15), including two additional copies of all loci extending from the centromere distal to D15S12, differing only in the presence of a single satellite at the end of the long arm.

Another factor that may play a role in the phenotypic variability reported in the literature is the parental origin of the extra chromosome. A large number of 15q11-q13 rearrangements of autistic patients which were evaluated for their parental origin were identified as maternally derived[5,8,10,12,13]. However in this work is not possible to establish the parental origin of the extra chromosome. In a informative family, Cook et al.[8] observed that paternally inherited duplications of 15q11-q13 led to a normal phenotype, whereas maternally inherited duplications led to typical or atypical autism. These findings suggest an important role for genetic imprinting in susceptibility to autism, which is not unexpected since the 15q11-q13 region is known to be critically imprinted in humans. Both paternal and maternal copies of this region are required for normal development, with loss of the paternal contribution leading to PWS and loss of the maternal contribution resulting in the AS phenotypes[15]. Surprisingly, Mohandas et al.[16] reported a paternally derived de novo interstitial duplication of the proximal 15q containing the PWS/AS critical region in a patient with developmental delay, which raises the question as to whether or not all paternal duplications are benign with respect to phenotype. Mohandas et al.[16] hypothesized that the breakpoints generating the 15q duplications, although clustered in the proximal 15q, may vary at the molecular level resulting in dosage changes for a different set of genes. It is also possible that the clinical findings in this patient may not be causally related to the duplication.

A number of genes potentially related to autism have been mapped at 15q11-q13. These genes include the pigmentation gene P, which is suggested to be related with the hypomelanosis of Ito[17], the ubiquitin-protein ligase (UBE3A) that is responsible for AS[20], and the three $GABA_A$ receptor subunits, GABRB3[21], GABRA5[22] and GABRG3[23]. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain with synaptically released GABA activating receptors which open chloride-permeable ion channels and inhibit the electrical activity of the neuron, thus making it less responsive to an excitatory input[24]. Previous studies indicated a role for GABA in the suppression of seizure activity and defects in GABA receptor function in the brain might be expected to produce seizures, uncontrolled behavior, and disorders of movement, all effects related with suppression of β3 subunit gene expression[21]. Wagner et al.[25] reported that GABA can also act as an excitatory transmitter and can excite mature neurons in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. It acts as an inhibitory neurotransmitter at night and an excitatory neurotransmitter during the day. This dual effect, which is mediated by GABA receptors, may be attributed to a diurnal oscillation in intracellular chloride concentration. Therefore, it is conceivable that an excess of GABA receptors could lead to

behavioral problems such as hyperactivity and to epilepsy. Whether the GABA receptor gene is causally related to autism is not yet clear, and the duplicated chromosomal segment notably includes several other genes. However, Cook et al.[26] screened nine loci on the 15q11-q13 region for linkage disequilibrium with autistic disorder, and linkage disequilibrium was found only affecting GABRB3 155CA-2 locus, pointing to this gene as a causative candidate gene for autistic disorder.

The currently available data underline the necessity of searching for chromosome 15q11-q13 abnormalities in patients with autism, and support the molecular analysis of this region as an approach to the clarification of the etiology of this disorder.

Acknowledgement - The authors acknowledge the technical support received from Josué Rodrigues dos Santos and Cintia Fridman.

REFERENCES

1. Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo ER, et al. Complex segregation analysis of autism. Am J Hum Genet 1991;49:932-938.
2. Gillberg C, Wing L. Autism: not an extremely rare disorder. Acta Psychiatr Scand 1999;99:399-406.
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: fourth Ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
4. Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S. Brief report: duplication of chromosome 15q11-q13 in two individuals with autistic disorder. J Autism Dev Disord 1994;24:529-535.
5. Cheung SD, Spinner NB, Zackai EH, Knoll JHM. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosome 15 from 11 patients. Am J Hum Genet 1994;55:753-759.
6. Cuscia JA, Harvey JE, Stich FL. Supernumerary marker 15: chromosome: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. Hum Genet 1995;95:161-170.
7. Hotopf M, Bolton P. A case of autism associated with partial tetrasomy 15. J Autism Dev Disord 1995;25:41-49.
8. Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, et al. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. Am J Hum Genet 1997;60:928-934.
9. Schaver RJ, Phelan MC, Mudlaski RJ, et al. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15. Am J Med Genet 1998;76:327-336.
10. Garnier F, Briault A, Torrisi I, et al. Persistent developmental disorder and epilepsy due to maternally derived duplication of 15q11-q13. Neurology 1999;52:1694-1697.
11. Konstantareas MM, Hamilton S. Chromosomal abnormalities in a series of children with autistic disorder. J Autism Dev Disord 1998;28:275-286.
12. Wolpert CM, Menold MM, Bass MP, et al. Three probands with autistic disorder and isodicentric chromosome 15. Am J Med Genet 2000;96:365-372.
13. Robinson WP, Wagstaff J, Bernasconi F, et al. Unipaternal disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with an additional small inv dup(15) chromosome. Am J Med Genet 1993;30:756-760.
14. Ioannu Cox J, Jenkins L, Palmer C, et al. Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome: aetiological implications. Am J Hum Genet 1994;54:748-756.
15. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: third edition revised. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1987.
16. Mahon S, Donlon T. Report of the second international workshop on human chromosome 15 mapping 1994. Cytogenet Cell Genet 1994;67:2-14.
17. Li SY, Chen YC, Lai TJ, Hsieh Y, Wang YC. Molecular and cytogenetic analysis of autism in Taiwan. Hum Genet 1993;92:411-415.
18. Mohandas TK, Park JP, Spelman RA, et al. Paternally derived de novo interstitial duplication of proximal 15q in a patient with developmental delay. Am J Med Genet 1999;82:294-300.
19. Pellegrino JE, Schaur RE, Kline R, Zackai EH, Spencer NS. Mosaic loss of 15q11-q13 in a patient with hypomelanosis of Ito: is there a role for the P gene? Hum Genet 1995;96:485-489.
20. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. Nat Genet 1997;15:74-77.
21. Wagstaff J, Knoll JHM, Fleming J, et al. Localization of the gene encoding the GABA$_A$ receptor beta-3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. Am J Hum Genet 1991;49:330-337.
22. Glatt KA, Sutcliffe JS, Lalande M. Dinucleotide repeat polymorphism at the GABA$_A$ receptor alpha 5 (GABRA5) locus at chromosome 15q11-q13. Hum Mol Genet 1992;1:348.
23. Greger V, Knoll JHM, Woolf E, et al. The gamma-amino-butyric-acid receptor gamma 3 subunit gene (GABRG3) is tightly linked to the alpha 5 subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11-q13, and is transcribed in the same orientation. Genomics 1995;26:238-241.
24. Cowell CS. Time to get excited by GABA. Nature 1997;387:551-555.
25. Wagner S, Castel M, Gainer H, Yaron Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. Nature 1997;387:598-603.
26. Cook EH Jr, Courchesne RY, Cox NL, et al. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. Am J Hum Genet 1998;62:1077-1083.

INVESTIGAÇÃO DE MALFORMAÇÕES FÍSICAS E MENORES EM PORTADORES DE TRANSTORNOS INVASIVOS DO DESENVOLVIMENTO

6. INVESTIGAÇÃO DE MALFORMAÇÕES FÍSICAS MENORES EM PORTADORES DE TRANSTORNOS INVASIVOS DO DESENVOLVIMENTO

INVESTIGAÇÃO DE MALFORMAÇÕES FÍSICAS MENORES EM PORTADORES DE TRANSTORNOS INVASIVOS DO DESENVOLVIMENTO.

Carina Tatiana Giunco[1], Ana Elizabete Silva[2], José Antônio Cordeiro[3], Agnes Cristina Fett Conte[4]

1- Doutoranda - Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP - São Jose do Rio Preto - SP - Brasil

2- Professor Assistente Doutor - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética - Departamento de Biologia – IBILCE - UNESP- São Jose do Rio Preto – SP - Brasil

3- Livre Docente - Coordenador de Ensino - Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) - São José do Rio Preto SP-Brasil

4- Professor Adjunto - Chefe do Serviço de Genética - Departamento de Biologia Molecular- Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto (FAMERP) - São José do Rio Preto – SP - Brasil

Endereço para correspondência

Carina Tatiana Giunco

Rua Chede Scaff, 279 Vila Itália CEP 15035-130

São José do Rio Preto – SP - Brasil

Email: genética@famerp.br

Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 2004, *submitted.*

Abstract

Pervasive development disorders interfere in the emotional and cognitive development of the individual. They are common in the population and have a complex and as yet unknown etiology but genetic and environmental factors are involved and can be present associated with other genetic syndromes and environmental diseases. Independently of the etiological findings, an increase in the frequency of minor physical malformations has been described in patients with theses disorders. The physical and etiological complexity suggests that different genes and degrees of genetical expression might influence the etiology of these diseases. Studies that provide the definition of the phenotypic characteristics of these sufferers are important and present direct implications in genetic counseling of the families. This study investigated the presence of minor physical malformations in pervasive development disorder carriers and observed that the abnormalities are significantly more common in these individuals than in individuals in a control group.

Key words: Autism; Pervasive development disorders; minor physical malformations

Resumo

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento interferem no desenvolvimento emocional e cognitivo do indivíduo. São frequentes na população e tem etiologia complexa e desconhecida, estão envolvidos com fatores genéticos e ambientais e apresentam-se em comorbidade com outras síndromes genéticas e doenças ambientais. Independentemente dos achados etiológicos, uma freqüência aumentada de malformações físicas menores tem sido descrita nos pacientes com estes distúrbios. A complexidade física e etiológica sugere que diferentes genes e níveis de expressão gênica podem contribuir na etiologia destas doenças e que estudos que propiciem a definição do espectro fenótipico dos afetados são importantes e apresentam implicações diretas no aconselhamento genético das famílias. O presente trabalho investigou a presença de malformações físicas menores em portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento e observou que estas foram significativamente mais freqüentes nestes indivíduos do que nos controles.

Palavras Chaves: autismo/ Transtornos Invasivos do Desenvolvimento/ Malformações Físicas Menores

Introdução

Desde a década de 70, vem sido discutida a presença de malformações físicas menores em autismo e outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID) e os afetados mostram uma frequência significativemente maior destas quando comparados com indivíduos controles (1).

Atualmente, os estudos apontam para a grande heterogeneidade dos TID e discutem a definição de subgrupos homogêneos de indivíduos com ou sem alterações fenotípicas. O grupo sem outras características associadas pode ter uma etiologia geneticamente distinta daqueles com malformações físicas (2). Essa diferença pode ser explicada por vários níveis de expressão gênica no fenótipo clínico e comportamental, dada a heterogeneidade das doenças.

Quando o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento está relacionado ou faz parte do quadro fenotípico de uma doença genética, as manifestações clínicas esperadas incluem as da própria doença, inclusive, os TID já foram associados com diversas patologias genéticas, entre as quais a Síndrome do Cromossomo X Frágil, a Esclerose Tuberosa, síndrome de Down e de a Síndrome de Turner. (3, 4, 5,6).

Contudo, independentemente de achados clínicos específicos, uma freqüência aumentada de malformações físicas menores tem sido descrita em autismo e em outros TID. Rodier *et al.* relataram que a alteração mais freqüente e específica observada no fenótipo físico dos autistas é a rotação posterior dos pavilhões auriculares. Além desta, pés pequenos, mãos grandes e redução da distância interpupilar também são consistentemente observados (7).

A identificação de sinais clínicos que façam parte do espectro fenotípico dos TID e a identificação de subgrupos relacionados aos mesmos, pode auxiliar no diagnóstico e na

identificação de "marcadores" físicos dos eventos relacionados à etiologia destes distúrbios tão complexos (2).

Este trabalho descreve os resultados de investigação de malformações físicas menores em indivíduos com TID.

Material e Métodos

Após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido e aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, foram avaliados 48 indivíduos (Grupo 1), provenientes de escolas especializadas em TID e diagnosticados por equipes multidiciplinares, de acordo com os critérios do CID 10 e do DSM-IV. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por anamnese, seguida de exame físico geral e dismorfológico, além de dados antropométricos, de uso genético-clínico. Cada paciente foi avaliado individualmente, no Ambulatório de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP, Brasil.

O grupo controle (Grupo 2) foi constituído por 48 indivíduos saudáveis, pareados por sexo, etnia idade e nível sócio-econômico, provenientes de escolas regulares de São José do Rio Preto.

Foram investigadas características e medidas físicas, sempre pela mesma equipe, composta entre outros, por um geneticista e um pediatra, de acordo com o protocolo padrão utilizado no processo de aconselhamento genético desenvolvido rotineiramente no Hospital. Também foram investigados os antecedentes gestacionais, pessoais e familiais de cada paciente, que foi fotografado em vista frontal e lateral.

As alterações físicas e os desvios do padrão de normalidade foram considerados de acordo com os critérios contidos em Jones, 1998 (8). Foram considerados percentis

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

menores que 2% e maiores que 98% como desviantes. Não foram incluídos pacientes com diagnóstico de síndromes genéticas ou ambientais, na análise física, em função das manifestações clínicas esperadas nestes casos.

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi realizada a comparação das proporções encontradas no grupo controle com as respectivas proporções esperadas provenientes do grupo de TID. Foi utilizado o teste para comparação de uma proporção com valor fixo (esperado = grupo de TID), o teste de Fisher, para comparação de duas proporções, o teste não paramétrico de Krush-Wallis para comparação de medidas e o qui-quadrado para independência e tabelas cruzadas. Para o teste de Fisher foi utilizado o programa S-Plus para Windows, versão 3.3, e outros testes foram feitos pelo MINITAB para Windows, versão 12.23. Foram considerados significativos os valores de $P<0,05$, ou seja, o nível de significância de 5%.

Resultados

Foram estudados 48 indivíduos com diagnóstico de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, sendo 32 (67%) homens e 16 (33%) mulheres, com idades que variaram de 5 a 33 anos (média =14,7; desvio padrão = 6,8). Entre eles, 37 (77%) apresentaram diagnóstico de autismo, seis (13%) de transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (TID-SOE), três (6%) de síndrome de Asperger e dois (4%) de síndrome de Rett. Um (2%) era de etnia asiática, três (6%) de etnia negra e 44 (92%) eram caucasóides.

Em 54% (26) dos pacientes do grupo de TID foi observado peso atual abaixo da média, com 27% (13) dos casos situando-se abaixo do percentil 2 em relação à idade. A altura também mostrou 73% (35) de pacientes abaixo da média, com 27% (13) apresentando $P<2\%$. Estas diferenças foram significativamente menores do que as do grupo

controle, que apresentou apenas 6% (3) dos casos com P<2% em relação ao peso e 8% (4) com P<2% para estatura (p=0,0023 e p=0,003, respectivamente).

Quanto ao perímetro cefálico (PC), 29% (14) dos indivíduos do grupo de TID estavam abaixo da média, com 12,5% (6) dos casos com microcefalia (P<2%), e 62% (30) com PC acima da média, com 29% (14) dos casos apresentando macrocefalia (P>98%). No grupo controle, 19% (9) dos indivíduos apresentaram PC abaixo da média, mas nenhum caso apresentou microcefalia. Ainda neste grupo, 70% (34) tinham PC acima da média, com 20% (10) dos casos com macrocefalia. Embora as freqüências de crianças com macro e microcefalia no grupo de TID tenham sido maiores, elas não diferiram estatisticamente das do grupo controle.

A medida da distância intercantal interna (DII) mostrou hipertelorismo ocular (P>98%) em 29% (14) dos casos do grupo de TID e em 6% dos do grupo controle e estas diferiram estatisticamente (P=0,0023).

Entre os pacientes do grupo de TID, 69% (33) e 60% (29), respectivamente, mostraram mãos e pés pequenos, sendo que 27% (13) dos pacientes mostraram percentis menores que 2% para o tamanho das mãos e 29% (14) deles para o tamanho dos pés. Estas freqüências diferiram estatisticamente daquelas do grupo controle (P=0,0014 e P=0,0023, respectivamente). A Tabela 1 apresenta os percentis obtidos das medidas dos pacientes do Grupo de TID.

Portanto, a análise destas medidas revelou que os pacientes portadores de TID foram significativamente menos pesados, mais baixos, com mãos e pés menores e com hipertelorismo ocular.

A Tabela 2 mostra as freqüências de pacientes com alterações, por região do corpo, nos dois grupos estudados. A análise de alterações físicas também revelou diferenças

estatisticamente significantes quanto às freqüências de indivíduos com alterações de crânio, orelhas, olhos, nariz, maxilar, pele e genitais, que foram mais freqüentes no grupo de TID. Não houve diferença significante entre os dois grupos quanto a outras regiões do corpo avaliadas (tórax, abdômen, membros superiores e inferiores).

Entre as alterações encontradas no grupo de TID, as mais frequentemente observadas no crânio foram face alongada (23%) e implantação baixa dos cabelos na nuca (15%). As alterações de orelhas mais observadas foram orelhas rotadas para trás (33%), grandes (17%), displásicas (19%) e de implantação baixa (6%). As alterações mais frequentemente observadas no olho e região ocular foram sinofre (20%), sombrancelhas hirsutas (16%), epicanto (15%), fissuras palpebrais oblíqua para baixo (15%), fissuras palpebrais estreitas (10%), ptose palpebral (4%), nistagmo (4%) e microftalmia (4%). Alterações mais frequentes no nariz e região nasal foram narinas antivertidas (21%), columela proeminente (19%) e nariz pequeno (17%). Filtrum naso labial longo foi observado em 10% dos casos. Prognatia e macrognatia ocorreram em 27% e 8% dos casos, respectivamente. Macrogenitalismo e hérnia umbilical tiveram uma freqüência de 6%, hipogenitalismo de 4% e criptorquidia de 2%. Alterações mais frequentes encontradas na pele foram hirsurtismo generalizado e nevos pigmentados (10%).

Discussão

O estudo morfológico é um instrumento poderoso para investigação de alterações no desenvolvimento estrutural durante a embriogênese. As malformações físicas menores (MFM) são o primeiro indicador de uma desordem cromossômica, uma síndrome gênica contígua, uma desordem gênica simples ou uma ação teratogênica durante o período de embriogênese (9).

Estudos realizados em indivíduos com autismo tentaram correlacionar a presença dessas malformações com complicações obstétricas e idade materna, mas não encontraram uma relação positiva. Entretanto, as influências genéticas e ambientais no primeiro trimestre de gravidez devem ser consideradas como causas dessas malformações(10).

Fombonne *et al.* (1999) (11), encontraram uma frequência significativamente superior de macrocefalia e de microcefalia em pacientes com diagnóstico de autismo. Enquanto a microcefalia foi significativamente associada com a presença de afecções médicas e a macrocefalia não estava associada a qualquer condição, nem mesmo à presença de epilepsia ou à severidade do quadro autístico. Filder *et al.*, (2000) (12) e Bolton et al., (2001) (13) sugeriram que a macrocefalia pode ser um fator de risco familial na patogênese do autismo.

As malformações menores referidas em pacientes TID na literatura, principalmente de olhos e orelhas, sugerem que alterações possivelmente envolvidas com a formação do tubo neural, nos primeiros meses da gestação também poderiam causar, ou contribuir para o aparecimento destas desordens. Por exemplo, orelhas rotadas para trás tem sido a característica mais frequentemente relacionada ao autismo. Baixo peso e estatura, pés e mãos pequenos também têm sido considerados como muito frequentes (7).

Os resultados do presente estudo também evidenciaram alterações de crânio e face como as mais frequentes nos pacientes com TID, reforçando a hipótese de alterações envolvidas com a formação do tubo neural. As frequências elevadas de baixo peso e estatura e de pés e mãos pequenos, reforçam as sugestões de um atraso global do desenvolvimento nestas desordens.

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento correspondem a um quadro de extrema complexidade que exige que abordagens multidisciplinares sejam efetivadas

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

visando não somente a questão educacional e da socialização, mas principalmente a questão médica e a tentativa de estabelecer etiologias e quadros clínicos bem definidos, passíveis de prognósticos precisos e abordagens terapêuticas eficazes. Com a maior acurácia das pesquisas clínicas, grande número de subsíndromes ligadas ao complexo "autismo" devem ser identificadas nos próximos anos, de forma que os conhecimentos sobre a área aumentem de modo significativo em um futuro próximo.

Os resultados deste trabalho foram compatíveis com os dados da literatura e demonstraram uma freqüência aumentada de malformações físicas menores, principalmente de crânio e face, nos pacientes com transtornos invasivos do desenvolvimento. Sugerem que a hipótese de malformações físicas menores no fenótipo clínico destes indivíduos deve ser amplamente investigada, pois pode levar a marcadores biológicos dos eventos etiológicos relacionados a estes distúrbios.

unesp

Tabela 1. Percentis obtidos à partir das medidas de peso, altura, PC, PT, DII e comprimento da mãos e dos pés dos pacientes do Grupo 1.

CASO	PESO	ALTURA		PT	DII	MÃOS	PÉS
1	<98	25-50	<98	<98	<98	50	75-98
2	<98	25-50	50-98	<98	<98	25-50	75-98
3	70-	>25	50	<98	25-50	25-50	>2
4	<98	25-50	<98	<98	<98	2-25	<98
5	>2	>2	50	25-50	<98	2-25	>2
6	>2	50-75	50-98	25-50	25-50	2-25	50-75
7	<98	>25	<98	<98	25-50	25-50	25-50
8	>2	50	50-98	25-50	75-98	25-50	25-50
9	>2	25-50	50-2	25-50	>2	25-50	50
10	>2	>2	>2	25-50	75-98	>2	>2
11	25-	>2	50-2	75-98	>2	2-25	>2
12	25-	>2	50	25-50	2-25	2-25	>2
13	>2	>2	50-2	25-50	25-50	25-50	2-25
14	50-	25-50	50-98	<98	<98	>2	2-25
15	50	50-75	<98	25-50	75-98	25-50	2-25
16	<98	>2	50-98	<98	<98	25-50	2-25
17	25-	>25	50-98	<98	25-50	50-75	50-75
18	75-	50-75	<98	>2	75-98	<98	<98
19	>2	>25	50-98	25-50	75-98	25-50	25-50
20	>2	>25	>2	2-25	2-25	>2	2-25
21	<98	50-75	<98	<98	<98	<98	<98
22	25-	25-50	50-98	75-98	75-98	<98	<98
23	>2	>2	>2	25-50	50	>2	>2
24	25-	25-50	<98	75-98	50	>2	>2
25	50-	25-50	<98	2-25	<98	>2	>2
26	<98	75-90	<98	<98	75-98	25-50	50-75
27	<98	25-50	<98	<98	50	<98	75-98
28	25-	50-75	<98	50	25-50	75-98	50-75
29	25-	50-75	50-2	50-75	50-75	>2	50-75
30	50-	>2	50-98	<98	<98	2-25	2-25
31	75-	>25	50-2	75-98	50	25-50	2-25
32	2-25	>25	50-2	<98	<98	25-50	25-50
33	2-25	>2	50-98	<98	<98	>2	>2
34	50	25-50	50-98	75-98	<98	50	>2
35	75-	50	<98	<98	50	>2	75-98
36	50-	50	50-75	<98	25-50	<98	75-98
37	2-25	2-25	>2	25-50	50-75	>2	>2
38	50-	50-75	50-98	75-98	75-98	<98	75-98
39	2-25	25-50	50-98	25-50	75-98	50-75	>2
40	2-25	>2	50-98	25-50	75-98	50-75	>2
41	>2	>2	2-50	2-25	50-75	>2	>2
42	75-	50-75	50-98	50-75	75-98	50-75	>2
43	>2	>2	>2	2-25	<50-	>2	2-25
44	>2	2-25	>2	2-25	<98	50	2-75
45	50	25-50	2-50	2-25	50-75	>2	50-75
46	<98	<98	<98	<98	75-98	<98	75-98
47	25-	>2	50	50	50	25-50	75-98
48	25-	25-50	50-98	75-98	<98	2-25	>2

PC= perímetro cefálico; PT= perímetro toráxico; DII= distância intercantal interna

unesp

Tabela 2. Frequências de pacientes quanto à presença de alterações físicas menores em diferentes locais do corpo, nos grupos 1 e 2.

Local	Grupo de TID		Grupo Controle		Estatística
	Nº	%	Nº	%	P
Crânio	34	71	10	21	0,000*
Orelhas	31	64	15	31	0,0005*
Olhos	42	87	26	54	0,0001*
Nariz	31	64	16	33	0,0011*
Boca	20	41	15	31	0,1445
Maxilar	21	44	10	21	0,0818
Pescoço	4	8	0	0	0,2053
Tórax	16	33	14	29	0,3298
Coluna	12	25	51	0	0,3064
Abdomen	10	21	0	0	0,0004*
MMSS	28	58	21	44	0,0764
MMII	18	37	15	31	0,2595
Genitais	10	21	0	0	0,0004*
Musculatura	11	23	2	4	0,0036*
Pele	20	41	2	4	0,0000*

***diferença estatisticamente significativa**

MMSS= membros superiores

MMII= membros inferiores

Referências Bibliográficas

1- GOURION, D. French validation of a minor morphologic anomalies in schizophrenic patientes and their parents. Encephale 2001;27:143-147.

2- MILES, J.H., *et al.* Head circumference is a independent clinical finding associated with autism. Am J Med Genet 2000;95:339-350.

3- MAZZOCO,M.M.M. ; WENDY,R. K.; BAUMGARDNER,T.L.; FREUND, L. S.; REISS, A. L.; Autistic behaviors among girls with fragile X syndrome. J Autism Dev Disord 1997;27:415-435.

4- BAILEY, D.B.Jr., *et al.* Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. J Autism Dev Disord 2001;31:165-167.

5- DONELLY, S.L., *et al.*, Female with autistic disorder and monosomy X (Turner syndrome), parent-of-origin effect of the X chromosome. Am J Med Genet 2000;69:312-316.

6- GHAZIUDDIN, M. Autism in Down's syndrome: a family history study. J Intellect Disabil Res 2000;44:562-566.

7- RODIER,P.M.; BRYSON,S.E.; WELCH,J.P. Minor malformations and phisical measurements in Autism: data from Nova Scotia. Teratology 1997;55:319-325.

8- JONES, K.L. Padrões reconhecíveis de malformações congênitas. Segunda Edição, São Paulo. Editora Manole, 1998.

9- RODIER, P.M.; INGRAM, J.L.; TISDALE, B.; NELSON,S.; ROMANO, J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. J Comparative Neurology 1996;370:247-261.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

10- LINKS, P.S. Minor physical anomalies in childhood autism. Part I. Their relationship to pre-and perinatal complications. J Autism Dev Disord 1980;10:287-292.

11- FOMBONNE, E.; ROGÉ, B.; CLAVERIE, J.; COURTY, S.; FRÉMOLLE, J. Microcephaly and macrocephaly in autism. J Autism Dev Disord 1999;2: 113-119.

12- FIDLER, D.J.; BAILEY, J.N.; SMALLEY, S.L. Macrocephaly in autism and other pervasive developmental disorders. Dev Med Child Neurol 2000;42:737-740.

13- BOLTON, P.F. *et al.* Association between idiopathic infantile macrocephaly and autism spectrum disorders. Lancet 2001;358:726-727.

7. ANALYSIS OF FAMILIAL AGGREGATION OF THE BROAD PHENOTYPES IN RELATIVES OF PATIENTS WITH PERVASIVE DEVELOPMENTAL DISORDERS

Analysis of familial aggregation of the broad phenotypes in relatives of patients with Pervasive Developmental Disorders

Carina Tatiana Giunco[1], Ana Elizabete Silva[1], Simone Secco da Rocha[2], Agnes Cristina Fett Conte[2]

1 - Biology Department – IBILCE – UNESP, São José do Rio Preto, SP – Brazil

2 – Molecular Biology Department – Medical School, São José do Rio Preto - São José do Rio Preto, SP – Brazil

Phenotypes in relatives of Pervasive Developmental Disorders

Key words: Pervasive Developmental Disorders; autism; relatives; phenotypes

Carina Tatiana Giunco
Rua Chede Scaff,279 Vila Itália
São José do Rio Preto- SP
15035-130 - Brasil
genetica@famerp.br
phone: 55 17 235-9181
Fax: 55 (17) 227.8198

Genetics and Molecular Biology, 2004, *submitted.*

Abstract

Pervasive Developmental Disorders are neurodevelopment disorders characterized by early developmental impairments in social reciprocity, communication and play, accompanied by repetitive or restricted interests and behavior. The genetic liability of these diseases appears to be expressed not only as full syndromes but also in milder, identifiably similar characteristics that collectively have been referred to as constituting the broad phenotypes. We report on the increased frequency of lesser variants and psychiatric disorders that were observed in an investigation of first-, second- and third-degree biological relatives of 48 patients with pervasive developmental disorders.

Introduction

Pervasive Developmental Disorders (PDD) are behavioral syndromes defined by the presence of marked social deficits, in particular, in relation to communication abnormalities and stereotyped repetitive behavior, usually exhibited at early ages and continuing throughout life (ICD-10).

The main objective of family history studies is to document familial aggregation of various disorders or traits by showing that these are more common in relatives of individuals affected by the disorder than in the general population. There is little consistent evidence across the various studies that relatives are at a higher risk of other psychiatric disorders (Hollander *et al.*, 2003). Perhaps what is inherited in families of PDD individuals is not necessarily the disease, but milder genetically related forms of the full syndrome. Family investigations and studies with twins have confirmed this observation, showing familial aggregation of social and communication deficits and some repetitive behavior (Lord *et al.*, 2001). Relatives in multiple-incidence autistic families were described as having elevated rates of specific personality traits such as aloofness, rigidity, anxiety, few close friendships, communication deficits and cognitive deficits measured by IQ performance (Piven, 2001).

Hence, relatives with a genetic liability of autism may also be at increased risk of other psychiatric disorders, either because of genetic influences upon brain development and function, or as a consequence of behavioral difficulties (Bailey *et al.*, 1998).

This expressiveness can be investigated in family studies to determine if the disorders are associated with characteristics of relatives.

In this paper we report on the frequency of lesser variants and psychiatric disorders in first-, second- and third-degree biological relatives of Brazilian PDD carriers.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Method

After obtaining informed consent, we studied 48 families with PDD-affected individuals selected from specialized schools and clinics (PDD group). The patients were diagnosed according to DSM-IV and ICD-10 criteria. All the cases were discussed by a multidisciplinary group of professionals formed of psychiatrists, psychologists and geneticists specialized in PDD.

Among the 48 probands with PDD diagnoses, 32 (67%) were male and 16 (33%) were female. The ages ranged from 5 to 33 years old (mean = 14.7 ± 6.8). Among them, 37 (77%) had been diagnosed as with autism, 6 (13%) had Pervasive Developmental Disorders non-specific, 3 (6%) had Asperger's syndrome and 2 (4%) had Rett's syndrome.

Psychiatric disorders (PD) in biological first-, second- and third-degree relatives of PDD probands and controls were considered to exist if there were psychiatric disorders that matched the ICD-10 criteria and that were confirmed and accompanied by a psychiatrist. Non-specific psychiatric disorders (NSPD) were considered in cases where relatives had been hospitalized in psychiatric institutions. Isolated symptoms of psychiatric disorders such as excessive nervousness, a tendency of isolation or excessive shyness, anxiety and lack of communication, without any defined psychiatric diagnoses, were considered specific personality characteristics (SPC). Only disorders or symptoms occurring before the birth of proband were considered.

A control group was formed of 48 families of apparently normal individuals matched in relation to gender, age and socioeconomic level compared to the PDD patients.

Statistical analyses of the results were used to compare the percentages found in the control and PDD groups. The Fisher Test (using S-Plus v.3.3 software for Windows) was used to compare fixed values between groups (expected = PDD group) and the Qui-square

test was used to show cross-table independence. P-values greater than 0.05 were considered significant.

Results

Family histories of psychiatric disorders (PD) were observed in 28 (62%) family members of the PDD group and in 19 (39%) family members of the control group giving a statistically significant difference (P=0.0065).

Non-specific psychiatric disorders (NSPD) and specific personality characteristics (SPC) were observed at rates of 25% and 29%, in PDD group family members and at 10% and 6% in the control group families, respectively. These data were also significant (P=0.0160 and P=0.0005). Figure 1.

Among the psychiatric disorders (PD), in the PDD group alcoholism (47%), depression (51%), temper instability (4%) and bipolar disorder (2%) were observed. Among the non-specific psychiatric disorders (NSPD) of the same group, 25% of the individuals were hospitalized in psychiatric institutions on at least two occasions and among the specific personality characteristics (SPC), excessive nervousness (15%), isolation tendency (7%) and excessive shyness (7%) were observed. (Figure I)

Discussion

There are many unanswered questions about phenotypes in relatives of PDD carriers, but these now concern phenotypic definitions and underlying mechanisms rather than whether there is a phenomenon to be explained. The findings highlight the perspicacity of Kanner (1943), but also suggest that the behavioral phenotype probably extends more widely than this author supposed.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Although the majority of published studies have been performed in families with autism, it is important to investigate families of other PDD carriers. This is not only relevant for etiological heterogeneity, even with Rett's Syndrome, but especially owing to the difficulty of establishing a conclusive diagnosis in each of the pathologies, given the subtleties and similarities of their symptoms.

We found higher frequencies in the three investigated categories with the majority of our families having individuals with autism. The first diagnostic criterion of autism is an inability to form normal social relationships and parents of autistic children are often socially reticent, have few friends and avoid social gatherings (Piven *et al.*, 1994). The second criterion is the absence or abnormal development of language, particularly as used to communicate with others (pragmatic language) and parents frequently have pragmatic abnormalities (Landa *et al.*, 1992). The third criterion for autism is a marked resistance to any change, as shown by rigid and repetitive behavior and a narrow range of interests. Parents often describe themselves as inflexible in their habits, preferences, and beliefs (Piven *et al.*, 1997). Significant social difficulties affect a significant number of first-degree relatives of autistic individuals, whereas a large proportion show apparently related personality traits (Happe, *et al.*, 2001)

The relationship between different aspects of the behavioral phenotype and of the underlying genetic liability is currently unknown. Pickles *et al.* (1995) could not find evidence that individual genes coded discrete aspects of the broader phenotype; rather the data pointed towards epistatic interactions between multiple loci contributing to a single latent trait. Nevertheless the approach demonstrates this additional power that identification of milder phenotypes can bring to genetic analysis. Moreover, the suggestion that some relatives show traits that can be conceptualized as extremes of normal personality limits

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

(Landa *et al.*, 1992) opens up the possibility of identifying the phenotype for Quantitative Trait Loci (QTL) analysis.

That is a necessary step if information about milder phenotypes is to be used in molecular genetic studies (Pisula, 2003).

In the present paper, the frequencies of psychiatric disorders, non-specific psychiatric disorders and specific personality characteristics among relatives of patients with PDD were significantly greater than in the control group. These results corroborate with others previously described suggesting a variable expressiveness and genetic anticipation in PDD (Bradford *et al.*, 2001, Piven, 2001).

Several papers proved that lesser variants occur more frequently in siblings, parents and other relatives of the patients. Although there is evidence that these variants mean a variability of the PDD genotypic expression, there is also a correlation with cognitive losses and other psychiatric disorders (Szatmari *et al.*, 2000, Lord *et al.*, 2001).

These findings of familial aggregation of lesser variants show that PDD genes have variable susceptibility, from individual variants to severe symptoms, demonstrating that the environment is important and these diseases are genetically heterogeneous (Szatmari *et al.*, 2000). The genetic heterogeneity refers to a possibility that several independent genes act in the etiology of the PDD.

In fact, phenotypic variability probably is a consequence of more than one biologic mechanism and the inclusion of lesser variants in autistic phenotypes can help to reduce the false-negative rate, however, it can also, inevitably, increase the false-positive rate or phenocopies (Bailey *et al.*, 1998). Thus, studies that define the phenotype and estimate the risk rates are very important. Whether all milder phenotypes appear as early in the evolution of PDD is unclear, but the longitudinal studies of milder variants provide

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

opportunities to investigate development changes, and the role of putative precursors in cognitive development.

Studies with a higher number of families will be needed to confirm these findings, but the present study demonstrates that milder variants can be a useful starting point for predictions about PDD. This is an important aspect to consider during the genetic counseling to the families.

References

Bailey, A., *et al.* (1998) Autism: the phenotype in relatives. J Autism Dev Disord 28:369-392.

Bradford,Y., *et al.* (2001) Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. Am J Med Genet 105:539-547.

Happe F.; Briskman J.; Frith U. (2001) Exploring the cognitive phenotype of autism: weak "central coherence" in parents and siblings of children with autism: I. Experimental tests. J Child Psychol Pyschiat 42:299-307.

Hollander E., *et al.* (2003) Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. Psychiatr Res 227:11-16.

Kanner L. (1943) Autistic disturbances of affective contact. Nerv Child 2:217-250.

Landa, R. *et al.* (1992) Social language use in parents of autistic individuals. Psychol Med 22:245-254.

Lord,C., Leventhal, B.L., Cook, E. (2001) Quantifying the phenotype in autism spectrum disorders. Am J Med Genet 105:36-38.

Pickles, A., *et al.* (1995) Latent-class analysis of recurrence risk for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. Am J Med Genet 57:717-726.

Pisula E. (2003) Parents of children with autism: recent research findings. Psychiatr Pol 36:95-108.

Piven, J. (2001) The broad autism phenotype: a complementary strategy for molecular genetic studies of autism, Am J Psychiatr 105:34-35.

Piven, J., *et al.* (1997) Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. Am J Psychiatr 154:185-190.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Piven, J., *et al.* (1994) Personality characteristics of the parents of autistic individuals. Psychol Med 24:783-795.

Szatmari, P., *et al.* (2000) The familial aggregation of the lessser variant in biological and nonbiological relatives of PDD probands: a family history study. J Chil Psychol Psychiatr 41:579-586.

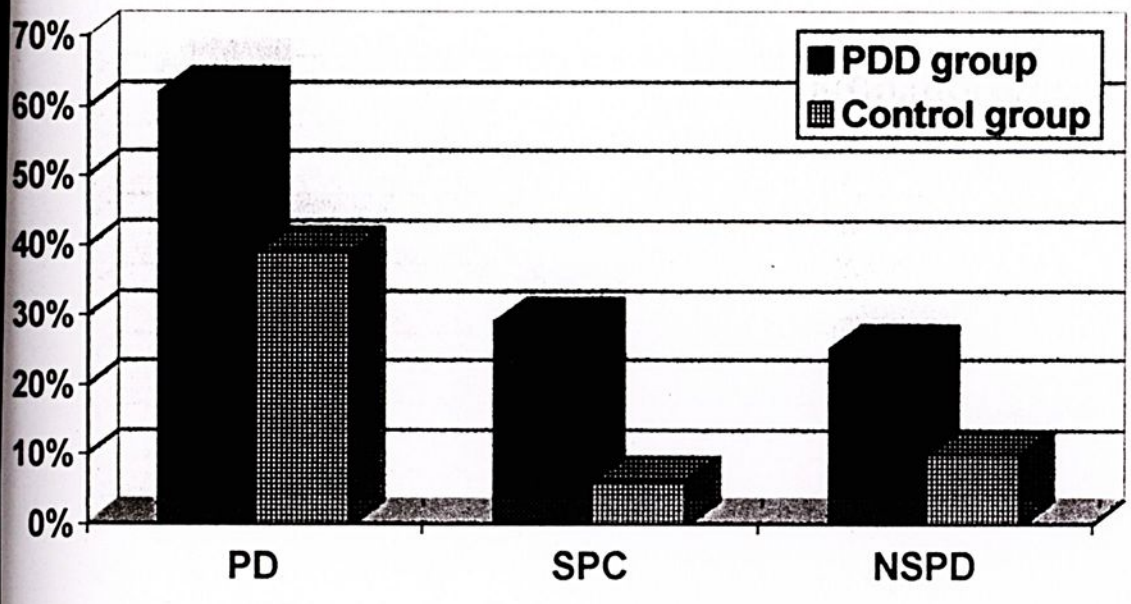


Figure I. Frequency of psychiatric disorders in families of PDD carriers and families of controls. PD = psychiatric disorders; SPC= specific personality characteristics; NSPD = non-specific psychiatric disorders

8. SYNDROME OF COHEN ASSOCIATED WITH AUTISM

Syndrome de Cohen associated with autism

Giunco[1] C T, Moretti-Ferreira[2] D., Silva[1] A. E., Fett-Conte[3] A. C.

1- Department of Biology - IBILCE – UNESP - São Jose do Rio Preto - São Paulo - Brazil

2 – Department of Genetics- UNESP - Bauru - São Paulo – Brazil

3 - Department of Molecular Biology - Medical School de São Jose do Rio Preto – São Paulo – Brazil

Author postal adress:

Giunco, C. T.

Rua Chede Scaff, 279 Vila Itália

15035-130 - São José do Rio Preto- SP

Brazil

genetica@famerp.br

phone: 55 17 235-9181

fax: 55 17 227-8198

Genetic Counseling, 2004, *submitted.*

Summary

This work is the first to describe Cohen Syndrome associated with autism. This association can also identify subgroups for more accurate molecular studies in this field.

Key Words: autism, Cohen, pervasive developmental disorders.

Cohen Syndrome Associated With Autism

Microsoft version 2000

In this paper we relate the first case of an association of Cohen syndrome with autism in a 29-year-old female patient diagnosed by a multidisciplinary team using the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 1994).

Autism is a psychiatric disorder characterized by early development of impairments in social reciprocity, communication, play and adherence to routines and stereotyped behavior. The etiology of this type of disorder is not totally clear, but several studies have shown a strong genetic involvement (Havlovicova, *et al.*, 2002). The importance of genetic factors was recognized because of the frequent association with well-known hereditary diseases and with varying chromosomal aberrations, seen in the high prevalence in monozygotic twins and by the frequent occurrence of symptoms of autism in distant relatives. All of these findings show that the autistic phenotype is a result of an unfavorable combination of genes and the environment (Sedlacek, et al., 2002). The association of autism with other genetic diseases such as the Fragile X syndrome and tuberous sclerosis has frequently been described, but the etiologic relationship between them remains unknown (Bailey, *et al.*, 2001; Donelly, *et al.*, 2000; Weber, *et al.*, 2000).

This 29-year-old female patient, a second child of non-consanguineous parents, is a sporadic case. She was born at full term by normal delivery, with a weight of 3.5 kg and a height of 48 cm. At two years of age she presented with neuropsychomotor development damage, aggressive behavior and other clinical symptoms and was diagnosed as having autism (DSM-IV). Since then she has been attending an autistic school in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. The physical examination at 29 years of age, when Cohen syndrome was diagnosed, revealed short stature, truncal obesity (that had started developing in mid-childhood - 97th percentile), macrocephaly (98th percentile), sparse hair, a low hair line, down slanting palpebral fissures, hypertelorism (inner canthal distance of 4

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

cm) micrognathia, prominent nasal bridge, open mouth appearance, prominent upper central incisors, maxillary hypoplasia, lordosis, kyphosis, narrow hands (25th percentile), cubitus valgus and big feet (Figure 1). She also suffered mental retardation, hypotonia, seizures and psychomotor retardation. She has a first-degree cousin with mental retardation. Her karyotype is normal (46,XX).

Cohen syndrome is a rare, recessive, connective-tissue disorder, with the genetic abnormality linked to chromosome 8q22. Cases of dominant inheritance have also been described, presenting a possible genetic heterogeneity (Sanvito, 1997). The characteristics include mental retardation, truncal obesity, prominent incisors, and tapering digits (Cohen syndrome, MIM 216550).

A preliminary study by Howlin (2001), suggested diagnosis of autism in a small number of Cohen syndrome individuals, however, half of the studied individuals (n=19) showed speaking and language damage/loss and stereotyped behavior, but they did not exhibit other autism characteristics of the DSM-IV/ICD-10 criteria. Thus this work is the first to describe Cohen Syndrome associated with autism.

This association can implicate candidate genes in the 8q22 region with manifestations of the autistic disorder and the need for future research of a wider range of genetic syndromes associated with autism, thus helping in a better comprehension of its heterogeneity. This association can also identify subgroups for more accurate molecular studies in this field.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Figure 1. Pacient frontal and lateral view.



References

1 - BAILEY, D. B. Jr., *et al.* Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. **J. Autism Dev. Disord.**, v.31(2), p. 165-167, 2001.

2 - DONELLY, S. L., *et al.*, Female with autistic disorder and monosomy X (Turner syndrome), parent-of-origin effect of the X chromosome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 69(3), p. 312-316, 2000.

3 - HAVLOVICOVA,M. *et al.*, Genetic study of 20 patients with autism disorders. **Cas. Lek. Cesk.**, v. 141(12), p. 381-387, 2002.

4 - HOWLIN P. Autistic features in Cohen syndrome: a preliminary report. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 43 (10), p. 692-696, 2001.

5 - SANVITO, L.W. Síndromes Neurológicas. São Paulo. Editora Atheneu, 2nd edition, 1997.

6 - SEDLACEKZ, HAVLOVICOVA M, HRDLICKA M. Genetics of autism. **Cas. Lek. Cesk.**, v. 141(12), p. 376-380, 2002.

7 - WEBER, A.M., *et al.* Autism and the cerebellum: evidence from tuberous sclerosis. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 30(6), p. 511-517, 2000.

9. MOMO SYNDROME ASSOCIATED WITH AUTISM: A CASE REPORT

MOMO Syndrome Associated With Autism: a case report

Giunco[1] C. T., Moretti-Ferreira[2] D., Silva[1] A. E., Fett-Conte[3] A. C.

1- Department of Biology - IBILCE – UNESP - São José do Rio Preto - São Paulo - Brazil

2 – Department of Genetics - UNESP - Bauru - São Paulo – Brazil

3 - Department of Molecular Biology - Medical School de São José do Rio Preto – São Paulo – Brazil

Author postal adress:

Giunco, C. T.

Rua Chede Scaff, 279 Vila Itália

15035-130 - São José do Rio Preto- SP

Brazil

genetica@famerp.br

phone: 55 17 235-9181

fax: 55 17 227-8198

Genetic Counseling, 2004, *submitted.*

Summary

This is case report of comorbidity of MOMO syndrome with autism. Studies that identify associations with this and other genetic and environmental syndromes can offer biological indicators of related events in autism and are important in the definition of subgroups for further molecular research.

Key Words: autism, MOMO, pervasive developmental disorders.

MOMO Syndrome Associated With Autism

Microsoft version 2000

MOMO syndrome has this acronym due to its clinical findings: *Macrosomia, Obesity, Macrocephaly and Ocular* abnormalities. It was first described in 1993 by Moretti-Ferreira *et al.* in two unrelated patients. It is a syndrome without defined etiology and it has never been described in association with autism. The inheritance pattern suggests that it is dominant autosomal.

The two cases that were described refer to behavior disorders and mental retardation. A possible third case was described in 2000 by Zannolli *et al.* in a patient with mild mental retardation.

Autism is an emotional and cognitive developmental disorder that is characterized by impaired development in communication, social interaction and behavior. It has been described in association with other behavioral syndromes, such as the Fragile X syndrome and tuberous sclerosis (Weber, *et al.*, 2000; Bailey, *et al.*, 2001). However, the etiologic links within these associations have not yet been elucidated and many questions about these comorbidities remain unanswered.

Our patient (Figure 1) is a sporadic example from healthy non-sanguineous parents. He is the oldest child of a family with other normal children and was born with a weight of 3.9 kg and a height of 50 cm. Gestation was uneventful and delivery was at full term by cesarean section.

He has presented with epileptic crises since 11 months old and suffers from mental retardation. The diagnosis of autism was made when he was two years old and today he still presents with all the DSM/ICD-10 characteristics of the classical disease.

By the age of 29, during an examination, MOMO syndrome was detected. The patient was suffering from severe obesity, macrosomia, macrocephaly (98th percentile), short neck, downward slanting palpebral fissures, microphthalmy, convergent strabismus,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ocular hypertelorism, large nose with broad nasal root, macroglossia, high palate, large hands and feet (98th percentile) and global developmental delay.

An electroencephalogram at 29 years of age showed diffuse disorganization of the brain activity. Routine studies of hormones and the heart were normal.

The karyotype was normal (46,XY), molecular cytogenetics (FISH) for the regions 7q31-q33 and 15q11-q13 and molecular analysis of FMR-1-gene did not demonstrate alterations.

This finding suggests the hypothesis that there is comorbidity of MOMO syndrome with autism. Studies that identify associations with this and other genetic and environmental syndromes can offer biological indicators of related events in autism and are important in the definition of subgroups for further molecular research.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Figure 1. Patient carrier autism and MOMO syndrome.



References

1 - BAILEY, D. B. Jr., *et al.* Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. **J. Autism Dev. Disord.**, v.31(2), p. 165-167, 2001.

2 - MORETTI-FERREIRA, D. *et al.,* Macrosomia, obesity, macrocephaly and ocular abnormalities (MOMO syndrome) in two unrelated patients: delineation of a newly recognized overgrowth syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 46(5), p. 555-558, 1993.

3 - ZANNOLLI R., *et al.*, MOMO syndrome: a possible third case. **Clin. Dysmorphol.**, v. 9(4), p. 281-281, 2000.

4 - WEBER, A.M., *et al.* Autism and the cerebellum: evidence from tuberous sclerosis. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 30(6), p. 511-517, 2000.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM NEOPLASIAS HUMANAS E LESÕES BENIGNAS PRÉ-CANCEROSAS

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se observado um grande progresso no entendimento da base genética do câncer, que foi acompanhado concomitantemente, pela disponibilização de metodologias e ferramentas que possibilitaram a triagem e a identificação de alterações genéticas associadas aos tumores malignos e às lesões pré-malignas. Essas metodologias, iniciando-se com a cariotipagem convencional, avançando com as técnicas de citogenética molecular (FISH, SKY e CGH), biologia molecular e, mais recentemente, com o advento da genômica e proteômica, têm evidenciado um arsenal de alterações genéticas, seqüências genômicas e dados de perfil molecular, que ilustram a complexidade das malignidades humanas (BAAK et al., 2003; BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003).

O desenvolvimento do câncer é dirigido pelo acúmulo de alterações genômicas, genéticas e epigenéticas, que é responsável pela iniciação e progressão tumoral. Em uma célula tumoral, dezenas de genes diferentes podem estar alterados estruturalmente ou em número de cópias, sendo sugerido que de quatro a sete mutações em genes específicos são necessárias para o desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos (SARASIN, 2003). Os tipos de aberrações consistem em mutações em seqüências codificadoras ou regulatórias, mudanças na ploidia, pequenas alterações no número de cópias do genoma, como ganho ou perda de uma cópia única do genoma, amplificação gênica, rearranjos estruturais, deleções em homozigose, perda de heterozigosidade (LOH), modificações epigenéticas e interação proteína-proteína (BAAK, et al. 2003; BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003).

No modelo clássico de desenvolvimento de tumor multipasso é assumido que cada evento importante, independente de ser uma mudança de pequena escala, como uma mutação em ponto, ou de grande escala como uma aberração cromossômica, confere uma vantagem seletiva clonal para a célula, levando, assim, à malignidade.

Em muitos tumores sólidos é conhecida a ocorrência de lesões precursoras, que apresentam proliferação celular aumentada combinada com diferenciação anormal, mas, ainda, dentro dos limites do tecido original. Tal fato tem confirmado esse modelo de múltiplas etapas do câncer, a partir de uma seqüência progressiva do tecido normal, por meio de uma série de estágios intermediários até o câncer e, finalmente, as metástases. Um dos modelos genéticos clássicos é o da progressão tumoral do câncer colorretal (FEARON; VOGELSTEIN, 1990) e também do adenocarcinoma gástrico intestinal (TAHARA, 2004).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

As aberrações cromossômicas são comuns em praticamente todos os tumores sólidos em estágio tardio, mas tem sido difícil determinar o significado de aberrações recorrentes específicas ao tumor, a partir da miscelânea de alterações observadas (JALLEPALLI; LENGAUER, 2001; ROWLEY, 2001). As alterações numéricas de regiões cromossômicas específicas, por exemplo, têm sido correlacionadas com a taxa de expressão dos genes localizados nessas regiões. Perdas e ganhos cromossômicos, utilizando-se a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH), podem ser detectados em muitos tumores, e investigações subseqüentes dessas regiões podem revelar os genes envolvidos em tumores específicos (BAAK et al., 2003). Muitas vezes, foi sugerido que tais alterações eram apenas efeito da instabilidade genética devido às mutações gênicas precedentes. Contudo, algumas técnicas, como a própria CGH, têm mostrado a ocorrência de aberrações cromossômicas também em estágios pré-malignos precoces, evidenciando que as alterações cromossômicas não são apenas efeitos secundários da progressão tumoral (BAAK et al., 2003).

Um aspecto importante das células cancerosas é a instabilidade genômica causada por mutações herdadas que monitoram a integridade do genoma ou por mutações que são adquiridas em células somáticas durante o desenvolvimento do tumor. As alterações resultantes podem ocorrer em alguns níveis, por exemplo: em um único nucleotídeo; pequenos segmentos de DNA (microssatélites); genes inteiros, componentes estruturais de cromossomos ou cromossomos inteiros. Portanto, a instabilidade de nucleotídeos, instabilidade de microssatélites ou instabilidade cromossômica, têm sido referidas respectivamente, como NIN, MIN e CIN (LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998).

As conseqüências da instabilidade genômica em câncer são observadas em muitas alterações que ativam ou inativam os vários genes, que regulam o controle do ciclo celular, afetando o comportamento da célula tumoral, ou ainda, em mutações de genes que controlam a fidelidade da replicação ou reparo do DNA e a apoptose (BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003; SARASIN, 2003).

Não podemos deixar de ressaltar também a participação dos polimorfismos genéticos que podem afetar o risco de câncer. Um grande número de estudos de epidemiologia molecular tem relatado associações entre polimorfismos de enzimas de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

metabolização de xenobióticos e enzimas de reparo do DNA e vários tipos de câncer (NORPPA, 2003, THACKER; ZDZIENICKA, 2003). As freqüências genotípicas desses polimorfismos apresentam variações conforme a etnia das populações avaliadas e, apesar do número de estudos realizados, nem sempre é possível estabelecer uma associação entre o polimorfismo investigado e um tipo específico de câncer. Portanto, justifica-se a realização de novas abordagens, com um número maior de genotipagens e o envolvimento de diferentes grupos de pacientes com câncer, pois, assim pode ser evidenciada a participação de genes importantes na carcinogênese.

A primeira pesquisa que desenvolvi com câncer foi em tumores ósseos, devido aos achados citogenéticos anteriores obtidos no nosso laboratório, em lesões ósseas (VAYEGO; De CONTI; VARELLA-GARCIA, 1996). Esse grupo de lesões apresenta uma variedade de subtipos histológicos bastante heterogêneo, mas com dificuldades no diagnóstico diferencial, cuja revisão sobre o assunto encontra-se no **Artigo II.2** (VAYEGO; De CONTI; SILVA, 1998). Assim, tornou-se interessante os estudos da determinação de marcadores genéticos que pudessem auxiliar no diagnóstico e prognóstico dessas lesões.

A pesquisa de mutações no gene *TP53,* pela técnica de PCR/SSCP, permitiu a triagem de cinco amostras com suspeitas de mutações nesse gene, três das quais foram confirmadas após seqüenciamento do DNA. Essas alterações consistiram em uma mutação no códon 147, do éxon 5, em um osteocondroma; uma mutação no códon 248, do éxom 7, em um osteossarcoma, e duas mutações, que não tinham sido descritas na literatura, também no éxon 7, nos códons 248 e 249, em um caso de cisto ósseo solitário. Esses últimos achados estão publicados no **Artigo II.3** (LOURENÇO; SILVA, 2001) e foram interessantes, pois, possibilitaram relacionar a ocorrência de mutações no gene *TP53* com a instabilidade cromossômica da lesão primária, observada no estudo citogenético, realizado anteriormente (VAYEGO; De CONTI; VARELLA-GARCIA, 1996). Esse resultado também auxiliou à esclarecer o comportamento agressivo da lesão e as quatro recidivas no paciente.

Em seguida, iniciaram-se algumas pesquisas utilizando-se a técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), em câncer de bexiga, esôfago e estômago e em algumas

lesões benignas precursoras dessas neoplasias, como o megaesôfago chagásico e as dispepsias gástricas.

O carcinoma de células transicionais (CCT) de bexiga compreende o tipo histológico predominante, e está relacionado à ocorrência de alterações em genes supressores de tumor e oncogenes, como *CDKN2, ARF, RB, TP53, BCL-2, c-ERBB-2, CCND1* e *EGFR,* assim como, às anomalias cromossômicas envolvendo, principalmente, deleções do cromossomo 9. Uma revisão sobre o assunto encontra-se no **Artigo II.4** (DI CÉZAR; OLIVEIRA-FILHO, SILVA, 2004, *in press*). A avaliação de aneuploidias dos cromossomos 7, 9 e 17, pela técnica FISH, em biópsias de CCT da bexiga, de cistites crônicas e de urotélio normal, também provenientes de pacientes com os tumores, evidenciou, principalmente trissomia/tetrassomia dos cromossomos 7 e 17 e monossomia do 9 e, em alguns casos, devido a presença de polissomia desses cromosomos, foi sugerida a ocorrência de poliploidia . De forma relevante, deve-se destacar a ocorrência das mesmas alterações numéricas, ou seja, polissomias dos cromossomos 7, 9 e 17, em uma amostra de urotélio normal proveniente de um dos pacientes com CCT. Os achados citogenéticos também foram associados com a graduação dos tumores e estão publicados no **Artigo II.5** (DI CÉZAR et al., 2002).

Em carcinomas de esôfago, o tipo histológico predominante é o carcinoma de células escamosas (CCE), perfazendo cerca de 85% dessas neoplasias e apresentando fatores etiológicos e alterações genéticas distintos dos adenocarcinomas esofágicos. Enquanto no adenocarcinoma observa-se uma associação com o esôfago de Barret, como uma lesão precursora, no CCE, tal associação é encontrada com a acalásia ou megaesôfago chagásico. Essa lesão aumenta o risco de 3% a 8% de aparecimento de um carcinoma de células escamosas. O papel da acalásia na etiologia do CCE do esôfago, assim como as alterações genéticas características desse tipo de neoplasia, são revisados no **Artigo II.6** (MANOEL; TAJARA; SILVA, 2002).

Na carcinogênese do esôfago já está descrita a participação de diferentes alterações gênicas e cromossômicas, destacando-se algumas regiões que abrigam genes importantes que participam da regulação do ciclo celular como *CCND1/PRAD1* (11q13), *EGFR* (7p11-15), *HGF* (7q21.1), *MST1/CDKN2* (9p21), *RB* (13q14) e *TP53* (17p13). Contudo, são inexistentes estudos genéticos em lesões precursoras como o megaesôfago chagásico.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Portanto, avaliamos pela técnica FISH a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17, a amplificação do oncogene *Ciclina D1- CCND1* (11q13) e a deleção do gene supressor de tumor *TP53* (17p13) em biópsias de megaesôfago chagásico, provenientes de pacientes sem carcinoma, e comparamos com as alterações encontradas em amostras de CCE do esôfago. O trabalho evidenciou resultados inéditos em megaesôfago chagásico, publicados no **Artigo II.7** (MANOEL-CAETANO et al., 2004). Foram descritas, pela primeira vez, aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17 em 60% (12/20) dos casos de megaesôfago e 54,5% (6/11) de deleção do gene *TP53*, mas não foi observada a amplificação do oncogene *CCND1*. Nos CCE foram encontradas freqüências maiores de aneuploidias desses cromossomos (trissomias/tetrassomias), em todos os dez casos analisados, deleção do gene *TP53* em 100% dos casos, e amplificação do oncogene *CCND1*, na forma de *cluster* (agrupamento de genes), em 70% dos CCE. Os achados são relevantes e enfatizam a necessidade de avaliação genética em portadores de megaesôfago chagásico podendo, dessa forma, auxiliar na detecção de alterações que possam estar associadas com o estágio precoce da carcinogênese do esôfago.

Os resultados em megaesôfago também nos impulsionaram para dar prosseguimento aos estudos nessa linha de pesquisa, com a elaboração de um novo projeto, apresentado, resumidamente no **Capítulo III**, em perspectivas futuras.

O câncer gástrico ocupa posição de destaque mundialmente pela sua incidência e taxa de mortalidade. A carcinogênese do estômago ocorre como um processo de múltiplas etapas, iniciando-se com uma gastrite crônica, freqüentemente acompanhada de infecção pela bactéria *H. pylori*, e progredindo para lesões pré-cancerosas com atrofia gástrica, metaplasia, displasia e carcinoma. Esses eventos são característicos do adenocarcinoma do tipo intestinal, mas não do tipo difuso, que apresenta elevada ocorrência familial. Os avanços nas técnicas moleculares resultaram na descoberta de vários eventos genéticos que ocorrem durante o curso da carcinogênese do estômago, envolvendo: ativação de oncogenes, silenciamento de genes supressores de tumor e mutações em genes de reparo, entre outros. Da mesma forma, a Citogenética Molecular tem fornecido informações importantes, com a indicação de diferentes cromossomos e regiões cromossômicas implicadas nos processos de iniciação e progressão tumoral. Esses aspectos e outros fatores genéticos e ambientais estão revisados no **Artigo II.8** (CÉSAR; SILVA; TAJARA, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Relacionados ao câncer gástrico e às lesões gástricas benignas, em associação com a infecção pela bactéria *H. pylori,* foram finalizados três projetos. O primeiro deles avaliou o diagnóstico molecular da *H. pylori* em lesões benignas e adenocarcinoma gástrico, cujos resultados estão descritos no **Artigo II.9** (CÉSAR et al., 2004a, *submitted)* e a ocorrência de aneuploidias, deleção e super expressão do gene *TP53* em lesões benignas como gastrite crônica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, em comparação com adenocarcinoma gástrico. Os resultados advindos deste estudo estão apresentados nos **Artigos II.10** e **II.11** (CÉSAR et al., 2004b, *in press*; CÉSAR et al., 2004c, *submitted).* O projeto seguinte, investigou as frequências dos polimorfismos dos genes *GSTT1, GSTM1* e *CYP2E1* em gastrite crônica e câncer gástrico, cujos resultados estão publicados no **Artigo II.12** (COLOMBO et al., 2004). Enquanto, o terceiro projeto, recém finalizado, investigou a ocorrência de apoptose nas lesões gástricas e adenocarcinomas avaliados no primeiro projeto, e associação desse evento com aneuploidias, deleção e expressão do gene *TP53,* e infecção pela *H. pylori*, cuja revisão do assunto e os resultados estão sendo organizados para publicação, conforme **Artigos II.13** e **II.14** (TARGA; SILVA, 2004, *submitted*, TARGA et al., 2004, em preparação).

Devido à importância e a escassez de estudos genéticos em lesões gástricas benignas, os resultados obtidos foram relevantes, pois, evidenciaram a presença de alterações genéticas em lesões precoces como gastrite crônica e um aumento crescente de alterações, conforme progressão dessas lesões, passando por gastrite atrófica, úlcera gástrica, metaplasia intestinal, até o adenocarcinoma.

Em seqüência, serão apresentados, resumidamente, os resultados dos **Artigos II.9**, **II.10** e **II.11**. Primeiramente, foi evidenciada a eficácia do diagnóstico molecular da *H. pylori*, com a técnica de PCR em comparação ao diagnóstico histológico (coloração Giemsa), auxiliando, assim, o patologista a evitar a subestimativa da infecção.

O estudo citogenético, com a utilização da técnica FISH para avaliação de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 e deleção do gene *TP53,* em lesões gástricas benignas e adenocarcinoma gástrico, ressaltou a presença de aneuploidias, principalmente monossomia e trissomia do 7, como alterações iniciais em gastrite crônica. Em gastrite atrófica destacaram-se as trissomias dos cromossomos 7 e 8; enquanto, em úlcera gástrica e em metaplasia intestinal, destacaram-se, respectivamente, as trissomias dos cromossomos 7

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

e 17 e as trissomias 7, 8, 9 e 17, em comparação com freqüências maiores de trissomias/tetrassomias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 em adenocarcinoma gástrico. A ocorrência dessas aneuploidias estava associada com a infecção pela *H. pylori* na maioria das lesões estudadas. A deleção do gene *TP53* foi observada apenas em metaplasia intestinal e nos adenocarcinomas, mas a expressão aumentada da proteína foi detectada já nas células das lesões precoces, como gastrite crônica e úlcera gástrica. Nesses casos foi sugerido que a imunorreatividade positiva fosse devida à estabilização da proteína selvagem, enquanto em metaplasia intestinal estivesse relacionada com a forma mutada da proteína, pois esse tipo de lesão compartilha alterações genéticas em comum ao adenocarcinoma e, também, havia manifestado deleção do *TP53*.

Considerando-se, também, a participação de fatores ambientais na carcinogênese do estômago, relacionada com a dieta alimentar, o fumo e o álcool, investigamos a associação de polimorfismos em genes envolvidos com a metabolização, como membros da família das glutationas-S-transferases (*GSTT1* e *GSTM1*) e do citocromo P-450 (*CYP2E1*) e o risco de câncer gástrico e gastrite crônica (**Artigo II.12**). Os resultados das investigações sobre a associação desses polimorfismos com o câncer gástrico são conflitantes. Também não havia estudos sobre esses três polimorfismos, neste tipo de câncer, na população brasileira, que é distinta de outras populações, como a oriental, em que há um número maior de investigações. Os resultados não mostraram freqüências diferentes dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulos e do genótipo *c1/c2* do gene *CYP2E1*, entre as amostras de câncer gástrico, gastrite crônica e controles, não evidenciando, portanto, uma relação entre esses polimorfismos com esse tipo de neoplasia na população brasileira. Contudo, foi observado que o cigarro e o genótipo *GSTM1* nulo pode estar associado com uma *odds ratio* aumentada para o câncer gástrico.

O estudo de alguns genes relacionados ao biometabolismo de xenobióticos não pode refletir o processo como um todo, assim, é necessário a investigação de outros polimorfismos, como aqueles em genes que atuam no mecanismo de reparo do DNA. Portanto, utilizando o DNA armazenado do estudo anterior e ampliando as amostras, elaboramos outro projeto, com o intuito de investigar a associação dos polimorfismos para os códons 194 e 399 do gene de reparo de excisão de bases *XRCC1* e do códon 241 do gene de reparo recombinacional *XRCC3*, em câncer gástrico e gastrite crônica. As freqüências

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

alélicas desses polimorfismos, ainda, não estão estimadas na população brasileira, portanto, sendo interessante também esta avaliação a partir dos dados dos indivíduos saudáveis (controles). O referido projeto encontra-se em andamento e está brevemente descrito no **Capítulo III**.

Nestes anos de pesquisa com câncer gástrico foi obtida uma quantidade significante de amostras e, assim, considerando os diversos resultados apresentados, surgiu o interesse em avaliar a ocorrência de apoptose nessas lesões, pois há indicações na literatura, de que a gastrite crônica e a úlcera gástrica, principalmente relacionadas à infecção pela *H. pylori*, apresentam taxas aumentadas de apoptose.

A taxa elevada de apoptose, nessas lesões, seria um evento importante para contrabalancear com a hiperproliferação celular também aumentada em conseqüência da infecção pela *H. pylori*, aumentando, assim, o risco de lesões no DNA e de tumorigênese gástrica, conforme revisão no **Artigo II.13**.

As freqüências de células apoptóticas foram investigadas pelas técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e pela expressão da caspases-3 ativada (CPP32). Essas técnicas mostraram-se eficientes para detecção de células apoptóticas no epitélio gástrico, e evidenciaram índices apoptóticos aumentados em gastrite crônica e gastrite atrófica, em relação à mucosa normal. Essas lesões também apresentaram um número maior de casos TUNEL e CPP32 positivos, o que não foi observado em úlcera gástrica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.

A ocorrência de apoptose não estava associada com infecção pela *H. pylori*, nem com os outros fatores investigados, como aneuploidias e super expressão da proteína p53. Da mesma forma, não foi observada correlação entre os índices apoptóticos obtidos por ambas as técnicas nas amostras de lesões benignas e de adenocarcinoma gástrico avaliadas. Provavelmente, devido a essas técnicas serem específicas para a detecção de determinadas características do processo apoptótico em fases distintas, e ainda, considerando-se que a expressão da caspase-3 ativada precede a fragmentação do DNA, detectada pela técnica TUNEL. Os dados desse estudo estão sendo organizados para publicação conforme **Artigo II.14**.

À medida que finalizamos alguns projetos, conseqüentemente, surgem novos questionamentos sobre outros aspectos interessantes, que carecem de esclarecimentos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Portanto, no **Capítulo III** encontram-se resumidos três projetos que estão em desenvolvimento nesta linha de pesquisa. Além dos dois já comentados no decorrer dessa introdução, o outro visa à investigação das freqüências e associação entre amplificação gênica e aumento de expressão da proteína em tumores de esôfago e estômago, utilizando as técnicas FISH e imuno-histoquímica, respectivamente. Foram selecionados dois oncogenes, *Ciclina D1* (*CCND1*) e *c-ERBB-2* (*HER-2/NEU*), cuja ativação por amplificação ou cujo aumento da expressão protéica, parecem estar associados com a carcinogênese do esôfago e estômago, indicando um prognóstico pior. Contudo, tanto a participação desses oncogenes na tumorigenêse desses tecidos, como a associação entre amplificação gênica e super expressão protéica, ainda não estão completamente esclarecidos, pois, a evidência citogenética de amplificação não indica necessariamente a expressão de todas as cópias do gene envolvido. Assim têm-se observado relatos de tumores com amplificação sem expressão aumentada da proteína, como também o contrário.

Na tentativa de auxiliar nesses esclarecimentos, propôs-se avaliar a expressividade desses genes, relacionando-os com a posição relativa dos domínios interfásicos (territórios cromossômicos) dos cromossomos correspondentes. Alguns estudos têm indicado que os genes ativos são observados, preferencialmente, na periferia desses territórios, facilitando o processo transcricional e a deposição do RNA recém-sintetizado diretamente no espaço intercromatínico. Essa metodologia poderá evidenciar se os genes *CCND1* e *c-ERBB-2*, quando amplificados ou com expressão elevada, posicionam-se em locais específicos dos núcleos interfásicos quando ativos.

As pesquisas científicas desenvolvidas, relatadas no presente texto, evidenciam um trabalho cooperativo e multidisciplinar que tem permitido, dessa forma, diferentes abordagens nos materiais investigados.

unesp

2. ASPECTOS GENÉTICOS-MOLECULARES DOS TUMORES ÓSSEOS

Aspectos genético-moleculares dos tumores ósseos

SHEILA ADAMI VAYEGO[1], OSVALDO JOSÉ DE CONTI[2], ANA ELIZABETE SILVA[3]

RESUMO

As lesões ósseas primárias compreendem um pequeno grupo, porém com uma variedade de subtipos histológicos que demonstram heterogeneidade e dificuldades no diagnóstico diferencial. Os estudos citogenéticos e moleculares têm contribuído para a elucidação da base genética dessas neoplasias. Em alguns tipos de tumores ósseos são encontradas alterações cromossômicas características envolvendo genes específicos. As translocações compreendem as principais anomalias, promovendo a fusão de genes com conseqüente formação de proteínas quiméricas. Vários exemplos de genes quiméricos foram descritos, como EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/ETV1 em sarcoma de Ewing; FUS/CHOP em lipossarcomas mixóides; SYT/SSX em sarcomas sinoviais; PAX3/FKHR em rabdomiossarcomas; EWS/TEC em condrossarcomas extra-esqueléticos e HMGIC em tumores benignos. Em neoplasias ósseas, também tem sido observada a participação de mutações gênicas e amplificações, principalmente nos genes supressores de tumor RB1 e TP53 e oncogene MDM2, respectivamente, promovendo o descontrole da proliferação celular e o desenvolvimento de neoplasias.

Unitermos – Tumores ósseos; base genética; rearranjos cromossômicos; genes supressores de tumor; oncogene; ciclo celular

SUMMARY

Molecular and genetic aspects of bone tumors

Primary bone lesions comprise a small group, however with a vast number of histological subtypes which show heterogeneity and difficulties in the differential diagnosis. Cytogenetic and molecular genetic studies have contributed to the elucidation of the genetic basis of these neoplasms. In some types of bone tumors, chromosome abnormalities involving specific genes are observed. Among them, translocations comprise the major mechanism and lead to the juxtaposition of genes and the consequent formation of a fusion gene that encodes chimaeric proteins. Many examples of fusion genes have been reported, such as EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/ETV1 in Ewing's sarcoma; FUS/CHOP in myxoid liposarcoma; SYT/SSX in synovial sarcoma; PAX3/FKHR in rhabdomyosarcoma; EWS/TEC in extraskeletal chondrosarcoma, and HMGIC in benign tumors. The participation of gene mutations and amplifications have also been observed in bone neoplasms. These occur mostly in tumor suppressor genes RB1 and TP53 and oncogene MDM2, respectively. These events may play an important role in the deregulation of cell proliferation and tumorigenesis.

Key words *– Bone tumors; genetic basis; chromosomal rearrangements; tumor suppressor genes; oncogene; cell cycle*

INTRODUÇÃO

As lesões ósseas primárias compreendem um pequeno grupo, porém com uma variedade de subtipos histológicos. A identificação desses subtipos permitiu extensa classificação dos tumores ósseos, demonstrando heterogeneidade e dificuldade de diagnóstico[21]. Os tumores cartilaginosos são os que mais se enquadram nessa situação, pois lesões cartilaginosas aparentemente benignas comportam-se, algumas vezes, de forma agressiva ou até mesmo maligna, enquanto tumores com aparência maligna podem demonstrar progressão limitada. As características citológicas podem estar presentes somente em uma região microscópica do tumor, podendo resultar em diagnóstico errôneo[4].

1. Doutoranda em Ciênc. Biol.-Genét., Dep. de Biol., Unesp – *Campus* de São José do Rio Preto, SP.
2. Prof. Assist. de Ortop., Fac. de Med. de São José do Rio Preto, Famerp – São José do Rio Preto, SP; Doutorando em Ortop. e Traumatol. da Fac. de Med. de Ribeirão Preto, SP.
3. Profa. Assist. Doutora em Ciênc. Biol.-Genét., Dep. de Biol., Unesp – *Campus* de São José do Rio Preto, SP.

Endereço para correspondência: Ana Elizabete Silva, Rua Cristovão Colombo, 2.265 – 15054-000 – São José do Rio Preto, SP. Tels. (017) 221-2384 – 221-2380, fax (017) 221-2390. E-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br

Atualmente, com o avanço das pesquisas em câncer, as técnicas citogenéticas e moleculares têm possibilitado a identificação de rearranjos cromossômicos complexos, permitindo, assim, o diagnóstico de neoplasias pela implicação de genes específicos e eventualmente a elucidação de mecanismos básicos da tumorigênese[51,62]. Conseqüentemente, a análise de alterações genéticas em tumores primários pode contribuir para o diagnóstico e o prognóstico mais preciso e identificar os que apresentam potencial metastático e que necessitam de terapias mais agressivas.

As células neoplásicas podem apresentar mutações que resultam em instabilidade genética e, a partir de então, desencadeiam o processo de transformação celular. As alterações cromossômicas oriundas desse processo podem ser agrupadas em três categorias amplas, de acordo com o mecanismo pelo qual promovem crescimento maligno: a relocação de seqüências gênicas, sem ganho ou perda de material (translocações, inversões e inserções), que afetam genes próximos aos pontos de quebras e podem resultar na desregulação de genes celulares normais ou na formação de genes oncogênicos quiméricos; a perda ou ganho de material genético (deficiências parciais e totais); e as amplificações (duplicação, trissomia, isocromossomo, *double minutes* e regiões homogeneamente coradas), que causam muitas vezes alterações na dosagem de blocos grandes de genes, tornando difícil a identificação das seqüências de DNA responsáveis pela indução de alterações fenotípicas[40].

Os genes envolvidos no desenvolvimento do câncer segundo seu papel no processo tumorigênico são classificados como oncogenes, genes supressores e genes de reparo do DNA. Os oncogenes existem normalmente em todas as espécies de eucariotos investigadas e estão envolvidos nos sinais bioquímicos inter e intracelulares e no controle da proliferação celular. De acordo com a natureza e localização intracelular, as proteínas codificadas são classificadas em várias categorias, como proteínas quinases (com função de fosforilação de resíduos de tirosina ou treonina/serina), receptores de fatores de crescimento (geralmente uma proteína quinase), proteína G (com capacidade de ligação a GTP e hidrólise), proteínas nucleares (fatores de transcrição) e fatores de crescimento[40].

Em contraste com as mutações que ativam oncogenes, mutações que levam à perda de função de genes supressores também contribuem para o desenvolvimento tumoral. Os genes supressores podem ser definidos como genes cuja perda ou inativação permite que uma célula manifeste um fenótipo

QUADRO 1
Características citogenéticas e moleculares encontradas em tumores músculo-esqueléticos

Tipo	Citogenética	Genética molecular
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12)	EWS/FLI1 (85%) EWS/ERG (5%) EWS/ETV1 (< 5%)
Sarcoma de células claras	+8,t(12;22)(q13;q12)	EWS/ATF1
Tumor desmoplásico	t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1
Sarcoma indiferenciado	t(17;22)(q12;q12)	EWS/ElAF
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)	SYT/SSX
Lipossarcoma mixóide	t(12;16)(q13;p11)	FUS/CHOP
Lipossarcoma pleomórfico	t(12;22)(q13;q12)	EWS/CHOP
Lipossarcoma bem diferenciado	r(12), amplificação de 12q14-15 e 12q21-22	HMGIC, MDM2, CHOP, SAS e CDK4
Rabdomiossarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14) ou t(1;13)(p36;q14)	PAX3/FKHR (70%) PAX7/FKHR (10-20%)
Condrossarcoma mixóide	t(9;22)(q22;q12)	EWS/TEC
Osteossarcoma clássico	Alterações cromossômicas numéricas e estruturais	40% perda de RB, 30% perda de TP53 e 30% amplificação MDM2
Tumores benignos em geral	*t(12;V)(q13;V), *t(6;V)(p21;V)	HMGIC

* V = padrões de translocações variáveis.

de proliferação neoplásica, contribuindo, dessa forma, com os oncogenes no controle da proliferação e diferenciação celular. Mutações nos genes supressores seguem um padrão recessivo de herança mendeliana, enquanto os oncogenes apresentam um padrão dominante[2,9].

Estudos recentes têm demonstrado um papel fundamental de mutações envolvendo uma terceira classe de genes na progressão do câncer, os genes de reparo do DNA. A inativação dos genes de reparo não afeta diretamente o controle do crescimento celular normal; todavia, parece que sua inativação resulta em taxa aumentada de mutações em uma variedade de genes celulares, incluindo oncogenes e genes supressores de tumor[17,62].

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS TUMORES ÓSSEOS

A base genética dos tumores ósseos é muito similar à observada em outros tumores do organismo humano. Em todos os casos, o descontrole da proliferação celular como conseqüência da ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores de tumor representa um papel crucial no processo de transformação maligna[8,62].

Um grande número de regiões cromossômicas envolvidas em aberrações primárias de diferentes tipos de tumores coincide com a localização de oncogenes, sugerindo que tal associação não é casual[44]. Os fenômenos que ativam os oncogenes, como as mutações gênicas e os rearranjos cromossômicos estruturais (principalmente as translocações e as duplicações), são responsáveis por alterações moleculares que dão início à transformação celular. Assim, um dos grandes desafios dos estudos citogenéticos é distinguir, no grande arsenal de aberrações cromossômicas que ocorrem durante a progressão tumoral, aquelas que são realmente relevantes. Os resultados obtidos servem como ponto de partida para investigações em nível molecular, auxiliando na localização de oncogenes e genes supressores de tumor que possam desempenhar função importante no processo multipasso da carcinogênese.

Em alguns tipos de tumores ósseos são encontradas alterações cromossômicas características envolvendo genes distintos. Principalmente em sarcomas, as translocações descritas (específicas de tecidos músculo-esqueléticos) formam proteínas quiméricas resultantes da justaposição de dois genes alterados (quadro 1). Essas proteínas participam na tumorigênese como um ativador transcricional anômalo.

Em cerca de 85% dos sarcomas de Ewing, que ocorrem na forma esquelética e extra-esquelética, tem sido observada

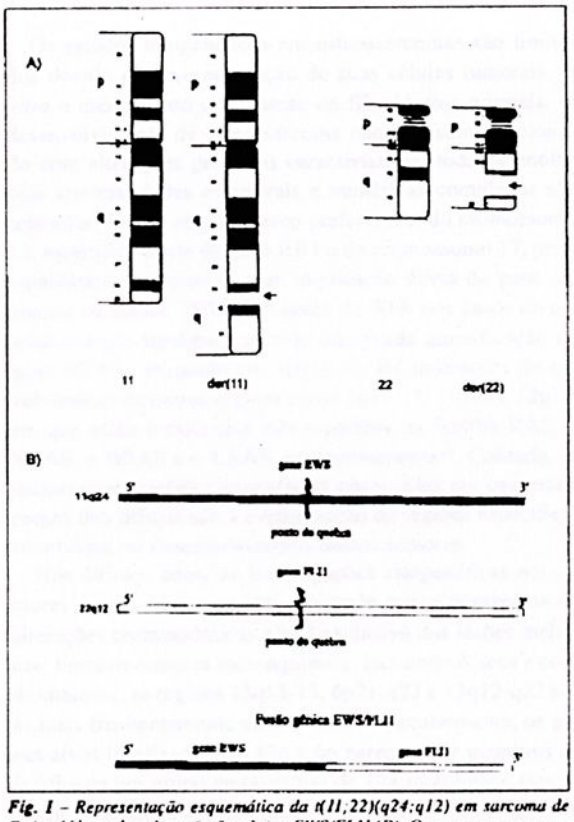


Fig. 1 – Representação esquemática da t(11;22)(q24;q12) em sarcoma de Ewing (A) resultando na fusão gênica EWS/FLI1 (B). Os cromossomos normais estão indicados à esquerda.

uma translocação que envolve os braços longos dos cromossomos 11 e 22, t(11;22)(q24;q12) e 5 a 10% desses tumores apresentam translocações variantes, como t(21;22)(q22;q12) e t(7;22)(p22;q12)[8,27-29,51]. Tais translocações promovem a fusão da região 5' do gene EWS (22q12) com a região 3' de um dos outros genes, localizados nos pontos de quebras envolvidos em cada tipo de translocação, como FLI1 (11q24) (figura 1), ERG (21q22) e ETV1 (7p22). O processo de fusão gênica leva à formação de proteínas quiméricas com domínios de ligação ao DNA que atuam com fatores transcricionais[29].

Nos sarcomas sinoviais, a presença da translocação t(X;18)(p11;q11) em 90% dos casos sugere um papel central no desenvolvimento desses tumores[33]. Essa translocação envolve o gene do sarcoma sinovial (SYT) no cromossomo 18 e dois genes intimamente ligados e relacionados, SSX1 e SSX2 no cromossomo X[9]. A função do gene quimérico ainda não

é conhecida; entretanto, vários domínios SH3 e SH2 foram identificados na proteína syt e podem ser importantes em seu papel como proteína sinalizadora intracelular[13,30,51].

Os lipossarcomas mixóides, tumores de partes moles, caracterizam-se em 90% dos casos pela presença da translocação t(12;16)(q13;p11), com a fusão do gene FUS mapeado no cromossomo 16, de função desconhecida com o gene CHOP em 12q13, que regula negativamente a diferenciação de adipócitos[12,52]. Há indicações de que a fusão gênica FUS/CHOP pode regular genes envolvidos na tumorigênese de lipossarcomas[9]. Dentre os subtipos de lipossarcomas, pleomórficos e bem diferenciados, não tem sido observado um marcador citogenético. Contudo, têm-se observado rearranjos múltiplos e translocações no primeiro tipo e cromossomos em anel r(12) e marcadores gigantes, com amplificação das regiões 12q14-15 e 12q21-22, no segundo tipo[49].

Em rabdomiossarcomas os dois tipos mais comuns são os alveolares e embrionários[8]. O embrionário ainda não apresenta uma alteração genética característica; entretanto, a maioria dos alveolares apresenta a translocação t(2;13)(q35;q14) e, em 10-20% dos casos a translocação variante t(1;13)(p36;q14), que sugere uma relação dessas alterações genéticas com o desenvolvimento desse tipo tumoral[39]. As translocações resultam na fusão do gene FKHR (*forkhead* – desenvolvimento do sistema nervoso), em 13q14 ao gene PAX3 ou PAX7 (*paired-box homeo* – regiões conservadas em genes homeóticos e relacionadas com o desenvolvimento humano) em 2q35 e 1p36, respectivamente. O gene PAX3 apresenta grande interesse, pois codifica um fator de transcrição que ativa genes alvos específicos importantes no desenvolvimento do sistema nervoso humano e principalmente durante a diferenciação das células da musculatura esquelética[8,13,14,62]. Similarmente, FKHR tem sido relacionado com o controle do desenvolvimento embrionário e expressão gênica específica em determinados tecidos em adultos[22]. Portanto, o papel desempenhado por esses genes pode ser relevante no desenvolvimento e freqüência de rabdomiossarcoma, principalmente em crianças.

Em condrossarcomas mixóides extra-esqueléticos observa-se a translocação recorrente, t(9;22)(q22;q12)[57], que envolve o gene EWS e um novo gene denominado TEC (translocado em condrossarcoma mixóide extra-esquelético)[19]. O gene TEC parece ser um membro da subfamília de receptores nucleares, provavelmente atuando no controle da diferenciação e proliferação celular. A fusão ews/tec é o segundo exemplo de conversão oncogênica de um receptor nuclear no processo de tumorigênese humana[8].

Os estudos citogenéticos em osteossarcomas são limitados devido a pobre adaptação de suas células tumorais *in vitro* e crescimento consistente de fibroblastos normais. O desenvolvimento de osteossarcoma não tem sido relacionado com alterações genéticas características; todavia, múltiplas anormalidades estruturais e numéricas complexas são relatadas[5,35]. Há envolvimento preferencial do cromossomo 13, especificamente do gene RB1 e do cromossomo 17, principalmente deficiências, com impiicação direta do gene supressor de tumor TP53. Em cerca de 30% dos casos de osteossarcomas também tem sido observada amplificação do gene MDM2, mapeado em 12q13-14. Há indicações do envolvimento de outras regiões como 1p11-13, 11p15 e 12p13, em que estão localizados três membros da família RAS, o NRAS, o HRAS e o KRAS, respectivamente[6]. Contudo, as inúmeras alterações citogenéticas observadas em osteossarcomas têm dificultado a evidenciação de regiões específicas envolvidas no desenvolvimento desses tumores.

Nos últimos anos, as investigações citogenéticas em tumores ósseos benignos têm mostrado que a ocorrência de alterações cromossômicas não é exclusiva das lesões malignas. Entre os tumores mesenquimais, incluindo ósseos e condromatosos, as regiões 12q13-15, 6p21-q23 e 13q12-q22 são as mais freqüentemente envolvidas. Molecularmente, os genes alvos localizados em 12q e 6p parecem ser membros da família de um grupo de proteínas de alta mobilidade (hmg), hmgic e hmgi(y), respectivamente. Em tumores benignos, o gene HMGIC está alterado em lipomas, leiomiossarcomas uterinos, tumores de glândulas salivares, hamartomas condróides pulmonares[31,54] e tumores condromatosos. Em tumores malignos, foram observadas alterações em fibrossarcomas, lipossarcomas, leiomiossarcomas e histiocitoma fibroso maligno[54].

ALTERAÇÕES DO CICLO CELULAR EM TUMORES ÓSSEOS

Além dos genes quiméricos, estudos moleculares têm demonstrado que outro mecanismo freqüentemente responsável pela tumorigênese em sarcomas ósseos é a perda de função de genes supressores de tumor, principalmente os genes RB1 e TP53[8,25,30]. Em vários tumores ósseos, também tem-se observado a amplificação da região 12q13-14, incluindo os oncogenes CHOP, SAS, MDM2, CDK4 e GLI[33,41].

O gene RB1 foi o supressor de tumor protótipo da hipótese dos dois passos mutacionais formulada por Knudson[36] no desenvolvimento do retinoblastoma. Ele foi mapeado em

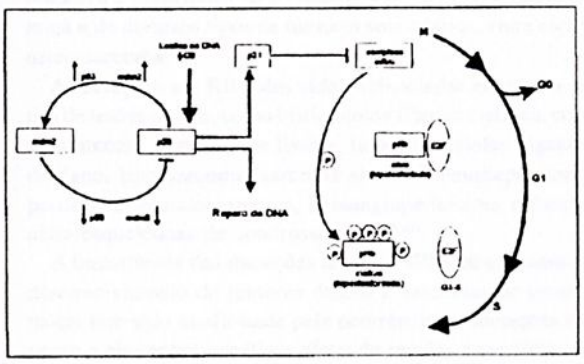


Fig. 2 – Representação esquemática da atuação das proteínas pRb, p53 e mdm2 no controle do ciclo celular. Na fase G1 p53 ativa a p21 que, por sua vez, inibe o complexo cdk/c, deixando a pRb ativa (hipofosforilada). A pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando o ciclo. Para a progressão de G1-S a pRb é fosforilada pelo complexo cdk/c, liberando E2F necessário na ativação de genes responsáveis pela passagem para a fase S. As proteínas p53 e mdm2 fazem parte de um feedback *negativo que ajuda a controlar a atividade antiproliferativa da p53.*

13q14 e codifica uma fosfoproteína nuclear, p110 ou pRb, com papel fundamental na regulação do ciclo celular[24].

A proteína pRb inibe a proliferação celular, reprimindo um conjunto de genes que são controlados por fatores de transcrição (família E2F), com papel de transativação de genes cujos produtos são importantes na progressão da fase G1 para S do ciclo celular (figura 2). Em G1 a proteína pRb na forma hipofosforilada permanece ligada ao complexo E2F até sua fosforilação, convertendo-o em repressor de genes alvos e impedindo a progressão do ciclo celular. A fosforilação da pRb pelo complexo cdk/c libera E2F e permite que ative a transcrição de genes necessários para a transição G1-S[60]. A pRb é mantida no estado hiperfosforilado para a progressão do ciclo celular e não é desfosforilada até que a célula complete a mitose e entre novamente na fase G0 ou G1[55]. Mutações no gene RB1 levando à inativação da proteína pRb podem interferir diretamente no controle do ciclo celular, assim promovendo um aumento da proliferação celular e, conseqüentemente, no processo de tumorigênese.

O gene TP53 foi o segundo a ser relacionado com o desenvolvimento de osteossarcomas, sendo a freqüência de mutações alta (20 a 60%)[43,46,58]. As evidências de tal associação foram decorrentes de estudos em famílias apresentando a síndrome de Li-Fraumeni, cujos pacientes com mutações no gene TP53 na linhagem germinativa exibiam alto risco de neoplasias de mama, cérebro, córtex adrenal, osso, tecidos moles e sangue[34,42,63].

O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, na região 17p13.1 do genoma humano[26]. O produto gênico consiste numa fosfoproteína nuclear com função de ativação transcricional[8,25]. A proteína p53 regula negativamente a proliferação celular e funciona como um gene supressor de tumor, pois está envolvida no controle da progressão do ciclo celular e na preservação da estabilidade genética. Em decorrência do acúmulo de lesões no DNA e perturbações na regulação do ciclo celular, ocorre aumento da proteína p53, induzindo a ativação de genes envolvidos no controle negativo da proliferação celular e de genes do reparo do DNA. A parada em G1 do ciclo celular é, portanto, dependente de p53, através da transativação da p21, inibindo a atividade das quinases dependentes de ciclinas (cdk/c) na fase G1, mantendo o complexo pRb-E2F hipofosforilado e, conseqüentemente, inibindo a entrada na fase S[55].

A produção aumentada de p53 tem três funções importantes: atuar na supressão da proliferação celular, na indução da morte celular programada ou apoptose e na indução de diferenciação celular. Portanto, ela funciona como uma espécie de guardiã molecular da integridade genômica, bloqueando o ciclo celular na fase G1 e permitindo o reparo de DNA. Caso contrário, se a lesão não é reparada, a p53 inicia o processo de apoptose celular e, nas células em que sua função foi perdida, instala-se um estado de instabilidade genética podendo levar a amplificações gênicas, aneuploidias e outras aberrações cromossômicas responsáveis pela progressão do câncer[23].

Em neoplasias ósseas outro gene que está amplificado em uma variedade de sarcomas humanos é o oncogene celular MDM2 *(mouse double minute 2)*, localizado por Oliner *et al.*[47] na espécie humana no cromossomo 12, na região 12q13-14. A proteína mdm2 é capaz de ligar-se à p53 através de seu domínio de ativação transcricional, bloqueando sua função de regulação no processo de progressão do ciclo celular e impedindo seu efeito antiproliferativo[7,45]. Ela inativa a função de transcrição de p53; portanto, a expressão aumentada do gene MDM2, em sarcomas, inativa a transcrição da p53 normal e permite o crescimento de células tumorais expressando níveis elevados da p53 normal[18]. Amplificação de MDM2 pode, portanto, ser um processo alternativo para a inativação da p53 no processo tumorigênico.

Alterações nos genes RB1, TP53 e MDM2 têm sido relacionadas com o desenvolvimento de osteossarcomas e outros sarcomas. A associação entre perda de função de RB1 e osteossarcoma foi reconhecida através de estudos em pacientes que apresentavam mutações nesse gene na linhagem ger-

minativa e predisposição ao desenvolvimento de retinoblastoma e de diversos tipos de tumores secundários, entre eles o osteossarcoma[16].

As deleções em RB1 têm sido evidenciadas em outros tipos de lesões ósseas, como histiocitoma fibroso maligno, condrossarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes maligno, lipossarcoma, sarcoma sinovial, neuroepitelioma periférico, leiomiossarcoma, hemangiopericitoma e formas extra-esqueléticas de condrossarcoma[8,43].

A importância das mutações no gene TP53 no processo de desenvolvimento de tumores ósseos e sarcomas de tecidos moles tem sido confirmada pela ocorrência de mutações em ponto e alterações genéticas afetando regiões específicas do gene (exons 5, 6, 7, 8 e 9)[2,8,10]. Em osteossarcomas, a maioria dessas mutações consiste em transição do nucleotídeo citosina para timina (C→T) nos exons 7 e 8[43]; em outros sarcomas ósseos, entre eles histiocitoma fibroso maligno, rabdomiossarcoma, leiomiossarcoma, lipossarcoma, fibrossarcoma, sarcoma sinovial e sarcomas não diferenciados, têm-se observado 78% de transversões e 22% de transições no exon 5[62].

A expressão aumentada da proteína p53 foi demonstrada pioneiramente em lesões benignas e não-tumorais de tecidos moles intimamente relacionados com o tecido ósseo, tais como encondroma, condromatose sinovial[11], lipomas pleomórficos, queloides, *miositis*, *fascitis* e fibroma desmóide. O aumento de p53 nesses tipos de lesões pode ser devido a mecanismos fisiológicos específicos do tipo celular ou conseqüência de um evento mutacional[15].

A amplificação de MDM2 tem sido observada principalmente em lipossarcoma, histiocitoma fibroso maligno, osteossarcoma, rabdomiossarcoma[10,32,37,41,43,48] e sarcoma de Ewing[36,43]. A ocorrência de níveis elevados das proteínas p53 e mdm2 foi relatada em vários tumores, incluindo sarcomas de partes moles e ósseos[10,41], carcinomas de bexiga, tumores testiculares e linfomas não-Hodgkin[36].

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

A identificação de marcadores cromossômicos e moleculares específicos aos tumores é ferramenta importante para o diagnóstico preciso das neoplasias, inclusive das lesões ósseas. As técnicas citogenéticas e moleculares permitem dissecção submolecular dessas neoplasias, que pode ajudar na identificação dos mecanismos importantes na tumorigênese.

Histopatologicamente, sarcoma de Ewing, linfoma não-Hodgkin, neuroblastoma, rabdomiossarcoma embrionário e hemangiopericitoma podem ser tão similares, que têm sido referidos na literatura de forma coletiva como tumores de células azuis. Contudo, anormalidades cromossômicas específicas para os diferentes tipos de tumores e a clonagem de fusão de genes decorrentes de várias translocações têm permitido diagnóstico diferencial mais eficiente[39].

Cisto aneurismático, tumor de células gigantes e osteossarcoma telangiectásico podem apresentar dilemas radiológicos que também não são resolvidos por meio de investigações histológicas. A análise citogenética, entretanto, tem identificado anormalidades cromossômicas múltiplas e complexas em osteossarcoma[3,5], associações teloméricas em tumores de células gigantes[6] e cariótipo normal em cisto ósseo aneurismático[5]. As alterações genéticas observadas podem representar papel fundamental no diagnóstico dessas patologias. De forma semelhante, osteossarcoma parosteal pode algumas vezes comportar-se histologicamente como lesão benigna do tipo osteocondroma. Enquanto a avaliação histológica pode não ser precisa, as alterações citogenéticas encontradas, como cromossomos em anel nos osteossarcomas, podem ser importantes no diagnóstico diferencial dessas patologias.

O significado das anomalias cromossômicas em tumores benignos permanece pouco esclarecido. Aberrações específicas têm sido descritas em várias lesões benignas e podem ser úteis na diferenciação de seus correspondentes malignos. Por exemplo, a distinção entre lipoma e lipoma atípico ou lipossarcoma bem diferenciado pode ser possível devido à presença de cromossomos em anel nos dois últimos. Alguns lipomas são classificados por alguns autores como atípicos e localmente agressivos, porém benignos, enquanto outros os classificam como lipossarcomas bem diferenciados com todos os riscos de recorrência e diferenciação. Cromossomos em anel são observados em ambos os casos, assim evidenciando associação biológica comum entre as duas entidades[13].

Em algumas lesões ósseas benignas, como osteocondromas, fibromas condromixóides, encondromas e lesões malignas como condrossarcomas, parece haver uma região (6q13-21) freqüentemente envolvida em alterações cromossômicas. Esse marcador citogenético provavelmente está associado com comportamento local agressivo nesses tumores cartilaginosos[53]. Similarmente, a região 8q24 tem sido relacionada com o desenvolvimento de exostose múltipla hereditária[39]. Estudos moleculares têm indicado três regiões cromossômicas envolvidas com o desenvolvimento de exostose múltipla, a EXT1 em 8q24, a EXT2 na região pericentromé-

rica do cromossomo 11 e a EXT3 em 19p11-13. Nesses casos, a perda de heterozigosidade é observada nos genes EXT1 e EXT2 em condrossarcomas derivados de exostose múltipla e esporádicos, sugerindo que esses genes podem apresentar funções como supressores de tumor[1].

Alterações moleculares nos oncogenes MYC, RAS, FOS e genes supressores RB1 e TP53 têm sido estudadas em tumores ósseos primários, recorrentes e metastáticos. Enquanto em condrossarcoma não têm sido observadas mutações nesses oncogenes[30,41], em osteossarcomas e tumores ósseos de células gigantes há descrição de alterações nos genes TP53 e RB1. A ocorrência de mutações em TP53 tem sido relacionada com a agressividade tumoral em uma variedade de osteossarcomas. Em tumores de células gigantes, também têm sido freqüentemente relatadas alterações no oncogene MYC e menos comumente no gene FOS, evidenciando que lesões benignas também apresentam alterações em oncogenes[50].

O progresso nos estudos citogenéticos e moleculares em tumores ósseos benignos e malignos é evidente; porém, principalmente nos benignos, ainda há muito a ser esclarecido para que se possa estabelecer uma correlação mais precisa entre alterações moleculares, diagnóstico e prognóstico. Todavia, as técnicas moleculares estão disponíveis para auxiliar na identificação de genes específicos, na compreensão dos eventos genéticos envolvidos na etiologia do processo tumoral, no desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico diferencial, assim como no prognóstico e tratamentos mais efetivos com perspectivas para terapia gênica.

REFERÊNCIAS

1. Ahn, J., Ludecke, H.-J., Lindow, S. et al: Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 11: 137-143, 1995.
2. Andreassen, A., Ayjord, T., Hovig, E. et al: p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res* 53: 468-471, 1993.
3. Bridge, J.A.: Cytogenetics of soft tissue tumors. *Cancer J* 9: 129-135, 1996.
4. Bridge, J.A., Bhatia, P.S., Anderson J.R. et al: Biologic and clinical significance of cytogenetic and molecular cytogenetic abnormalities in benign and malignant cartilaginous lesions. *Cancer Genet Cytogenet* 69: 79-90, 1993.
5. Bridge, J.A., Nelson, M., McComb, E. et al: Cytogenetics findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 74-87, 1997.
6. Bridge, J.A., Sreekantaiah, C., Mouron, B. et al: Clonal chromosomal abnormalities in desmoid tumors. Implication for histopathogenesis. *Cancer* 69: 430-436, 1992.
7. Chen, P.-L., Chen, Y., Boodstein, R. et al: Genetic mechanisms of tumor supression by the human p53 gene. *Science* 250: 1576-1579, 1990.
8. Choong, P.F.M., Rydholm, A., Mertens, F. et al: Musculoskeletal oncology: advances in cytogenetics and molecular genetics and their clinical implications. *Acta Oncol* 36: 245-254, 1997.
9. Clark, J., Rocques, P.J. & Crew, A.J.: Identification of novel gene, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 7: 502-508, 1994.
10. Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M. et al: Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54: 794-799, 1994.
11. Coughlan, B., Feliz, A., Ishida, T. et al: p53 expression and DNA ploidy of cartilage lesions. *Hum Pathol* 26: 620-624, 1995.
12. Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N. et al: Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363: 640-644, 1993.
13. Dal Cin, P. & Den Berghe, V.: Bone and soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 59-66, 1997.
14. Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A. et al: Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 54: 2869-2872, 1994.
15. Dei Tos, A.P., Doglioni, C., Laurino, L. et al: p53 protein expression in non-neoplastic lesions and benign and malignant neoplasms of soft tissue. *Histopathology* 22: 45-50, 1993.
16. Eng, C., Li, F.P., Abramson, D.H. et al: Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 1121-1128, 1993.
17. Fearon, E.R. & Cho, K.R.: "The molecular biology of cancer", in *Principles and practice of medical research*, 3 ed., Churchill Livingstone International, 1996. p. 1-34.
18. Finlay, C.: The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* 13: 301-306, 1993.
19. Gill, S., McManus, A.P. & Crew, A.J.: Fusion of the EWS gene to a segment from 9q22-31 in a human myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 307-310, 1995.
20. Goddard, A.D. & Solomon, E.: "Genetic aspects of cancer", in *Advances in human genetics*, New York-London, Plenum Press, 1993. Vol. 21, p. 321-375.
21. Gustafson, P.: Soft tissue sarcoma: epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand* 65: 1-31, 1994.
22. Hacker, U., Grossniklaus, U. & Gehring, W.J.: Developmentally regulated Drosophila gene family encoding the forkhead domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8754-8758, 1992.
23. Harrington, E.A., Fanidi, A. & Evan, G.I.: Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev* 4: 120-129, 1994.
24. Hong, F.D., Huang, H.-J.S., To, H. et al: Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5502-5506, 1989.
25. Hung, J. & Anderson, R.: p53: functions, mutations and sarcomas. *Acta Orthop Scand* 273: 68-73, 1997.
26. Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D. et al: Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85, 1986.
27. Jeon, I.S., Davis, J.N. & Braun, B.S.: A variant Ewing's sarcoma translocation t(7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10: 1229-1234, 1995.
28. Kaneko, Y., Kobayashi, H. & Handa, M.: EWS-ERG fusion transcript produced by chromosomal insertion in a Ewing sarcoma. *Genes Chromosome Cancer* 16: 228-231, 1997.

29. Kaneko, Y., Koichi, Y. & Handa, M.: Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 115-121, 1996.
30. Kawai, A., Woodruff, J. & Healey, J.H.: SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N Engl J Med* 338: 153-160, 1998.
31. Kazmierczak, B., Wanschura, S., Rommel, B. et al: Ten pulmonary chondroid hamartomas with chromosome 6p21 breakpoints within the HMG-I(Y) or its immediate surroundings. *J Natl Cancer Inst* 88: 1234-1236, 1996.
32. Keleti, J., Quezada, M.M., Abaza, M.M. et al: The MDM2 oncoprotein is overexpressed in rhabdomyosarcoma cell lines and stabilizes wild-type p53 protein. *Am J Pathol* 149: 143-151, 1996.
33. Kessel, A.G., Santos, N.R., Simons, A. et al: Molecular cytogenetics of bone and soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 67-73, 1997.
34. Kleihues, P., Schäuble, B., Hansen, A.Z. et al: Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 150: 1-13, 1997.
35. Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A. et al: Expression of transforming growth factor-β (TGF-β) isoforms in osteosarcomas. *Cancer* 80: 2230-2239, 1997.
36. Knudson Jr., A.G.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823, 1971.
37. Ladanyi, M., Cha, C., Lewis, R. et al: MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 53: 16-18, 1993.
38. Ladanyi, M., Lewis, R., Jhanwar, S.C. et al: MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. *J Pathol* 175: 211-217, 1995.
39. Larramendy, M.L., Valle, J., Tarkkanen, M. et al: No DNA copy number changes in osteochondromas. A comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 97: 76-78, 1997.
40. Lewin, B.: *Genes VI*. New York, Oxford University Press, 1997. 1260p.
41. Lonardo, F., Ueda, T., Huvos, A.G. et al: p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas. *Cancer* 79: 1541-1547, 1997.
42. Malkin, D.: p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1198: 197-213, 1994.
43. Miller, C.W., Aslo, A., Won, A. et al: Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 559-565, 1996.
44. Mitelman, F., Johansson, B., Mandahl, N. et al: Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 1-8, 1997.
45. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C. et al: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245, 1992.
46. Mousses, S., McAuley, L., Beel, R.S. et al: Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 9: 1-6, 1996.
47. Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S. et al: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-87, 1992.
48. Pedeutour, F., Suijkerbuijk, R.F., Forus, A. et al: Complex composition and Co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosome in well-differentiated liposarcoma. *Genes Chromosom Cancer* 10: 85-94, 1994.
49. Pedeutour, F., Suijkerbuijk, R.F. & Van Gaal, J.: Chromosome 12 origin in rings and giant markers in well-differentiated liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 66: 133-134, 1993.
50. Pompetti, F., Rizzo, P., Simon, R.M. et al: Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors. *J Cell Biochem* 63: 37-50, 1996.
51. Rabbits, T.H.: The clinical significance of fusion oncogenes in cancer. *N Engl J Med* 338: 192-194, 1998.
52. Rabbits, T.H., Foster, A., Larson, R. et al: Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet*: 175-180, 1993.
53. Sawyer, J.R., Swanson, C.M., Lukacs, J.L. et al: Evidence of an association between 6q13-21 chromosome aberrations and locally aggressive behavior in patients with cartilage tumors. *Cancer* 82: 474-483, 1998.
54. Schoenmakers, E.F.P.M. & Van den Ven, W.J.M.: From chromosome aberrations to the high mobility group protein gene family: evidence for a common genetic denominator in benign solid tumor development. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 51-58, 1997.
55. Sherr, C.J.: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.
56. Smith, M.L. & Fornace, A.J. Jr.: Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* 7: 69-75, 1995.
57. Sreoman, G., Andersson, H. & Mandahl, N.: Translocation t(9;22)(q22; q12) is a primary cytogenetic abnormality in extrasqueletal myxoid chondrosarcoma. *Int J Cancer* 62: 398-402, 1995.
58. Ueda, Y., Dochorn-Dworniczak, B. & Blasius, S.: Analysis of mutant p53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 172-178, 1993.
59. Weber-Hall, S., McManus, A. & Anderson, J.: Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosom Cancer* 17: 7-13, 1996.
60. Weinberg, R.A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330, 1995.
61. Wunder, J.S., Czitrom, A.A., Kandel, R. et al: Analysis of alterations in retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 83: 194-200, 1991.
62. Yoo, J., Lee, H.K., Kang, C.S. et al: p53 gene alterations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 121: 395-399, 1997.
63. Zahm, S.H. & Fraumeni Jr., J.F.: The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin Oncol* 24: 504-514, 1997.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
São J. Rio Preto

unesp

3. *TP53* MUTATIONS IN A RECURRENT UNICAMERAL BONE CYST

ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics 124 (2001) 175–176

CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS

Letter to the editor

TP53 mutations in a recurrent unicameral bone cyst

Cytogenetic and molecular studies have contributed to the elucidation of mechanisms involved in the etiology and progression of benign and malignant bone lesions.

Unicameral (solitary or simple) bone cyst (UBC) represents a benign lesion that occurs during growth. Most patients are in the second decade of life and the lesions are often located in the metaphysis of the long tubular bones such as the femur (33%) and humerus (23%) [1]. The etiology of this asymptomatic lesion, which frequently causes pathological fractures, is still unknown, representing an enigma for radiologists, pathologists, and orthopedic surgeons [2]. The local recurrence rates are high, ranging from 35% to 70% [3].

We report *TP53* mutations in the cells of fresh tissue obtained from the fourth recurrence of a unicameral bone cyst, by using a PCR-SSCP technique and DNA sequencing. The mutations consisted of a transition C→T and a transversion G→C in codons 248 and 249 (Fig. 1), resulting in the substitution of the amino acids arginine for triptophane and arginine for serine, respectively.

The patient, a 15-year-old boy, presented four recurrent cysts in the right distal femur during a period of 4 years. He reported a history of physical trauma suffered in a soccer game 2 months prior to diagnosis of the primary lesion. The primary lesion had also been analyzed by us using traditional cytogenetics and revealed highly complex clonal structural rearrangements involving chromosomes 4, 6, 8, 16, 21, and both chromosomes 12 [4]. These particular rearrangements have not been described in benign lesions or in malignant bone tumors, but other complex rearrangements have been observed in osteosarcoma [5] and soft tissue tumors [6].

As far as we know, this is the first case of a *TP53* mutation in UBC. However, *TP53* mutations are frequent findings in malignant bone tumors, such as osteosarcomas [7,8], and soft tissue sarcomas, such as malignant fibrous histiocytoma, rhabdomyosarcoma, and leiomyosarcoma [9]. In osteosarcoma, the mutations consist of transitions C→T, mainly in the codons 248, 273, and 282 [7,10], while in soft tissue sarcomas, they more frequently consist of transversions (78%) in codon 175 [9].

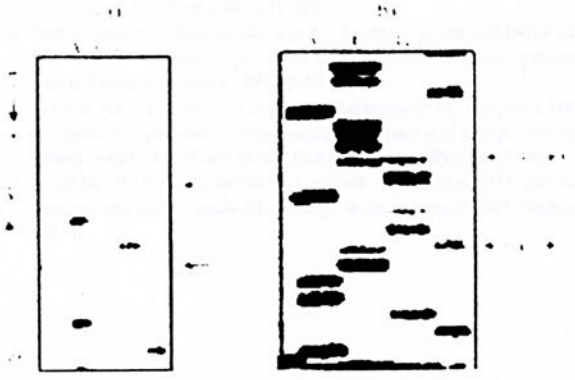


Fig. 1. DNA sequence analysis of the UBC sample. Both wild type (a) and mutant sequence (b) are presented. The transition C→T in codon 248 and transversion G→C in codon 249 are indicated by arrows.

In benign bone tumors and non-neoplastic lesions of soft tissues such as pleomorphic lipoma, fascitis, pyogenic granuloma [11], enchondroma, and synovial chondromatosis [12], increased p53 protein expression has been observed. Overexpressed p53 by immunohistochemistry may be due either to different physiological mechanisms of these tissues or *TP53* mutations, which often lead to an increase in the half-life and stability of the protein [11].

The mutations detected in our patient can be related to the chromosome instability and tumoral recurrences observed in the primary UBC lesion. Do these mutations point to a premalignant condition or only to uncontrolled cell proliferation? Although the patient had no additional recurrences, and the histophatological diagnosis of the recidivous lesions continues to be that of UBC, only further studies of this condition may be able to provide the answer to this question.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Eloiza H. Tajara for revision of this manuscript, Dr. Peter James Harris for revision of the text, and FAPESP and FUNDUNESP for financial support.

Sheila Adami Vayego-Lourenço
University Center of Votuporanga, CEUV
Votuporanga, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55-17-221-2200.
E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br

0165-4608/01/$ – see front matter © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.
PII: S0165-4608(00)00343-5

Ana Elizabete Silva
Department of Biology
IBILCE-UNESP
Rua Cristovão Colombo, 2265
15054-000 Campus de São José do Rio Preto, SP, Brazil

References

[1] Amling M, Werner M, Posl M, Ritzel H, Welkerling H, Wening JV, Maas R, Winkler K, Heise U, Delling G. Solitary bone cysts. Morphologic variation, site, incidence and differential diagnosis. Pathologe 1996;17:63–7.

[2] Lokiec F, Wientroub S. Simple bone cyst: etiology, classification, pathology, and treatment modalities. J Pediatr Orthop 1998;7:262–73.

[3] Malawer MM, Abelson HT, Suit HD. Sarcomas of bone. In: De Vitta Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Principles and practice of oncology. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1985. p. 1293–342.

[4] Vayego SA, De Conti OJ, Varella-Garcia M. Complex cytogenetic rearrangement in a case of unicameral bone cyst. Cancer Genet Cytogenet 1996;86:46–9.

[5] Bridge JA, Nelson M, McCombe E, McGuire MH, Rosenthal H, Vergara G, Maale GE, Spanier S, Neff JR. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. Cancer Genet Cytogenet 1997;95:74–87.

[6] Dal Cin P, Van Den Berghe H. Ten years of the cytogenetics of soft tissue tumors. Cancer Genet Cytogenet 1997;95:59–66.

[7] Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Doeffler P. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. J Cancer Res Clin Oncol 1996;122:559–65.

[8] Mousses S, McAuley L, Beel RS, Kandel R, Andrulis IL. Molecular and immunohistochemical of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. Mod Pathol 1996;9:1–6.

[9] Yoo J, Lee HK, Kang CS, Par WS, Lee JY, Shim SI. p53 gene alterations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. Arch Pathol Lab Med 1997;121:395–9.

[10] Patiño-Garcia A, Sierrasesúmaga L. Analysis of the p16INK4 and TP53 tumor suppressor genes in bone sarcoma pediatric patients. Cancer Genet Cytogenet 1997;98:50–5.

[11] Dei Tos AP, Doglioni C, Laurino L, Barbareschi M, Fletcher CDM. p53 protein expression in non-neoplastic lesions and benign and malignant neoplasms of soft tissue. Histopathology 1993;22:45–50.

[12] Coughlan B, Feliz A, Ishida T, Czerniak B, Dorfman HD. p53 expression and DNA ploidy of cartilage lesions. Hum Pathol 1995;26:620–4.

4. CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA (CCT): DETECÇÃO PRECOCE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA PROGRESSÃO TUMORAL

CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA (CCT): DETECÇÃO PRECOCE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS COMO FATOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA PROGRESSÃO TUMORAL.

Lucimari Bizari Di Cézar, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética, UNESP, São José do Rio Preto-SP

Antonio Barbosa de Oliveira-Filho, médico urologista, Doutorando do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Urologia da UNIFESP-EPM, São Paulo-SP.

Ana Elizabete Silva, Doutora em Genética, Professora Assistente Doutora Departamento de Biologia, UNESP, São José do Rio Preto-SP

Jornal Brasileiro de Medicina, 2004, *in press*.

Transitional cell carcinoma of the bladder (TCC): Early Detection of Genetic Alterations as Diagnostic and Prognostic Factor to Tumor Progression.

Summary

Transitional cell carcinoma (TCC) is the predominant histological type of the bladder cancer. Genetic studies about pathways of the initiating and tumor progression have contributed to a better understanding of the mechanisms of carcinogenesis. The occurrence of genetic alterations mainly in tumor suppressor genes and oncogenes, such as *CDKN-2, ARF, RB, TP53, H-RAS, BCL-2, c-ERBB-2, cyclin D1* and the receptor EGF-R has been show in TCC. The tumor progression appears to occur jointly with the acquisition of chromosomal abnormalities as deletions of 9p, 9q and 17p and gain of 1q, 5p, 7p, 11q and 17q. The genetic evaluation using genetic markers for early diagnosis, recurrence and metastasis risk are discussed.

Key words: transitional cell carcinoma (TCC), genetic alterations, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), oncogene, tumor supressor gene.

I. Introdução

O câncer da bexiga é considerado a quarta causa mais comum de morte por câncer no homem, sendo que mais de 50.000 casos novos são diagnosticados a cada ano nos EUA. Prevalece a partir da quinta década de vida, com proporção de 4:1 homens afetados em relação às mulheres. No Brasil, a estimativa da incidência do câncer da bexiga para 1999 foi de 7.750 casos novos, correspondendo a 3% quando consideram-se todos os casos de câncer e ocupando o 9° lugar entre os tipos mais comuns (1).

Quanto a natureza histológica, 92% dos tumores da bexiga são carcinomas de células transicionais (CCT), enquanto que o carcinoma epidermóide (CCE), corresponde a 6% e o adenocarcinoma a 2% (2).

O diagnóstico do tumor primário é realizado através da cistoscopia com biópsia, que consiste no método padronizado. Apesar de sensível o diagnóstico definitivo pode ser prejudicado em alguns casos, pela dificuldade na acessibilidade de lesões muito pequenas. O exame citológico da urina tem sido um marcador padrão para CCT da bexiga. Todavia, a utilização de rotina desse procedimento defronta com algumas dificuldades práticas devido a sua insensibilidade, especialmente em tumores moderados e bem diferenciados. O clínico necessita, portanto, de técnicas mais sensíveis, como as moleculares que possam auxiliar no diagnóstico mais precoce dessas neoplasias.

A origem e a progressão tumoral têm sido associadas com o acúmulo gradual de múltiplas alterações genéticas, desde aquelas que promovem perda ou ganho de material genético, como as deleções ou as amplificações gênicas respectivamente, até mudanças no número de cromossomos (aneuploidias). Outro mecanismo importante, envolve as translocações de seqüências gênicas (aberrações estruturais), principalmente aquelas que

unesp

podem afetar genes próximos aos pontos de quebras, resultando numa desregulação de genes normais ou na formação de oncogenes quiméricos. Todavia, a ocorrência de mutações em classes de genes que regulam o ciclo celular, como os oncogenes e os genes supressores de tumor, é o principal responsável pelo desencadeamento do processo tumoral.

As técnicas moleculares juntamente com a citogenética têm auxiliado na elucidação dos eventos envolvidos nos processos da carcinogênese de diferentes tecidos e assim permitido correlacionar determinadas alterações genéticas aos diferentes estádios do desenvolvimento tumoral.

II. Tumorigênese da bexiga

Alterações cromosssômicas e desenvolvimento tumoral

A seqüência de alterações cromossômicas que ocorre durante o desenvolvimento tumoral da bexiga, inicia-se mais comumente, com a perda parcial ou total do cromossomo 9 (3-8). A partir do urotélio normal, as alterações mais frequentes observadas nos tumores da bexiga considerando-se todos os graus de estadiamento, são: deleções do braço longo do cromossomo 9 (9q) em tumores no estádio pTa, e do braço curto (9p), mais freqüentemente a partir do estádio pT1, ganho do braço longo do cromossomo 1 (1q), perdas do Y, devendo portanto, ocorrer no período mais precoce do desenvolvimento tumoral (9-11). Outras alterações genéticas em CCT incluem perdas em 2q, 8p, 10q, 11p e 11q, ganhos em 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10p, 10q, 11q, 17 e 20q (4, 5, 10-13) e amplificação em 10q22.1-q23.1, 11q13 e 17q12-21 (9, 13).

Na região cromossômica 9p21 estão mapeados genes que desempenham papel importante no controle da proliferação celular. Assim, distúrbios na função desses genes ou em associação com outros genes, podem contribuir para a iniciação do desenvolvimento do

unesp

câncer de bexiga (9, 14). Segundo Bartlett *et al.* (5), a perda do cromossomo 9 em pacientes com CCT está associada com risco elevado de recorrência tumoral, sugerindo também a existência de genes relacionados à recidivas nesse cromossomo. Portanto, a detecção dessa alteração em estádios precoces, pode ser utilizada como um possível marcador de recorrência da doença.

De modo geral, alguns estudos têm relatado freqüências de monossomia 9 em cerca de 50-60% das neoplasias da bexiga (6, 7). Hartmann *et al.* (15) observaram perdas do cromossomo 9 tanto em carcinomas da bexiga como também em 70% das amostras de hiperplasias urotelial e em 50% das amostras de urotélio diagnosticado histopatologicamente como normal, ambas de pacientes com carcinoma papilar da bexiga. Assim, alterações genéticas similares aos tumores podem ser encontradas em lesões benignas e urotélio normal de pacientes com neoplasias.

A trissomia 7 além da monossomia 9 tem sido considerada como alteração cromossômica primária do câncer da bexiga (6, 7). Pycha *et al.* (6) detectaram freqüências elevadas de trissomia 7 em amostras de CCE (79%) e de CCT (93,2%), sendo que em pelo menos 79% dos casos, o ganho do cromossomo 7 estava correlacionado com tumores de estádio avançado, corroborando outros relatos de que esse evento está associado com a progressão das lesões de baixo para alto grau e carcinomas invasivos, como também com maior risco de recorrência (5, 16). Adicionalmente a estas alterações, o ganho do cromossomo 17 é um achado freqüente em tumores da bexiga, indicando sua participação como um evento mais tardio, relacionado com estádios mais avançados e de alto grau, durante a progressão tumoral (6, 8, 15, 17).

unesp

Invasibilidade tumoral e tipos de alterações cromossômicas

Sob o ponto de vista histológico, os CCT são classificados em papiloma, carcinoma *in situ*, tumores de baixo grau (I e II de Ash) e tumores de alto grau (III e IV de Asch). O prognóstico dos CCT relaciona-se ao grau histológico e principalmente ao estadiamento na época no diagnóstico (18).

A freqüência elevada de alterações do cromossomo 9 observada em CCT, tem levantado algumas dúvidas sobre a classificação dos estádios pTa e pT1. Embora os carcinomas pT1 sejam freqüentemente agrupados juntos com pTa, como carcinomas superficiais da bexiga não-invasivo, o estádio pT1 tem revelado uma freqüência bastante elevada de alterações no cromossomo 9 (85%) em relação ao estádio pTa (47%) (14), assim como de aberrações cromossômicas em geral (4, 14), sugerindo um aumento da instabilidade genômica nesse estádio, e que os tumores no estádio pT1 podem não estar localizados tão superficialmente na bexiga como o estádio pTa (14). Por outro lado, Richter *et al.* (9) observaram alterações genéticas semelhantes em carcinomas nos estádios pT1 e pT2 (tumor com invasão muscular), reforçando que os carcinomas de bexiga com maior potencial invasivo representam um subtipo distinto dos tumores pTa, que apresentam poucas alterações genéticas.

Mecanismos moleculares da transformação maligna da bexiga

Os mecanismos moleculares da carcinogênese têm sido melhor entendidos a partir da investigação de certos fatores envolvidos nos processos de iniciação e progressão tumoral, devido alterações na expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor, importantes na sinalização bioquímica das células e no controle da proliferação celular, em

conseqüência de mutações de ponto e de anormalidades cromossômicas específicas. Alguns desses genes são mais afetados durante a carcinogênese da bexiga (2, 19).

- Genes supressores de tumor: *CDKN2, ARF, RB* e *TP53;*
- Fator e receptor de crescimento epidérmico: EGF e EGF-R;
- Oncogenes: *H-RAS, BCL-2* e *c-ERBB-2*.

Nos tumores de bexiga em estádios iniciais, há perda dos genes supressores de tumor *CDKN2 (INK4A)* e *CDKN2B (INK4B)*, que codificam proteínas reguladoras da proliferação celular, indicando ser um evento precoce no desenvolvimento dessas neoplasias (7, 20). Ainda nas fases iniciais da carcinogênese da bexiga têm-se observado a expressão aumentada do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) e durante a progressão tumoral, alterações preferencialmente no gene supressor de tumor *TP53* e no oncogene *c-ERBB-2*, ocorrendo respectivamente, em tumores de estádios avançados e metástases nodais (12, 19). Na Tabela 1 estão resumidas algumas alterações moleculares envolvidas na tumorigênese da bexiga e as respectivas localizações cromossômicas dos genes alterados.

Deleções do gene *CDKN2* têm sido relatadas em cerca de 14% a 30% dos CCT e mutações de ponto em 3% (3, 20), corroborando ser esse, um evento precoce no desenvolvimento em tumores de baixo estadiamento.

Mutações no gene *TP53* podem levar ao acúmulo da proteína p53 anômala (mutante) no núcleo e no citoplasma, devido ao aumento de sua meia-vida, podendo ser detectada por testes imunoistoquímicos. A expressão aumentada da proteína p53 ou mutações no gene *TP53* (21) têm sido observadas em carcinoma *in situ* da bexiga, assim como em CCT de outros estádios tumorais (17, 19). Mutações no gene *TP53* consistem

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

em alterações comuns em carcinomas da bexiga, exercendo função na progressão do câncer superficial à invasivo. Assim, para monitoramento de pacientes com CCT, Phillips *et al.* (22) indicam o rastreamento de mutações no gene *TP53* pela técnica de PCR-SSCP, tanto em biópsias, como em células de lavado vesical.

Alterações no gene ou na expressão da proteína p53 podem ocorrer concomitantemente com mutações no gene *RB* (retinoblastoma). Cordon-Cardo *et al.* (19), não observaram a ocorrência simultânea de mutações em ambos os genes em casos de CCT, mas mutações em um ou no outro gene estavam relacionadas com progressão tumoral e menor sobrevida dos pacientes. Porém, Cote *et al.* (23) constataram expressão alterada tanto da proteína pRb como da p53 em CCT. Nesses pacientes o prognóstico era pior, sugerindo efeitos cooperativos entre os dois genes. Acredita-se que os padrões alterados de ambos os genes desregulam o ciclo celular na fase G1 e reduzem a resposta celular à morte programada (apoptose), nos casos em que ocorrem lesões no DNA (19).

Outra anomalia freqüente é a expressão elevada e a amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R). O gene *ERBB*, que codifica o EGF-R está localizado na região cromossômica 7p12, assim alterações numéricas do cromossomo 7 podem relacionar-se com a expressão elevada desse receptor, com conseqüente aumento da divisão celular. Em CCT, o acúmulo de EGF-R está relacionado com estádio avançado, progressão tumoral e mal prognóstico (12).

A primeira mutação em oncogenes da família *RAS*, foi identificada no códon 12 do gene *H-RAS* em uma linhagem celular de câncer da bexiga. As mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *H-RAS* são observadas em cerca de 10% dos tumores da bexiga, estando associada à recorrência precoce em pacientes com tumores superficiais (12).

unesp

O oncogene *BCL-2* também envolvido na carcinogênese da bexiga, parece inibir a morte celular programada (apoptose), assim prolongando a sobrevivência celular. A expressão elevada da proteína bcl-2 em CCT da bexiga, está relacionada com sobrevida menor do paciente e resposta mais pobre a imunoterapia, provavelmente devido à resistência a quimio e radioterapia, promovida pela proteína bcl-2 (24, 25).

Investigações do gene c-*ERBB-2* (*HER-2/neu*) em tumores vesicais, têm evidenciado amplificação freqüentemente associada com estádios avançados, recorrência e metástases (12, 21, 26). Este oncogene codifica informações para a síntese de um receptor semelhante ao EGF-R, denominado proteína p185 ou c-erbB-2, que pode ser utilizada através de imunocoloração, como um marcador tumoral no monitoramento citológico de pacientes com risco de desenvolver câncer de bexiga (12).

Concluindo, o ciclo celular é regulado por diferentes genes que atuam em múltiplas etapas para garantir o controle da proliferação celular. Em câncer da bexiga, como já descrito, alguns desses genes quando alterados parecem interferir na proliferação celular atuando no início ou na progressão tumoral. Portanto, uma das perspectivas para o diagnóstico precoce do tumor e a detecção de recorrências é através da utilização de marcadores genéticos em urotélio ainda considerado normal, em biópsias de lesões de estádio superficial (não-invasivo) ou em células esfoliadas da bexiga, permitindo avaliar o risco potencial dessas células como precursoras de tumor da bexiga e do modo de progressão tumoral. Assim, as técnicas citogenéticas e moleculares, podem trazer informações diagnósticas e de *screening*, bem como de escolha do melhor tratamento para os pacientes.

unesp

III. Referências

1. INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 1999.
2. DE-VITA, V.T.; HELLMAN, S. & ROSENBERG, A.S. – *Cancer-Principles e Practice of Oncology*. Philadelphia, 1997, 1257p.
3. BALÁZS, M.; CARROLL, P. *et al.* – Frequent homozygous deletions of cyclin-dependent kinase inhibition 2(*MTSI*, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom. Cancer, 19*: 84-9, 1997.
4. RICHTER, J.; JIANG, F. *et al.* – Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res., 57:*2860-4, 1997.
5. BARTLETT, J.M.; WATTERS, A.D. *et al.* – Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional all carcinoma of the urinary bladder?. *Br. J. Cancer, 77:*2193-8, 1998.
6. PYCHA, A.; MIAN, C. *et al.* – Numerical aberrations of chromosome 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study performed by fluorescence *in situ* hybridization. *J. Urol., 160:*734-40, 1998.
7. ALY, S.M. & KLALED, H.M. – Chromosomal aberrations in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet., 114:*62-7, 1999.
8. MAHDY, E.; YOSHIHIRO, S. & ZECH, L. – Comparasion of comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization and flow cytometry in urinary bladder cancer. *Anticancer Res., 19:*7-12, 1999.

unesp

9. RICHTER, J.; BEFFA, L. *et al.* – Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol., 153:*1615-21, 1998.

10. SIMON, R.; BÜRGUER, H. *et al.* – Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J. Pathol., 185:*345-51, 1998.

11. BRUCH, J.; WOHR, G. *et al.* – Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosom. Cancer, 23:*167-78, 1998.

12. KONTOGEORGOS, G. & ANINOS, D. – Recent aspects in the diagnosis and prognosis of bladder cancer. *Tumori, 84:*301-7, 1998.

13. HOVEY, R.M.; CHU, L. *et al.* – Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res., 58*:3555-60, 1998.

14. SAUTER, G.; GASSER, T.C. *et al.* – DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol. Res., 1:*37-43, 1998.

15. HARTMANN, A.; MOSER, K. & KRIEGMAIR, M. – Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am. J. Pathol., 154:*721-7, 1999.

16. RIED, T. – Interphase cytogenetics and its role in molecular diagnostic of solid tumors. *Am. J. Pathol., 152:*325-7, 1998.

17. LINN, J.F.; SESTERHENN, I. & MOSTOFI, F.K. *et al.* – The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J. Urol., 159:*1493-6, 1998.

18. SROUGI, M. & HERING, F.L.O. – *Urologia diagnóstico e tratamento*. Roca, 1998. 368p.

19. CORDON-CARDO, C.; ZHANG, Z.F. *et al.* – Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res., 57:*1217-21, 1997.

20. ORLOW, I.; LARUE, H. *et al.* – Deletions of the *INK4A* gene in superficial bladder tumors association with recurrence. *Am. J. Pathol., 155:*105-13, 1999.

21. WAGNER, U.; SAUTER, G. *et al.* – Pattern of p53, erbB-2, and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum. Pathol., 26:*970-8, 1995.

22. PHILLIPS, H.A.; HOWARD, G.C.W. & MILLER, W.R. – p53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *Cancer Res., 82:*136-41, 2000.

23. COTE, R. J.; DUNN, M.D. *et al.* – Elevated and absent pRB expression is associated with bladder cancer progression and *Has* cooperative effects with p53. *Cancer Res., 58:*1090-4, 1998.

24. KONG, G.; SHIN, K.Y. *et al.* – Bcl-2 and p53 expressions in invasive bladder cancers. *Acta Oncol., 37:*715-20, 1998.

25. NAKOPOULOU, L.; VOURLAKOU, C. *et al.* – The prevalence of bcl-2, p53, and ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum. Pathol., 29:*146-54, 1998.

26. MIYAMOTO, H.; KUBOTA, Y. *et al.* – C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology, 55:*679-83, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Endereço para correspondência:
Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP-Departamento de Biologia
Rua: Cristovão Colombo, 2265
15054-000- São José do Rio Preto,SP
e-mail: anabete@bio.ibilce.unesp.br
Fone: (17) 221-2384
Fax: (17) 221-2390

Tabela 1. Principais genes envolvidos na tumorigênese da bexiga, suas respectivas regiões cromossômicas, categorias, proteínas e funções.

Gene	Região cromossômica	Categoria	Proteína (Localização)	Função
CDKN2 CDKN2B	9p21	supressor de tumor	ciclinas p15 e p16 (núcleo)	Bloqueiam a progressão do ciclo celular (inibem a atividade das cdks)
RB	13q14	supressor de tumor	p110 ou pRB (núcleo)	Inibe a proliferação celular (reprime genes através de E2F)
TP53	17p13.1	supressor de tumor	p53 (núcleo)	Bloqueia o ciclo celular em G1-S (inibe genes necessários para a progressão do ciclo celular)
ERBB	17p12	oncogene	EGF-R (membrana plasmática)	Receptor do fator de crescimento epidérmico (regula o crescimento celular)
H-RAS	11p15.1	oncogene	$p21^{RAS}$ (citoplasma)	Proteína de transferência de sinais e ativação do crescimento celular
BCL-2	18q21.3	oncogene	Bcl-2 (envoltório nuclear)	Bloqueia apoptose
c-ERBB-2	17q21	oncogene	p185 ou c-erbB-2 (membrana plasmática)	Receptor transmembrânico de fator de crescimento

cdks: quinases dependentes de ciclinas; E2F: fator de transcrição

5. CHROMOSOMAL ANEUPLOIDIES IN BLADDER CANCER, CHRONIC CYSTITIS AND NORMAL UROTHELIUM DETECTED BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION

ARTIGO / ARTICLE

Chromosomal aneuploidies in bladder cancer, chronic cystitis and normal urothelium detected by fluorescence *in situ* hybridization

Aneuploidias cromossômicas em câncer da bexiga, cistite crônica e urotélio normal detectadas por hibridizaçao in situ *fluorescente*

Lucimari Bizari Di Cânzo,[1] José Carlos Mesquita,[2] Elkeu Denecdo[3] e Ana Elizabete Silva[1]

Abstract

The objective of present work is to investigate the occurrence of numerical alterations in lesions and bladder carcinomas that may be helpful in early diagnosis. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was applied to identify such alterations in chromosomes 7, 9 and 17, in interphase nuclei of 14 fresh bladder tumor specimens (13 transitional cell carcinomas, TCC, and 1 undifferentiated anaplasic carcinoma, UAC), and 5 specimens derived from the TCC patients (2 chronic cystitis, UCC, and 3 macroscopically normal urothelium biopsies, MNU). The most frequent anomalies in malignant tumors of the bladder were trisomy /tetrasomy 7 (6/14=43%), trisomy/tetrasomy 17 (7/14=50%) and monosomy 9 (4/14=29%). The two chronic cystitis samples showed monosomy 9, whereas one macroscopically normal urothelium sample presented similar findings (polysomy 7, 9, and 17) observed in the matched tumoral tissue. Two carcinomas, an invasive grade IV (TCC13) and an invasive primary (UAC14), presented trisomy/tetrasomy 7, 9 and 17 suggesting that the cells were polyploidy. These results strengthens the involvement of chromosomes 7, 9, and 17 in urothelial carcinogenesis. The alterations of chromosomes 7 and 9 are related to the initiation process; and of chromosome 17, to tumoral progression and recurrence. Moreover, the results also support the hypothesis that chronic cystitis and normal urothelium from patients with bladder carcinoma can carry important chromosome abnormalities which may predict risk for tumor progression and recurrence. Thus, interphase FISH may be a useful tool for early diagnosis in patients at risk of disease and for follow-up in cases of recurrence and metastase.

Key words: bladder neoplasms; carcinoma; cystitis; aneuploidy; fluorescence in situ hybridization; chromosomes.

[1]Departamento de Biologia, UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, São Paulo - Brasil. *Enviar Correspondência para A.E.S.* Departamento de Biologia, UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo 2265; 15054-000 São José do Rio Preto, SP - Brasil. *E-mail:* anabete@bio.ibilce.unesp.br

[2]Escola de Medicina, FAMERP - Câmpus de São José do Rio Preto, São Paulo - Brasil.

[3]Hospital Beneficiência Portuguesa, São José do Rio Preto, SP - Brasil.

Recebido em março de 2002.

Resumo

O presente trabalho investigou a ocorrência de anomalias cromossômicas numéricas em lesões da bexiga que possam auxiliar no diagnóstico precoce. A técnica de Hibridação in situ *Fluorescente (FISH) foi aplicada para identificar tais anomalias nos cromossomos 7, 9 e 17 em núcleos interfásicos de 14 amostras de tumores da bexiga frescos (13 carcinomas de células transicionais, TCC, e 1 carcinoma anaplásico indiferenciado, UAC), e 5 amostras derivadas de pacientes com TCC (2 cistites crônicas e 3 biopsias de urotélio macroscopicamente normais). As anomalias mais freqüentes nos tumores malignos da bexiga foram trissomia/tetrassomia 7 (6/14=43%), trissomia/tetrassomia 17 (7/14=50%) e monossomia 9 (4/14=29%). As duas amostras de cistites crônicas apresentaram monossomia 9, uma das amostras de urotélio macroscopicamente normal exibiu resultado semelhante (polissomia 7, 9 e 17) ao do tecido tumoral correspondente. Dois carcinomas, um grau IV invasivo (TCC13) e um primário invasivo (UAC14), exibiram trissomia e tetrassomia 7, 9 e 17 sugerindo a ocorrência de poliploidia. Tais resultados reforçam o envolvimento dos cromossomos 7, 9 e 17 na carcinogênese urotelial. As alterações dos cromossomos 7 e 9 estão relacionadas com os processo de iniciação e do cromossomo 17 com progressão e recorrência tumoral. Os resultados também suportam a hipótese de que as cistites crônicas e o urotélio normal de pacientes com carcinoma de bexiga podem conter anormalidades cromossômicas importantes, que podem predizer risco para progressão e recorrência tumoral. Assim, a técnica de FISH pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce, em pacientes com risco de desenvolver a doença e acompanhamento em casos de recorrência e metástases.*

Palavras-chave: neoplasias da bexiga; carcinoma; cistite; aneuploidias; fluorescência em hibridização in situ; cromossomos.

INTRODUCTION

Bladder carcinoma is a relevant worldwide public health problem. The predominant histological type of bladder cancer is transitional cell carcinoma (TCC) of urothelial origin. Several etiologic factors have been related as cause of bladder cancer, such as smoking and occupational exposure to certain aromatic amines.[1] The tumoral stage and grade are important parameters for prognosis. The acquisition of genetic alterations along the tumoral progression is an important event increasing the malignant potential of cancer cells.[2] Partial deletions of chromosomes 9 and 17p and gain of 1q 5p, 7p, 11q and 17q were defined as the most important alterations in TCC.[3,4] These abnormalities are related with molecular changes in tumor suppressor genes (CDKN2, ARF, RB and TP53), oncogenes (BCL-2 and c-ERBB-2), and other genes such as EGF and EGF-R.[5]

FISH is a sensitivity technique for the detection of urothelial carcinoma, superior to cytology. This technique has the potential to monitor patients with bladder cancer for tumor recurrence.[6]

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of aneuploidy involving chromosomes 7, 9 and 17 by FISH technique in interphase nuclei of bladder carcinoma, chronic inflammation (cystitis) and macroscopically normal urothelium biopsies from patients with TCC. FISH technique may be a useful tool for early diagnosis and follow up the patients with risk to recurrence and metastasis.

MATERIAL AND METHODS

A total of 19 specimens were obtained immediately after surgical resection from 16 patients (11 men and 5 women) with bladder cancer. Mean age of these patients was 68 years (ranging from 52 to 83 years). Tumor stage and grade were defined according to WHO system.[7] The specimens were diagnosed as follows: 13 transitional cell carcinoma (TCC), 1 undifferentiated anaplasic carcinoma (UAC), 2 unspecific chronic cystitis (UCC) and 3 macroscopically normal urothelium (MNU). All specimens were obtained prior to radiation- and chemotherapy. From healthy donors,

we have obtained 5 specimens of urine exfoliated cells (donors' range age: 15 to 27 years) and 5 of peripheral blood lymphocytes (donors' range age: 28 to 81 years). All patients and healthy controls gave written informed consent for the study. This work was approved by the Ethics in Research Committee of UNESP, São José do Rio Preto - SP Campus and National Committee of Ethics in Research (CONEP) (process number: 409/99).

The FISH technique was performed in interphase nuclei with the following probes: alpha-satellite centromeric DNA probes for chromosomes 7 and 17 (Oncor) labeled with biotin and classical satellite DNA probe for chromosome 9, directly labeled with Spectrum RedUTP (Vysis). The bladder tissues collected in saline solution were mechanically disaggregated, treated with hypotonic sodium citrate solution (1%) for 30 min and fixed in 3:1 methanol/acetic acid overnight. The remaining cell fragments were disaggregated through incubation in 60% acetic acid for 4 h and the resulting cell suspension was dropped onto microscope slides, which were stored at -70°C up to the FISH assay.

Frozen slides were thawed at room temperature, dehydrated for 2 min each in 70%, 85% and 100% ethanol series, and air-dried. Each slide was treated with acetic acid 60% and pepsin 0.008% in 0.001M HCl for 1-5 min. Slides were rinsed in 1×PBS and dehydrated in ethanol. Next, 10µ of hybridization mixture containing 20ng of DNA probe, 50% formamide, 10% dextran sulfate, and 2×SSC was applied to each slide. A coverslip was added and sealed with rubber cement. Probe and target DNAs were denatured simultaneously at 84°C for 8 min and hybridization was carried out overnight in a moist chamber at 37°C. Post-hybridization washes included three washes in 50% formamide/2×SSC for 5 min at 37°C and three washes in 2×SSC (pH 7.0) for 5 min each at 37°C. The slides hybridized with biotin-labeled probes (7 and 17) were detected with avidin-FITC and the signal was amplified using biotinylated anti-avidin antibody, followed by another layer of avidin-FITC (Vector). After three buffer washes (2 min each), the nuclei were counterstained by adding propidium iodide (1µg/ml) or DAPI (2µg/ml) in an antifade solution.

Dual-color FISH assays performed in the samples TCC13, IAC14 and MNU01 using centromeric probes of the chromosomes 7 (biotin-labeled) and 9 (Spectrum Red), or 9 (Spectrum Red) and 17 (biotin-labeled).

For each probe, two independent observers, according criteria described by Eastmond et al.[8] evaluated signals from about 300 nuclei. In brief, only intact and non-overlapping nuclei were counted, and only completely separated signals were scored individually, bilobed signals were counted as one. Cutoff levels were based on the upper limit mean +4SD of the exfoliated urothelial cells samples. The cutoff values for monosomy 7, 9, and 17 were respectively set at 26.8%, 22.8%, and 24.1%; for trisomy 7, 9 and 17 were respectively set at 5.0%, 7.5%, and 6.2%, and for tetrasomy 7, 9 and 17 were set at 2.0%. Statistical analysis was performed by chi-squared test. A P value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Significant differences in the number of copies of chromosomes 7 (X^2=15.5, DF=2, P<0.05) and 9 (X^2=18.3, DF=2, P<0.05) per cell were found between the lymphocytes and the bladder exfoliated cells. Thus we used the exfoliated urothelial cell samples as controls because these represent the same cellular type of the tumoral tissue.

The chromosomal aberrations are summarized in Table 1. Numerical aberrations were detected in 15 of 19 specimens (79%), the most common being gain of chromosomes 7 and 17 which was observed in 8 of 19 (42%) cases. Monosomy 9 was the less frequent change, observed in 32% of the cases (4 TCC and 2 cystitis) whereas, trisomy and tetrasomy of chromosome 9 were present in 6 other samples (5 TCC and 1 normal urothelium). Figure 1 (A-F) illustrates some chromosome aberrations.

Two carcinomas, an invasive grade IV TCC (TCC13) and an invasive primary UAC (UAC14), exhibited trisomy and tetrasomy for chromosomes 7, 9 and 17 suggesting that the cells were polyploidy. Dual-color FISH assays performed in the samples TCC13, UAC14 and MNU01 using centromeric probes of the chromosomes 7 and 9, or 9 and 17 detected 8 fluorescent spots in more than 50% of the ana-

lyzed nuclei, reinforcing the occurrence of tetraploidy. The normal control MNU01, taken from a macroscopically normal bladder site of patient TCC13, showed the same numerical alterations as the tumoral tissue. In additional one normal urothelium sample (MNU02) biopsied from patient TCC07, presented trisomy 7, while in other normal sample (MNU03) biopsied from patient TCC13, numerical aberrations were not observed.

Table 1. Distribution of numerical aberrations in bladder carcinoma, cystitis, and normal bladder tissue samples.

Case	Histopathologic Diagnosis (Grade)	Sex/Age (years)	Other Information	Aneuploidies		
				7	9	17
Carcinomas						
CC 01	TCC (I)	M/82	Primary			
CC 02	TCC (I)	M/64	1° rec			
CC 03	TCC (I)	M/62	4° rec	Tris, Tetras		Tris
CC 04	TCC (I)	M/65	Primary		Monos	Tris
CC 05	TCC (I)	M/83	3° rec		Monos	Tris, Tetras
CC 06	TCC (II)	F/77	1° rec, invasive	Tris		
CC 07	TCC (II)	F/52	Primary	Tris	Tris, Tetras	Tris
CC 08	TCC (II)	F/69	Primary, invasive		Monos	
CC 09	TCC (II)	M/69	4° rec, invasive		Tris, Tetras	
CC 10	TCC (II)	F/51	1° rec			
CC 11	TCC (III)	M/67	Primary, invasive	Tris, Tetras	Tris, Tetras	Tris
CC 12	TCC (IV)	M/75	Primary, invasive		Monos	
CC 13	TCC (IV)	M/62	Primary, invasive	Tris, Tetras	Tris, Tetras	Tris, Tetras
UAC 14	UAC	M/71	Primary, invasive	Tris, Tetras	Tris, Tetras	Tris, Tetras
Cystitis						
UCC 01	UCC	M/68	1° rec		Monos	
UCC 02	UCC	F/62	4° rec		Monos	
Normal bladder						
MNU 01		M/65		Tris, Tetras	Tris, Tetras	Tris, Tetras
MNU 02		F/52		Tris		
MNU 03		M/62				

TCC=transitional cell carcinoma; UAC=undifferentiated anaplasic carcinoma; UCC=unspecific chronic cystitis; MNU=macroscopically normal bladder; rec=recurrence; monos= nonosomy; tris=trisomy; tetras=tetrasomy.

Figure 1. Interphase nuclei disaggregated from bladder carcinomas showing (A) trisomy of chromosome 7 (UAC14), (B) trisomy and tetrasomy of chromosome 17 (TCC13), (C) monosomy of chromosome 9 (TCC12), (D) tetrasomy of chromosome 9 (TCC13), (E) and (F) MNU01, respectively, showing tetrasomy 9 and 7 in the same nucleus. Arrows point the nuclei with aneuploidies.



DISCUSSION

Although peripheral blood lymphocytes constitute a good system for cytogenetic analyses, our study showed that bladder exfoliated cells obtained after urinary sedimentation from healthy young people constitute a simple and non-invasive system for FISH analysis. Fresh collected urine exfoliated cells represent an advantage over normal cells collected through invasive methodology as bladder irrigation[9] or formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.[3]

In the present study, nuclei isolated of fresh tissue of bladder carcinoma, cystitis and macroscopically normal urothelium showed mainly trisomies 7 and 17, and monosomy 9. Monosomy 9 was less frequent and occurred in 32% of the samples, mainly lower grade tumors (I and II) and cystitis. These results do not exclude partial chromosome 9 loss as a frequent event, since a pericentromeric probe was used. Linn et al.10 also detected low frequency of monosomy 9 in TCC. However, when gene-specific probes were used for chromosome loci (9q22 and 9p21), deletions on 9p and 9q were found in majority of urothelial carcinoma. Some early superficial papillary tumors showed deletion of chromosome 9p without deletion of 9q, suggesting 9p deletions as a very early event in the development of papillary urothelial carcinoma.[11] Loss of chromosome 9 in TCC patients was related with high risk of recurrence and possible progression. Thus, the detection of this alteration in early tumor stage may be used as marker of poor prognosis.[3] Trisomy and tetrasomy 9 was also evident in 32% of samples, frequently observed together with trisomy/tetrasomy 7 and 17. These cases consisted mainly of high grade, invasive primary tumors, thus suggesting an association of these polysomies with high-grade bladder carcinomas. Eleuteri et al.[12] reported trisomy 9 in bladder TCC associated with high grade and hyperploidy evaluated by flow cytometry, while monosomy 9 was prevalent in diploid or near-diploid cases and had no relationship with histological grade.

The most common chromosomes abnormalities in our samples were trisomy and/or

tetrasomy 7 and 17, occurring in 42% of cases. Trisomy 7 jointly with monosomy 9 are considered early chromosome changes in bladder cancer.[3,4,13] Pycha et al.[4] described high frequency of trisomy 7 in bladder cancer related with advanced clinical stages corroborating other studies that associated this alteration with progression of lower to higher grade lesions, and with tumoral recurrence.[3] Chromosome 7 harbors the gene encoding the EGF-R related with regulation of cell growth. In TCC, the overexpression of this gene has been associated with an increased rate and short time recurrence.[3] However, trisomy 7 as the sole clonal chromosomal aberration has been reported in a wide variety of tumors,[14] as well as in macroscopically normal tissue adjacent to solid tumors[15] and non-neoplastic lesions.[16] Thus, the importance of a solitary trisomy 7 as a neoplasia-associated change has been questioned for a long time.

Trisomy of chromosome 17 is a frequent event in bladder tumors and also was observed in 42% of the samples in our study, jointly with aneuploidy of the chromosomes 7 and 9, indicating its later participation in bladder carcinogenesis. Some studies related this abnormality with an increased risk of tumoral recurrence and progression,[15,17] which associated polysomy 17 with invasive tumors and advanced stage. Molecular studies have indicated gain in 17q11-q25, maybe related with the oncogene c-ERBB-2 (Her-2/neu) mapped at 17q12-21. This oncogene codes for a receptor protein p185, with partial homology to the EGF-R protein. In bladder cancer, both Her-2/neu gene amplification and protein overexpression are observed in higher stages and nodal metastasis, which highlight this gene as a potential tumor marker.[18,19]

Halling et al.[6] evaluated urine specimens of patients with a history of urothelial carcinoma by multi-color FISH with centromeric probes to chromosomes 3, 7 and 17, and 9p21 locus. FISH assay demonstrated high sensitivity and specificity for the detection of urothelial carcinoma by presence of polisomic cells.

In addition, we detected anomalies in chromosomes 7, 9, and 17 in macroscopically normal bladder tissue biopsied from the patients with bladder carcinomas. One of three samples (MNU01) of the normal bladder presented the same chromosomal changes observed in the primary TCC (TCC13). The patient had resected the entire bladder, device tumoral multicentricity. Frequent recurrences and a tendency for multicentricity are characteristic features of bladder tumors, suggesting that bladder cancer is a field disease involving the entire urothelium. Anomalies of the surrounding urothelium may therefore be highly relevant to patient prognosis. Hartmann et al.[15] observed genetic changes in urothelial hyperplasias and normal urothelium in patients with papillary bladder cancer. Therefore, genetic investigations of normal urothelium biopsies in bladder cancer patients could provide insights into the primary alterations of bladder carcinogenesis. Our findings also demonstrated that apparently normal urothelium tissue of patients with tumor history do not constitute adequate negative control samples in genetic studies.

High grade TCC samples (III and IV) had higher frequency of trisomy and tetrasomy of chromosomes 7, 9, and 17 in comparison with low grade (I and II), evidencing chromosome instability. The samples TCC13 and UAC14 showed increased frequencies of polysomies 7, 9, and 17, suggesting tetraploidy (4n) that was corroborated by the dual-color FISH assays. These abnormalities are consistent with the tumor progression model, in which the polyploidy occurs as a late event in carcinogenesis.

Chromosomal evaluations in cystitis are rare. The present study found aneuploidy of chromosome 9 in the unspecific chronic cystitis samples from patients with prior history of bladder TCC. Ghaleb et al.[20] observed numerical aberrations of chromosomes 9 and 17 in urothelium of patients with bilharzial cystitis, therefore monosomy 9 may be an early chromosomal change and a predictor of incipient carcinoma in patients with this condition.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Marileila Varella-Garcia for kindly providing the chromosomes 7 and 17 probes, and Dr. Andrea BC Salles for technical assistance. The study was sponsored by the Brazilian Agencies CNPq and CAPES.

CONCLUSIONS

This study strengthens a role for chromosomes 7, 9 and 17 in urothelial carcinogenesis. In conjunction with the literature, it is possible to postulate that anomalies in chromosomes 7 and 9 are related to the initiation process and in chromosome 17 with tumoral progression and recurrence. Thus, interphase FISH using probes targeting these chromosomes may be indicated for early diagnosis in patients at risk of disease and for follow-up in cases of recurrence and metastase.

REFERENCES

1. American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fundation food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Res Fund 1997;1:342-400.
2. Richter J, Beffa L, Wagner URS, Schraml P, Gasser TC, Moch H, et al. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1998;153:1615-21.
3. Bartlett JM, Watters AD, Ballantyne AS, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional all carcinoma of the urinary bladder? Br J Cancer 1998;77:2193-8.
4. Pycha A, Mian C, Posch B. Numerical aberrations of chromosome 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study performed by fluorescence in situ hybridization. J Urol 1998;160:734-40.
5. Kontogeorgos G, Aninos D. Recent aspects in the diagnosis and prognosis of bladder cancer. Tumori 1998;84:301-7.
6. Halling KC, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. J Urol 2000;164:1768-75.
7. Mostofi F. Histological typing of urinary bladder tumours. Geneva: World Health Organization; 1973.
8. Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. Mutat Res 1995;348:153-62.
9. Reeder JE, Connell MJ, Yang Z, Morreale JF, Collins L, Frank IN, et al. DNA cytometry and chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridization of irrigation specimens from bladder cancer patients. Urology 1998;51:58-61.
10. Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. J Urol 1998;159:1493-6.
11. Hartmann A, Rosner U, Schlake G, Dietmaier W, Zaak D, Hofstaedter F, et al. Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletions analysis. Lab Invest 2000;80:709-18.
12. Eleuteri P, Grollino MG, Pomponi D, Guaglianone S, Gallucci M, De Vita R. Bladder transitional cell carcinomas: a comparative study of washing and tumor bioptic samples by DNA flow cytometry and FISH analysis. Eur Urol 2000;37:275-80.
13. Adv SM, Khaled HM. Chromosomal aberrations in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1999;114:62-7.
14. Barril N, Salles ABCF, Tajara EH. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1999;114:162-4.
15. Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. Am J Pathol 1999;154(3):721-7.
16. Roca F, Pérez-Gomez JÁ, Cigedosa JC, Gómez E, Estévez M. Genetic heterogeneity of benign thyroid lesions static and flow cytometry karyotyping and in situ hybridization analysis. Ann Cell Pathol 1998;16:101-10.
17. Neuhaus M, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R, et al. Polysomies but no Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. Hum Pathol 1999;30:81-6.
18. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. Clin Cancer Res 1999;5:1966-75.
19. Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S, Takase K, Matsuzaki J, Moryiama M, et al. C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. Urology 2000;55:679-83.
20. Ghaleb AH, Pizzolo JG, Melamed MR. Aberrations of chromosomes 9 and 17 in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. Am J Clin Pathol 1996;106:234-41.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

6. A ACALASIA E O CÂNCER ESOFÁGICO

GENÉTICA

Acalasia e Câncer Esofágico

FERNANDA DA SILVA MANOEL
Mestranda do Programa de Pós-graduação em Genética do Ibilce/Unesp — "Campus" de São José do Rio Preto-SP.

ELOIZA HELENA TAJARA
ANA ELIZABETE SILVA
Professoras doutoras do Departamento de Biologia e Programa de Pós-graduação em Genética do Ibilce/Unesp — "Campus" de São José do Rio Preto-SP.

RESUMO

A acalasia pode surgir na doença de Chagas, na qual uma infecção parasítica pode danificar o plexo mioentérico do esôfago e resultar em megaesôfago. O aspecto mais sério dessa condição é o risco de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas. Nesse carcinoma já foram descritas diferentes alterações gênicas e cromossômicas. Por outro lado, nenhuma análise citogenética molecular foi empregada nos estudos de megaesôfago chagásico. Essa abordagem pode levar a um diagnóstico mais apropriado das neoplasias esofágicas e à compreensão da tumorigênese associada a agentes infecciosos e inflamação epitelial.

Unitermos: *Acalasia; carcinoma de células escamosas esofágicas; citogenética molecular; doença de Chagas.*

SUMMARY

The achalasia may rise in Chagas' disease, in which a parasitic infection may damage the myenteric plexus of the esophagus and result in megaesophagus. The most serious aspect of this condition is the hazard of developing squamous cell carcinoma. Esophageal squamous cell carcinomas exhibit many chromosome and genic abnormalities. Otherwise, no molecular cytogenetic analysis have yet been employed in chagasic mega esophagus studies. This approach may lead to a more appropriate diagnosis of esophageal neoplasm and understanding of tumorigenesis associated with infectious agents and epithelial inflammation.

Key words: *Achalasia; esophageal squamous cell carcinoma; molecular cytogenetics; Chagas' disease.*

A acalasia, anteriormente denominada "cardioespasmo", é um distúrbio motor caracterizado pela ausência de peristalse no corpo do esôfago, aumento do tônus basal e relaxamento incompleto ou parcial do esfíncter esofágico inferior. A conseqüência imediata é a retenção dos alimentos no interior do órgão, o que leva à sua hipertrofia e dilatação. O sintoma clínico clássico é a dificuldade na deglutição, podendo às vezes ocorrer regurgitação e aspiração noturnas do alimento retido (1). O diagnóstico geralmente é feito através de exames radiográficos e de manometria, cujos resultados revelam diâmetro aumentado do corpo esofágico inferior, tortuosidade do canal, espasmo da junção gastroesofágica e, em estágios iniciais, pressão elevada no esfíncter inferior e no corpo esofágico. Em fases mais avançadas o órgão se encontra geralmente dilatado, porem menos provavelmente obstruído por alimento, e a amplitude de contrações simultâneas está diminuída (2).

A etiologia da acalasia primária é, na maioria das vezes, pobremente compreendida. Existem evidências de perda ou ausência de células ganglionares mioentéricas na região do esfíncter inferior, o que explicaria a dilatação progressiva do esôfago (1). Essa injúria do sistema nervoso autônomo parece ter uma etiologia inflamatória, provavelmente auto-imune, considerando-se que a degeneração e a perda significativa de fibras nervosas estão associadas a um infiltrado de linfócitos T ao redor do plexo mioentérico em 90% dos casos estudados (3). A favor da origem auto-imune e também da participação de fatores genéticos no desenvolvimento da acalasia estão os dados sobre freqüência elevada em afetados por certos antígenos leucocitários humanos de classe II, como os dois heterodímeros HLA-DQαβ codificados pelo alelo DQA1*0101 e os produtos dos alelos DQB1*0602 e DRB1*15 (4, 5). A acalasia familial é muito rara e parece ser transmitida como característica autossômica recessiva (6). Sua ocorrência em gêmeos monozigóticos já foi descrita e reforça o papel de fatores genéticos na sua etiologia (7).

Na América Latina descreve-se um outro tipo de acalasia, denominada secundária, que compreende um dos principais distúrbios observados em pacientes chagásicos crônicos (8). Na fase aguda da doença de Chagas o *Trypanosoma cruzi* pode parasitar as células ganglionares do plexo mioentérico presentes no esfíncter esofágico inferior e liberar, no espaço intercelular, as formas amastigota, epimastigota ou

Acalasia e Câncer Esofágico

tripomastigota do parasita, além de organelas da célula hospedeira, o que desencadeia um processo inflamatório local como resultado da resposta imune (9).

Os componentes liberados formam uma rede envolvendo cada célula muscular e interferem na transmissão do impulso nervoso. Em conseqüência, a coordenação motora do esôfago é lesada, causando dificuldades na deglutição (8) e, após 10 a 20 anos, megaesôfago, que é observado em 20% a 30% dos pacientes (9).

Análises moleculares do cinetoplasto do parasita revelam que populações geneticamente diversas do tripanossoma mostram diferentes distribuições teciduais no hospedeiro, sugerindo que essa variabilidade é um dos fatores determinantes do órgão-alvo e, portanto, da forma da doença (10).

Tem sido observada uma associação significativa de auto-anticorpos contra os receptores colinérgicos muscarínicos da acetilcolina com a acalasia chagásica, mas não com a forma idiopática. Tais anticorpos, induzidos pela infecção por *T. cruzi*, aumentam a atividade contrátil do músculo liso do esôfago inferior após estimulação específica do receptor da acetilcolina, o que pode prejudicar o relaxamento normal do esfíncter inferior (11).

O aspecto mais sério da acalasia é o risco aumentado (2%-7%) de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do esôfago, especialmente quando a doença tem mais de 20 anos de evolução e os pacientes exibem esôfago aumentado e marcada retenção de alimentos (12). Esse tipo de câncer acomete os afetados em idade anterior àquela observada na população geral (1).

Nesses casos o câncer tem geralmente um diagnóstico tardio, em função da presença do megaesôfago e das manifestações crônicas que mascaram os sintomas do processo neoplásico (12). Ocorre, em geral, no terço médio do esôfago (13) e sua origem reside provavelmente na inflamação crônica do epitélio escamoso — causada pela retenção e estase de alimentos e por secreções (14).

Aproximadamente 50% dos tumores humanos, incluindo o câncer esofágico, apresentam mutações no gene *TP53*, um supressor tumoral localizado na região cromossômica 17p13. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos, denominada p53, que funciona como um fator de transcrição tetramérico responsável pela ativação de genes envolvidos no controle do ciclo celular e na apoptose (15).

A proteína p53 normal tem vida média curta, ao contrário da forma mutante que se acumula no núcleo e, por isso, pode ser detectada por técnicas imuno-histoquímicas (15). Imunomarcação positiva para essa proteína já foi detectada em lesões esofágicas não-cancerosas, tais como hiperplasia de célula basal e displasia, e em carcinoma *in situ* e carcinoma de células escamosas, refletindo a presença de mutação do gene nesses tumores (16). Também já foi observada em células normais do esôfago de pacientes com acalasia chagásica e neoplasia desse órgão (17), o que pode significar sua relação com o início do processo de malignização nesses casos.

Acalasia, anteriormente denominada "cardioespasmo", é um distúrbio motor caracterizado pela ausência de peristalse no corpo do esôfago, aumento do tônus basal e relaxamento incompleto ou parcial do esfíncter esofágico inferior. A conseqüência imediata é a retenção dos alimentos no interior do órgão, o que leva à sua hipertrofia e dilatação. O sintoma clínico clássico é a dificuldade na deglutição, podendo às vezes ocorrer regurgitação e aspiração noturnas do alimento retido

Em carcinoma de células escamosas já foram identificadas alterações numéricas e estruturais de praticamente todos os cromossomos. Também já foram identificados rearranjos de algumas regiões cromossômicas que abrigam genes importantes para a carcinogênese do esôfago, como 11q13 (*CCND1/PRAD1*), 7p11-15 (*EGF-R*), 7q21.1 (*HGA*), 7q31 (*HGF-R*), 9p21 (*MST1/CDKN2*), 11p (*WT1*), 13q (*RB*) e 17p (*TP53*) (18).

A amplificação do oncogene *ciclina D1* (*CCND1/PRAD1*) parece ter um papel fundamental na progressão do carcinoma de células escamosas do esôfago e está relacionada com prognóstico ruim e sobrevida reduzida. Tal amplificação foi observada em 65% dos casos avaliados pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (19). Do mesmo modo, a expressão elevada da proteína ciclina D1 já foi detectada em uma porcentagem significativa de amostras analisadas por imuno-histoquímica. Esse proteína participa do controle de proliferação e diferenciação celulares e existem indicações de que sua expressão aumentada, causada por rearranjos cromossômicos ou amplificação gênica, está envolvida na transformação maligna das células (20).

As abordagens de citogenética molecular para investigar deleções e ganhos de segmentos cromossômicos ainda não foram utilizadas no estudo do megaesôfago chagásico, exceto a recente investigação da proteína p53 por imuno-histoquímica, citada anteriormente. É possível que seus resultados possam auxiliar na detecção precoce e avaliação prognóstica das neoplasias que acometem o esôfago e também servir de base para o esclarecimento da tumorigênese relacionada com a inflamação do epitélio e com agentes infecciosos, tais como o *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

1. COTRAN, R.S.; KUMAR, V. & COLLINS, T. — *Pathologic basis of disease*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1998. 1425p.
2. SHEINO, Y.; HOUGHTON, S.G. *et al.* — Manometric and radiographic verification of esophageal body decompensation for patients with achalasia. *J. Am. Coll. Surg.*, 189: 158-63, 1999.
3. RAYMOND, L.; LACH, B. & SHAMJI, F.M. — Inflammatory aetiology of primary

Obs.: As 18 referências restantes que compõem este artigo se encontram na Redação à disposição dos interessados.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

PROF. DRA. ELOIZA HELENA TAJARA
Depto de Biologia IBILCE/UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265
15054-000 — São José do Rio Preto-SP
E-mail: tajara@bio.ibilce.unesp.br

7. CYTOGENETIC ALTERATIONS IN CHAGASIC ACHALASIA COMPARED WITH ESOPHAGEAL CARCINOMA

ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics 149 (2004) 17–22

CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS

Cytogenetic alterations in chagasic achalasia compared to esophageal carcinoma

Fernanda da Silva Manoel-Caetano[a], Aldenis Albaneze Borim[b], Alaor Caetano[b], Patrícia Maluf Cury[b], Ana Elizabete Silva[a,*]

[a]*Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista–Campus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265 15054-000–São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

[b]*Hospital de Base, Faculdade de Medicina, de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

Received 25 April 2003; received in revised form 3 June 2003; accepted 13 June 2003

Abstract Patients with chagasic achalasia (megaesophagus) are liable to have an additional 1.7–20% possibility of developing esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). We applied a fluorescence in situ hybridization technique in 20 such patients and found aneuploidies of chromosomes 7, 11, and 17 in 60% (12 of 20 specimens) and deletion of the *TP53* gene in 54.5% (6 of 11 specimens; it was only possible to obtain data by FISH technique from 11 of the 20 achalasia patients). The main aneuploidies detected were chromosome 7 monosomy or trisomy (35%) in mid-third megaesophagus cases, and chromosome 17 monosomy or trisomy (25%) in distal-third cases. *TP53* gene deletion was more frequent in mid-third (62.5%) than in distal-third megaesophagus cases (40%). In chagasic megaesophagus, no amplification of the cyclin D1 gene (*CCND1*) was observed. Comparing chagasic megaesophagus to ESCC, we found a higher frequency of aneuploidies in all 10 tumors. The main alterations were trisomy or tetrasomy of chromosomes 17 (90%), 11 (70%), and 7 (70%). Amplification of *CCND1* was evidenced as a cluster in 70% of the tumors (22–99% of nuclei), while *TP53* gene deletion occurred in 100%. To our knowledge, this is the first cytogenetic analysis of chagasic megaesophagus to show that aneuploidies of chromosomes 7, 11, and 17, and *TP53* gene deletion might be related to increased risk for malignancy. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Achalasia is a motor disorder of the esophagus, characterized by lack of primary peristalsis and failure of the lower esophageal sphincter relaxation. Idiopathic achalasia is poorly understood, but it is thought to produce morphologic changes, such as loss of ganglion cells and destruction of the myenteric nerves [1]. In Brazil, achalasia was sometimes found to occur in Chagas disease (chagasic achalasia), in which the protozoon *Trypanosoma cruzi* causes destruction of the myenteric plexus of the esophagus, followed by esophagus dilatation (chagasic megaesophagus). Megaesophagus arises in ~3% of patients chronically infected with *T. cruzi* [2]. Currently, Chagas disease is considered eradicated in the state of São Paulo, but a significant number of individuals still present with this chronic disease [3].

The most worrying complication of achalasia is the development of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), which occurs in 1.7%–20% of patients and affects them at an earlier age than those without this disease [4,5]. The development of ESCC is thought to be a consequence of chronic inflammation of the squamous epithelium (chronic esophagitis), caused by retention and stasis of food and secretions [6]. Since patients with long-standing achalasia and dysphagia do not show any symptomatic change in their original disease, esophageal tumors are often detected in advanced stages, resulting in poor prognosis [7].

Molecular cytogenetic analyses performed in esophageal cancer have revealed numeric chromosome abnormalities [8–10]. In addition, several genes normally involved in the positive and negative control of cell growth and regulatory pathways, such as *APC/MCC* (5q21), *EGFR* (7p12~p13), *MYC* (8q24), *MTS1/CDKN2* (9p22), *CCND1* (11q13), *RB1* (13q14), *TP53* (17p13), and *HER-2/neu* (17q21), have been found to be altered in esophageal cancer; see reviews [11,12].

TP53 mutations occur as an early event in ESCC [13,14]. *CCND1* overexpression starts early in the dysplasia [15] and

* Corresponding author. Tel.: +55-17-221-2384; fax: +55-17-221-2390.

E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br (A.E. Silva).

0165-4608/04/$ – see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/S0165-4608(03)00274-7

has been found, along with gene amplification, in 16–71% of ESCC cases [16–19]; it is associated with distant organ metastasis [20] and a poor prognosis [21].

To our knowledge, no report on aneusomies or other chromosomal abnormalities in patients with chagasic achalasia has so far raised the hypothesis that these alterations might be useful as chromosome markers to evaluate an increased risk for malignancy. *TP53* overexpression, however, has been related to primary achalasia [7,22,23], to achalasia associated with squamous cell carcinoma [4], and to sections of developing tumors in patients with achalasia caused by Chagas disease [7].

The purpose of this study was to investigate, using a fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, the occurrence of aneusomies involving chromosomes 7, 11, and 17, deletion of *TP53*, and amplification of *CCND1* in interphase nuclei of cancer-free chagasic achalasia patients and to compare the results with those obtained for ESCC.

2. Materials and methods

A total of 40 specimens were obtained immediately after endoscopic evaluation through biopsy of the middle and distal esophageal regions of 20 patients (10 males and 10 females) diagnosed with tumor-free chagasic achalasia. The mean age of these patients was 61 years (range 37–80 years). According to contrast retention, diameter, contractile activity, tonicity of the lower segment, and extension of the megaesophagus [24], the 20 cases were divided into four dilatation groups: grade I (6 cases), grade II (6 cases), grade III (4 cases), and grade IV (4 cases). Fresh tumor tissue was obtained after surgical resection from 10 patients diagnosed with ESCC (8 males and 2 females). The mean age of these patients was 63 years (range 48–79 years). All specimens were collected prior to radiation and chemotherapy.

As controls, we used biopsies obtained from both the middle and distal third of histopathologically normal esophageal mucosa from six younger individuals (mean age 27 years; range 15–39 years) who had undergone endoscopic evaluation for benign gastric lesions.

Written informed consents were obtained from all patients; this work was approved by the National Research Ethics Committee.

All samples were mechanically and enzymatically disaggregated. The resulting cell suspension was dropped onto microscope slides, which were stored at −70°C until use for FISH assay.

FISH studies were performed on interphase nuclei, using centromere probes (CEP) directly labeled with SpectrumGreen (Vysis, Downers Grove, IL) for chromosome 7, 11, and 17 enumeration. Dual-color FISH assays were performed using cyclin D1 and p53 probe kits (Vysis), including the LSI Cyclin D1 sequence labeled in SpectrumOrange (with the chromosome 11 centromere sequence labeled in SpectrumGreen) and the LSI P53 sequence labeled in SpectrumOrange (with the centromere probe for chromosome 17 labeled in SpectrumGreen). The FISH procedure was performed according to the manufacturer's instructions.

For each probe, two independent observers evaluated the signals produced by ~300 nuclei, according to the criteria described by Eastmond et al. [25]. Cutoff levels for aneusomies were based on the upper-limit mean plus four standard deviations (+4 SD) of the normal esophageal mucosa biopsies. The middle and distal regions of the esophagus were considered jointly, since no statistically significant difference was observed regarding the frequencies of nuclei with one, two, or three signals of the evaluated chromosomes. Thus, for monosomy of chromosomes 7, 11, and 17, the cutoff values were set at 7.0%, 9.0%, and 7.5%, respectively; for trisomy of the same three chromosomes, the cutoff values were 5.0%, 3.0%, and 3.0%, respectively. The cutoff value for tetrasomy was set at a uniform 2.0% for all three chromosomes 7, 11, and 17.

The *TP53* gene scores were taken together with those of the chromosome 17 centromere, and the *CCND1* gene scores with those of the chromosome 11 centromere. For analysis of the *TP53* gene deletion, the gene-to-chromosome (G/C) ratio was calculated for each case; that is, the total number of gene signals observed was divided by the total number of chromosome signals. In the control group (normal esophageal mucosa), the ratio observed was 1.0 (balanced); in the cases that showed a ratio of less than or equal to 0.9, gene deletion was assumed. For *CCND1* gene amplification, ratios between 0.9 and 1.0 (balanced) were observed in the control group. The cases showing ratios between 1.1 and 2.0 were assumed to have preferential gene gain, but no amplification, since these values could result from cells in phase G2, with three or four signals [26]. Cases with a ratio greater than 2.0 or with clusters (groups of many copies of the gene) were considered as having true gene amplification [27].

Statistical analysis of the data was performed with the χ^2 test, to compare the association between clinicopathologic factors and aneusomies in the group with chagasic achalasia. Values of P less than 0.05 were considered significant.

3. Results

The cases with aneusomies of chromosomes 7, 11, and 17 (values above cutoff), deletion of the *TP53* gene, and amplification of the *CCND1* gene are summarized in Tables 1 and 2, for the groups with chagasic achalasia and ESCC, respectively. In chagasic achalasia, 12 of the 20 cases (60%) showed aneusomy of at least one of the chromosomes (7, 11, or 17). Of the chagasic achalasia cases, 8 of 20 (40%) came from biopsies of the middle third and 7 of 20 (35%) came from biopsies of the distal third.

In the middle third of the megaesophagus, the major findings were chromosome 7 monosomy and trisomy in 6 of 20 cases (30%); in the distal third, the major findings were chromosome 17 monosomy and trisomy in 5 of 20 cases (25%).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Table 1
Aneusomies of chromosomes 7, 11, and 17, *TP53* deletion, *CCND1* gene amplification, and clinicopathologic data in cases of middle- and distal-third megaesophagus

	Middle third					Distal third							
	Aneusomy			*TP53* deletion	*CCND1* amplification	Aneusomy			*TP53* deletion	*CCND1* amplification	Sex/age	Tobacco/alcohol	
Case/grade	7	11	17	G/C ≤ 0.9	G/C > 2.0	7	11	17	G/C ≤ 0.9	G/C > 2.0	(yr)	use	Other information
M1/I	Mono		Tri	0.8	0.9			Tri, Tetra		1.0	M/79	Ex/−	Intestinal constipation; stenosis of the esophagus; death
M2/I				0.9	1.0				0.9	1.0	F/69	+/−	Gastritis; enanthematosis
M3/I				1.0	1.0	Tri			1.0	1.0	M/65	+/−	n/a
M5/I				0.9	1.0				0.9	1.0	F/66	−/−	Gastritis; death
M6/I				0.9	0.9				1.0	1.0	F/50	+/−	Intestinal constipation
M7/II					0.9			Mono		0.9	M/80	+/Ex	
M8/II	Mono				1.0					1.0	F/38	+/−	
M9/II			Mono		0.9			Mono, Tri		1.0	M/76	Ex/Ex	Chronic gastritis; intestinal metaplasia
M10/II									1.0		M/54	Ex/Ex	
M13/III	Tri			1.0	1.0	Tri			1.0	1.0	F/58	−/−	Intestinal constipation; gastroesophageal reflux
M14/III	Mono			1.0	0.9				1.0	1.0	M/57	Ex/Ex	Chronic gastritis
M15/III	Tri				0.9					1.0	M/37	+/−	Megacolon
M16/III									1.0		M/58	+/Ex	Chronic gastritis; intestinal metaplasia
M17/IV					0.9			Tri		1.0	F/69	+/−	
M18/IV				0.9	1.0		Tri	Tri	0.9	1.1	M/66	Ex/−	Chronic gastritis
M19/IV	Tri				1.0					1.0	F/77	−/−	Megacolon; death
M20/IV		Mono			1.2				0.9	1.0	F/55	Ex/−	Chronic gastritis

Abbreviations: Ex, ex-smoker or ex-drinker; G/C, gene-to-chromosome ratio; Mono, monosomy; n/a, data not available; Tetra, tetrasomy; Tri, trisomy; +, smoker or drinker; −, never smoker or never drinker.

The χ^2 test did not show any association between clinicopathologic factors (including age, sex, smoking, drinking, dilatation grade of the megaesophagus, and death) and the occurrence of these aneusomies.

TP53 gene deletion was observed in 5 (62.5%) of the 8 cases of mid-third megaesophagus, and in 4 (40%) of the 10 distal-third cases. In these nine cases, the G/C ratio ranged between 0.8 and 0.9. In three of these cases (M2/I, M5/I,

Table 2
Aneusomies of chromosomes 7, 11, and 17, *TP53* deletion, *CCND1* gene amplification, and clinicopathologic data in ESCC cases

	Aneusomy			*TP53* deletion G/C	*CCND1* amplification	Sex/age	Tobacco/alcohol	Location in the		Other
Case	7	11	17	≤ 0.9	G/C > 2.0	(yr)	use	esophagus	Differentiation	information
ESCC-1	Tri	Tri		0.8	8.9/C	M/64	Ex/Ex	DT	MID	Death
ESCC-2	Tri, Tetra		Tri, Tetra	0.5	8.4/C	M/63	NA	NA	NA	NA
ESCC-3	Tri, Tetra	Tri, Tetra	Tri, Tetra	0.5	2.2/C	M/55	+/+	DT	MID	
ESCC-4	Tri, Tetra	Tri, Tetra	Tri, Tetra	0.5	1.0	M/65	Ex/Ex	DT	MID	
ESCC-5	Tri, Tetra	Tri, Tetra	Tri, Tetra	0.9	4.2/C	M/48	+/−	MT	MID	Metastasis; death
ESCC-6			Tri, Tetra	0.8	4.7/C	M/58	+/Ex	MT	MID	Chagasic; death
ESCC-7	Tri, Tetra	Tri, Tetra	Tri, Tetra	0.9	9.3/C	M/58	+/+	MT	MD	Metastasis; recurrence
ESCC-8	Tri	Tri, Tetra	Tri, Tetra	0.5	1.0	F/74	+/Ex	MT	MID	Chagasic; recurrence
ESCC-9		Tri	Tri	0.9	9.5/C	M/63	+/−	MT	PD	
ESCC-10			Tri	0.8	1.0	F/79	+/−	DT	NA	Death

Abbreviations: C, cluster; DT, distal third; Ex, ex-smoker or ex-drinker; G/C, gene-to-chromosome ratio; MD, moderately differentiated; MID, moderately invasive differentiated; MT, middle third; NA, data not available; PD, poorly differentiated; Tetra, tetrasomy; Tri, trisomy; +, smoker or drinker; −, never smoker or never drinker.

unesp

and M18/IV), the deletion was observed in both the middle and the distal third. Regarding alterations in the *CCND1* gene, none of the megaesophagus cases presented *CCND1* amplification; however, ratios of 1.1 and 1.2 were observed in two cases (M18/IV, M20/IV). These results indicate a preferential *CCND1* gene gain, due to a higher frequency of nuclei with three to seven copies of this gene and one or two copies of the chromosome 11 centromere.

All tumor samples showed aneusomies involving chromosomes 7, 11, and 17. The main alterations were chromosome 17 trisomy or tetrasomy, found in 9 of 10 (90%) cases. Five samples (50%) showed trisomy or tetrasomy involving the three chromosomes investigated.

Regarding the *TP53* gene, all 10 tumors presented a G/C ratio equal or lower than 0.9, mainly due to the absence of one (27.9% of nuclei) or two (6.3% of nuclei) gene signals (data not shown), indicating deletion of the *TP53* gene. Amplification of the *CCND1* gene was observed in 70% (7 of 10) of the cases, with G/C ratios ranging from 2.2 to 9.5 and with 22%–99% of the nuclei showing clustered gene signals.

4. Discussion

There are various genetic studies in the literature on esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), but none on chagasic megaesophagus. Such studies are of special relevance for Brazil and the rest of Latin America, where this disorder is directly associated with Chagas disease [2]. Patients with long-standing achalasia are also liable to develop ESCC, their risk being 7 to 140 times higher than that of the normal population [5,28].

Genetic alterations associated with the development of ESCC occur early in the progression of normal esophageal mucosa to neoplasia. This process starts with basal cell hyperplasia (*TP53* mutations) and evolves to low- and high-degree dysplasia (*TP53* mutations; 3p21.3 and 9q31 allelic loss), leading to squamous cell carcinoma (*TP53* and *CDKN2A* [alias *P16*] mutations; multiple allelic losses; amplification or overexpression of *CCND1* and *EGFR*); see reviews [11,12].

In this study, we established the occurrence of chromosome 7, 11, and 17 aneusomies in 60% (12 of 20) of patients with chagasic achalasia and *TP53* gene deletion in 54.5% (6 of 11).

These aneusomies were predominant in grades III and IV. Only three patients showed the same aneusomy simultaneously affecting both the middle and the distal third of megaesophagus. These results emphasize the importance of investigating both megaesophagus regions. The middle third of the esophagus is the region with the highest occurrence of esophageal carcinoma [29], but, in our study, the proportion of aneusomies was the same in both the middle and the distal third.

Although aneuploidies of chromosomes 7, 11, and 17 have not yet been described in chagasic achalasia, they seem to occur during the early events of esophagus carcinogenesis [8,30]. Considering the middle and distal regions, the most frequent aneusomies in chagasic megaesophagus were trisomies of chromosomes 7 and 17.

In ESCC, trisomy or tetrasomy of chromosomes 17, 7, and 11 were frequent events. These chromosomes carry some important genes, such as *EGFR* (7p12~p13), *CCND1* (11q13), *TP53* (17p13), and *HER-2/neu* (17q21). These genes have been shown to be involved in the development and progression of esophageal carcinoma [9,31,32].

Deletion of the *TP53* gene was observed differentially in the two megaesophagus regions: it occurred in 5 of 8 (62.5%) of the mid-third samples and in 4 of 10 (40%) of the distal-third samples, mainly grade I. Even though they were not previously described in chagasic achalasia, such findings were expected, since alterations in this gene occur as an early event in the dysplasia–carcinoma sequence of esophageal tumorigenesis [21,33].

The inflammation of the esophageal mucosa present in chagasic megaesophagus patients seems to be associated with p53 protein alterations [7]. In achalasia associated with Chagas disease and in idiopathic achalasia, 44–91% of the cases showed overexpression of the p53 protein [7,21,22].

All patients with chagasic megaesophagus evaluated in our study exhibited chronic esophagitis, caused by food stasis reaching the two regions of the esophagus. The patients also mentioned exposure to alcohol and tobacco. Thus, inflammation of the mucosa, along with exposure to the carcinogenic agents of alcohol and tobacco, may confer a higher risk of developing squamous cell carcinoma.

All 10 tumor samples evaluated presented deletion of one or both *TP53* genes, regardless of the esophagus region. Most samples came from moderately differentiated tumors. Thus, our study stresses the participation of the *TP53* gene deletion as a common event in esophageal carcinogenesis.

Gene amplification is one of the most common mechanisms involved in the activation of oncogenes. In ESCC, the *CCND1* gene amplification detected by FISH [34] or molecular techniques [15,19,35] has been reported in 16–65% of the cases. We detected *CCND1* gene amplification as a group of several copies of this gene (termed cluster) associated with two, three or four chromosome 11 copies, in 7 of the 10 (70%) ESCC cases.

CCND1 gene amplification may play a role in the early stages of tumor development [36]. We did not observe *CCND1* gene amplification in chagasic achalasia samples, but a preferential gain of this gene occurred in two cases (M18/IV and M20/IV), represented by 3–7 copies of the *CCND1* gene in the presence of 1 or 2 copies of chromosome 11. Since this gain was observed in the most advanced grade of megaesophagus (grade IV), it might be indicative of the beginning of the amplification process that could be related to progression of the disease and could confer a higher risk of malignancy to these patients.

To date, none of our patients with megaesophagus has developed esophageal carcinoma, but two of them died due to



complications of Chagas disease and two other patients had a megaesophagus associated with megacolon.

In conclusion, FISH was effective in detection of cytogenetic abnormalities in patients with chagasic achalasia, showing it to be a useful tool for clinical monitoring; however, more studies aimed at establishing other genetic alterations in this type of esophagus lesion are indispensable to a better determination of the correlation between cytogenetic alterations and increased risk for cancer of the esophagus.

Acknowledgments

We thank Dr. Marileila Varella-Garcia for help with the FISH analysis, and observers Ana Cristina Gobbo César and Lucimari Bizari Di-Cézar for their help in the FISH scoring. This study was sponsored by the Brazilian Agency Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

References

[1] Shiino Y, Houghton SG, Filipi CJ, Awad ZT, Tomonaga T, Marsh RE. Manometric and radiographic verification of esophageal body decompensation for patients with achalasia. J Am Coll Surg 1999;189:158–63.

[2] Oliveira RB, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. Am J Gastroenterol 1998;93:884–9.

[3] Barbosa Franca S, Xavier de Abreu DM. Hospital morbidity for Chagas disease in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1996;29:109–15.

[4] Chino O, Kijima H, Shimada H, Nishi T, Tanaka H, Oshiba G, Kise Y, Kajiwara H, Tsuchida T, Tanaka M, Tajima T, Makuuchi H. Clinicopathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analyses of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. Anticancer Res 2000;20:3717–22.

[5] Brücher BLDM, Stein HJ, Bartels H, Feussner H, Siewert JR. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence, and prognosis. World J Surg 2001;25:745–9.

[6] Porschen R, Molsberger G, Kühn A, Sarbia M, Borchard F. Achalasia-associated squamous cell carcinoma of the esophagus: flow-cytometric and histological evaluation. Gastroenterology 1995;108:545–9.

[7] Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Sakai P, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Gama-Rodrigues J, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. Cancer Detect Prev 2000;24:13–23.

[8] Persons DL, Croughan WS, Borelli KA, Cherian R. Interphase cytogenetics of esophageal adenocarcinoma and precursor lesions. Cancer Genet Cytogenet 1998;106:11–7.

[9] Du Plessis L, Dietzsch E, Van Gele M, Van Roy N, Van Helden P, Parker MI, Mugwanya DK, De Groot MD, Marx MP, Kotze MJ, Speleman F. Mapping of novel regions of DNA gain and loss by comparative genomic hybridization in esophageal carcinoma in the Black and Colored populations of South Africa. Cancer Res 1999;59:1877–83.

[10] Struski S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. Cancer Genet Cytogenet 2002;135:63–90.

[11] Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. Int J Cancer 1996;69:225–35.

[12] Lu SH. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China. Mutat Res 2000;462:343–53.

[13] Hu N, Huang J, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Roth MJ, Wang C, Dawsey SM, Li G, Li WJ, Wang QH, Han XY, Ding T, Giffen C, Goldstein AM, Taylor PR. Frequent inactivation of the *TP53* gene in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk population in China. Clin Cancer Res 2001;7:883–91.

[14] Putz A, Hartmann AA, Fontes PR, Alexandre CO, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors. Int J Cancer 2002;98:99–105.

[15] Morgan RJ, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D. Amplification of cyclin D1 and *MDM-2* in esophageal carcinoma. Eur J Surg Oncol 1999;25:354–67.

[16] Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, Britton JA, Zhang Y, Schonberg JB, Roterdam H, Fabian I, Holt PR, Weinstein B. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. Hum Pathol 1999;30:1087–92.

[17] Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, Tsujinaka T, Yamamoto M, Inoue M, Yano M, Monden M. Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2000;16:261–6.

[18] Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, Kaibara N. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2001;127:531–6.

[19] Nakajima Y, Nagai K, Miyake S, Ohashi K, Kawano T, Iwai T. Evaluation of an indicator for lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma invading the submucosal layer. Jpn J Cancer Res 2002;93:305–12.

[20] Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, Tsuruta H, Terada M, Ueda M, Kitajima M. Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. Clin Cancer Res 1996;2:1155–61.

[21] Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, Ohashi K, Seto M, Shiku H, Nakamura S. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. Dig Dis Sci 2000;45:864–9.

[22] Bektas A, Yasa MH, Kuzu I, Dogan I, Ünal S, Örmeci N. Flow cytometric DNA analysis, and immunohistochemical p53, PCNA and histopathological study in primary achalasia: preliminary results. Hepatog-astroenterology 2001;48:408–12.

[23] Lehman MB, Clark SB, Ormsby AH, Rice TW, Richter JE, Goldblum JR. Squamous mucosal alterations in esophagectomy specimens from patients with end-stage achalasia. Am J Surg Pathol 2001;25:1413–8.

[24] Pinotti HW, Domene CE, Cecconello I, Zilberstein B. Chagasic megaesophagus. [in Portuguese]. In: Coelho JCU, editor. Aparelho digestivo [The digestive system]. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996, pp. 61–7.

[25] Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. Mutat Res 1995;438:153–62.

[26] Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of *HER-2/neu* gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence *in situ* hybridization. Oncogene 1996;13:63–72.

[27] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Bunn PA Jr. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. Br J Cancer 2002;86:1449–56.

[28] Wychulis AR, Woolam GL, Anderson HA, Ellis FH. Achalasia and carcinoma of the esophagus. JAMA 1971;215:1638.

[29] Loviscek LF, Cenoz MC, Badaloni AE, Agarinakazato O. Early cancer in achalasia. Dis Esophagus 1998;11:239–47.

[30] Rao PH, Mathew S, Lauwers G, Rodriguez E, Kelsen DP, Chaganti RSK. Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. Diagn Mol Pathol 1993;2:264–8.

[31] Moskaluk CA, Hu J, Periman EJ. Comparative genomic hybridization of esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss. Genes Chromosomes Cancer 1998;22:305–11.

2] van Dekken H, Vissers CJ, Tilanus HW, Tanke HJ, Rosenberg C. Clonal analysis of a case of multifocal oesophageal (Barrett's) adenocarcinoma by comparative genomic hybridization. J Pathol 1999;188:263–6.
3] Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. Mutat Res 2000;462: 335–42.
4] Sheyn I, Noffsinger AE, Heffelfinger S, Davis B, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. Amplification and expression of the cyclin D1 gene in anal and esophageal squamous cell carcinomas. Hum Pathol 1997;28: 270–6.
[35] Adélaide J, Monges G, Dérdérian C, Seitz JF, Birnbaum D. Oesophageal cancer and amplification of the human cyclin D gene *CCND1/PRAD1*. Br J Cancer 1995;71:64–8.
[36] Tsuji T, Mimura Y, Maeda K, Ida M, Sasaki K, Shinozaki F. Numerical aberrations of chromosome 17 detected by FISH with DNA-specific probe in oral tumors. Anticancer Res 1994;14:1689–93.

8. FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NA CARCINOGÊNESE GÁSTRICA

ARQGA/1045

REVISÃO/REVIEW

FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NA CARCINOGÊNESE GÁSTRICA

Ana Cristina Gobbo CÉSAR, Ana Elizabete SILVA e Eloiza Helena TAJARA

RESUMO – ***Racional*** - O câncer de estômago é o segundo tipo mais comum de neoplasia no mundo. A carcinogênese de estômago é processo de múltiplos passos, podendo manifestar-se em várias etapas como gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como um carcinoma. Essas condições costumam ser seqüenciais e ocorrer num período de muitos anos como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos, que causam alterações genéticas. Os recentes avanços da genética molecular têm mostrado que o acúmulo dessas várias anormalidades, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores, resultam no desenvolvimento do câncer. Alterações genéticas descritas em carcinomas gástricos incluem amplificações e mutações dos genes *c-ERBB2*, *K-RAS*, *c-MET* e *TP53*. O ganho de cromossomos também foi encontrado em várias combinações com perda de outros cromossomos e pode estar associado com a expressão elevada de oncogenes, que contribuem com a progressão tumoral. ***Conclusão*** - Essas mudanças genéticas em carcinomas evidenciam o processo de múltiplas etapas da carcinogênese gástrica, por meio do acúmulo de uma série de alterações.

DESCRITORES - Neoplasias gástricas, genética.

O câncer de estômago é o segundo tipo mais comum de neoplasia em incidência e mortalidade, sendo duas vezes mais freqüente no sexo masculino do que no feminino[1], principalmente entre os idosos. A freqüência na população é baixa aos 40 anos e aumenta progressivamente com a idade, até atingir seu valor mais elevado por volta dos 70 anos nos homens e pouco mais tarde nas mulheres[14].

As estatísticas mundiais mostram distinta variação geográfica[14]. Por exemplo, taxas elevadas são encontradas no Japão, Chile, China, Portugal e Rússia enquanto, em outros países, essas taxas têm declinado, como na França, Reino Unido, Austrália, Canadá e Estados Unidos. No Brasil, as estimativas para 2002 apontaram para mais de 20 mil casos novos e 11 mil óbitos[27] sendo, na cidade de São Paulo, o tipo de neoplasia mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres[1].

O prognóstico do câncer gástrico avançado é extremamente pobre, com taxas de sobrevivência de 5 anos entre 5% a 15%[5]. Tal fato é conseqüência do diagnóstico, na maioria dos casos, ser realizado em estágios avançados e dessa doença mostrar taxa de recurrência próxima a 80%, mesmo quando é realizada a gastrectomia[14]. O prognóstico depende da extensão da invasão do câncer, do comprometimento das estruturas adjacentes e da presença ou ausência de metástases em nódulos linfáticos e outros órgãos distantes.

A tumorigênese gástrica, assim como de outros órgãos, é processo de múltiplas etapas que, clinicamente, pode manifestar-se como gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, como neoplasia maligna[11]. Essas condições costumam ser seqüenciais e ocorrer num período de muitos anos, como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos. As principais

artamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP.
ereço para correspondência: Dra. Ana Elizabete Silva – Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Bairro Jardim Nazareth - 15054-000 - São José do Rio Preto, SP.

conseqüências da ação de tais fatores são as mutações somáticas, como em oncogenes e genes supressores de tumores, que conferem às células vantagens seletivas de proliferação[10].

A gastrite é a lesão que mais freqüentemente afeta o estômago e é definida como uma inflamação da mucosa gástrica. A gastrite aguda é raramente observada em biopsia de rotina, por causa de sua característica transitória. Na gastrite crônica, as lesões vão desde processo inflamatório superficial, até a atrofia do epitélio, que é evidenciada pela perda significativa de estruturas glandulares e mostra-se, algumas vezes, associada à metaplasia intestinal. Aproximadamente 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem carcinoma em período de 15 anos[9], sendo por isso, considerada lesão pré-maligna[20].

Em 60%-80% dos casos, existe associação entre gastrite e úlcera gástrica. Vários dados da literatura mostram que entre os fatores etiológicos da úlcera estão defeitos primários na resistência da mucosa ou deficiências quantitativas ou qualitativas do seu muco, além de alguns fatores ambientais, como a ingestão de aspirina não-tamponada, álcool e medicamentos antiinflamatórios não-esteróides[2, 11].

Os pacientes com úlceras apresentam níveis reduzidos ou normais de ácido gástrico. HANSSON et al.[22] mostraram que, entre aqueles com redução na produção desse ácido e pangastrite, existe risco maior de câncer do que nos pacientes com úlcera duodenal, que têm níveis elevados de ácido e geralmente também exibem gastrite, predominantemente na região antral. É importante referir que a ressecção gástrica como tratamento da úlcera não diminui esse risco[55].

Eventualmente, acompanhando uma gastrite ou durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica, é observada a metaplasia intestinal, decorrente da transformação do epitélio de revestimento e glandular em células absortivas colunares metaplásicas intercaladas por células caliciformes de morfologia intestinal. Essa lesão está associada à infecção pelo *Helicobacter pylori*[19] e, embora as características do intestino delgado predominem, em algumas situações as características do epitélio colônico estão presentes, originando a metaplasia do tipo incompleto, que é o mais relacionado ao câncer gástrico[30].

Com gastrite crônica de longa duração, o epitélio desenvolve alterações citológicas, incluindo as de tamanho, formato e orientação das células epiteliais com atipia dos núcleos. Essas alterações displásicas podem se tornar tão graves a ponto de constituírem um carcinoma *in situ*[11, 34], principalmente do tipo intestinal proveniente de formas atróficas de gastrite. Já o tipo difuso surge originalmente, sem evolução por meio de displasia.

O adenocarcinoma representa 90%-95% dos casos de neoplasias malignas do estômago[11], sendo classificado com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: Intestinal e difuso[61]. As lesões tipo intestinal são as mais freqüentes, bem diferenciadas, dependentes de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia[57]. São encontradas predominantemente em homens e em indivíduos mais idosos. O tipo difuso é pouco diferenciado, tem prognóstico ruim e não está associado a lesões pré-cancerosas[59]. É pouco mais freqüente em mulheres e pacientes jovens e tem alta ocorrência familial, principalmente entre indivíduos com tipo sangüíneo A[14].

Diferenças nos critérios de diagnóstico do câncer gástrico inicial entre patologistas japoneses e ocidentais, resultam na falta de entendimento por parte dos clínicos. Segundo MING e HIROTA[42], que exemplificam a opinião de autores ocidentais, a maioria dos carcinomas gástricos são diagnosticados após 1 ano da presença de displasia, sugerindo que o câncer já estava presente no momento da detecção dessa lesão pré-cancerosa. Portanto, ambas as lesões ocorreriam concomitantemente e o desenvolvimento do carcinoma seria mais freqüentemente em áreas com displasia grave. Já na opinião dos patologistas japoneses, a gastrite atrófica com metaplasia evoluiria diretamente para o câncer sem a etapa de displasia, sendo bem representada no trabalho fundamental de NAKAMURA et al.[45].

FATORES ETIOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO

Existem muitos dados epidemiológicos sugerindo que fatores genéticos e ambientais têm papel importante na etiologia do câncer gástrico. Entre esses últimos, estão o consumo elevado de sal, álcool, cirurgia gástrica anterior, infecção pelo *H. pylori* e história de lesões benignas[1, 11, 14]. Existem também indicações de que a ingestão ou a formação intragástrica de compostos nitrosos ou outras substâncias genotóxicas, assim como o refluxo de bile em indivíduos com gastrite-*H. pylori* positiva, induzem ao aparecimento da metaplasia intestinal e de lesões neoplásicas[12, 39, 47].

No caso de compostos nitrogenados e seus metabólitos, acredita-se que sua ação esteja relacionada com a inibição de vitamina C e de outros antioxidantes que protegem o DNA[14, 35, 70]. São capazes de provocar a desaminação de purinas e pirimidinas do DNA, do mesmo modo que o óxido nitroso, já referido como responsável por mutações de ponto no gene supressor de tumor *TP53*[52].

Ao contrário desses compostos, os carotenóides, as vitaminas C e E, o folato e o selênio presentes em frutas e vegetais estão relacionados à diminuição no risco de aparecimento do câncer gástrico[1].

Fator ambiental bastante estudado é a presença do *H. pylori*, considerado o principal agente etiológico em mais de 95% das gastrites crônicas e responsável pelo aumento do risco de câncer em até 9 vezes[37]. É reconhecido como agente desencadeante de diferentes alterações gástricas, como inflamação crônica assintomática, dispepsia, úlcera, adenocarcinomas e linfomas[40, 66]. Entretanto, a infecção pelo *H. pylori* parece não ser suficiente para o desenvolvimento do câncer, cujo risco é de apenas 1% entre os indivíduos infectados. Na África, por exemplo, a infecção por essa bactéria é observada em crianças de pouca idade, mas nem por isso o câncer gástrico é comum nesse

unesp

país[23, 58]. Apesar disso, 60%-80% dos casos de neoplasia mostram a presença dessa bactéria[37].

O conhecimento sobre o papel do *H. pylori* na tumorigênese ainda é incompleto. Sabe-se que essa bactéria secreta urease, enzima responsável pela produção de amônia, além de proteases e fosfolipases, que degradam as glicoproteínas presentes na mucosa gástrica e danificam suas células[11]. Outra característica importante é a virulência dessa bactéria, pois existe forte associação entre cepas *H. pylori-cagA* positivas e ulceração gástrica. O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene*) faz parte da chamada ilha de patogenicidade cag, cujos genes expressam proteínas do sistema de secreção tipo IV, capazes de transferir produtos bacterianos, incluindo a proteína *cagA*, para dentro das células do hospedeiro.

O segundo gene relacionado à virulência, o *vacA*, é responsável pela codificação de uma citotoxina vacuolizante e apresenta ampla diversidade alélica. As isoformas descritas incluem s1a, s1b, s1c, s2, m1, m1a, m1*, m1-m2*, m2a e m2b, algumas delas com maior virulência, como s1/m1. Existem relatos de que a associação da variante s1a ao produto do gene *cagA* é responsável por processo inflamatório grave na mucosa gástrica[3].

O gene *iceA* também tem sido estudado em cepas de *H. pylori*, sendo suas principais variantes alélicas a *iceA1* e a *iceA2*. A função desses subtipos ainda não está clara. A expressão do alelo *iceA1* é regulada pelo contato entre o *H. pylori* e as células epiteliais do hospedeiro e alguns dados sugerem sua participação no desenvolvimento de ulceração péptica[50, 67], enquanto outros não[28].

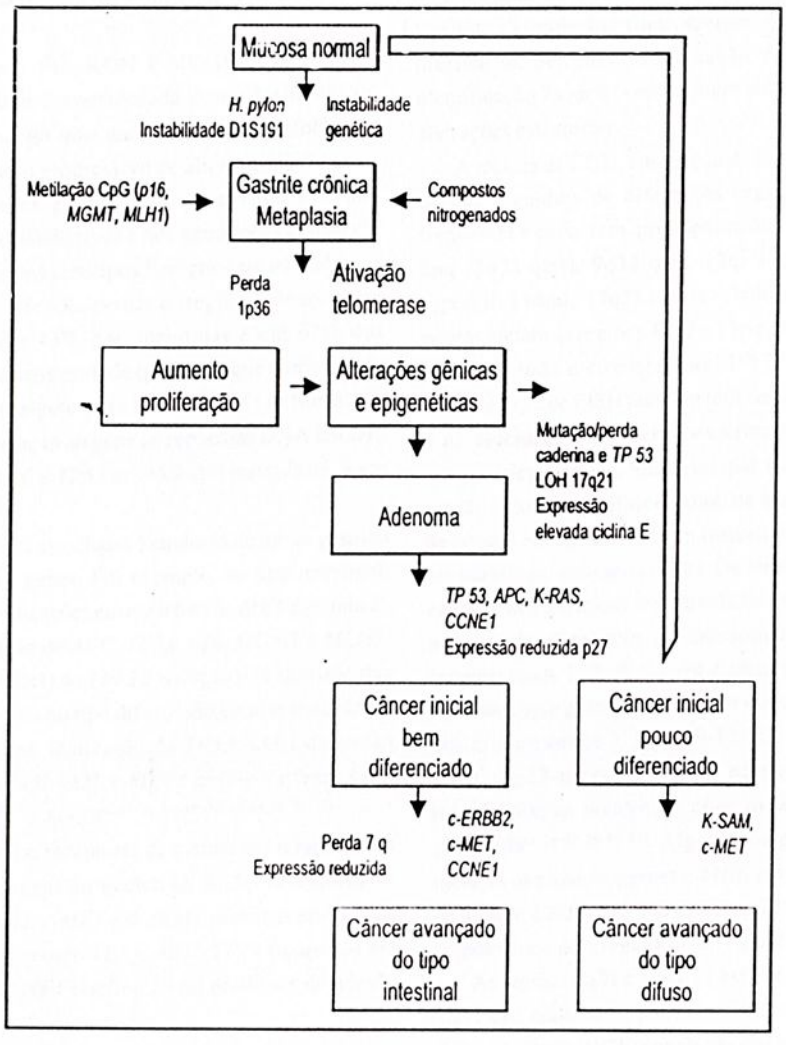


FIGURA 1 – Progressão maligna do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso com as alterações genéticas e epigenéticas associadas (TAHARA[61] e YASUI et al.[68, 69])

Quanto aos fatores genéticos na tumorigênese gástrica, há indicações de que apenas 4% dos casos sejam familiais[2]. Apoiando esses dados estão os estudos sobre as variações na incidência da doença em migrantes em decorrência de mudanças ambientais, principalmente dieta e fatores culturais. Na China, a frequência de câncer de estômago em homens foi 4 a 6 vezes mais elevada, quando comparada aos migrantes chineses residentes nos EUA[1].

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E GÊNICAS ENVOLVIDAS NA CARCINOGÊNESE GÁSTRICA

O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento tem contribuído para a redução do câncer gástrico. Todavia, para que ocorra maior progresso nessa área, ainda é necessário compreender melhor os mecanismos envolvidos nas várias etapas do processo tumorigênico[2,3].

No modelo proposto por FEARON e VOGELSTEIN[17], a carcinogênese gastrointestinal é considerada como resultado de processo de múltiplos passos, no qual anormalidades morfológicas são acompanhadas por acúmulo progressivo de alterações genéticas. No caso especial do câncer gástrico, é observada elevada heterogeneidade nos padrões histológicos e nos genótipos celulares[6], com crescente complexidade dos fenótipos benignos até os malignos (Figura 1). Por exemplo, são referidas perdas da região do braço curto do cromossomo 17 (17p) em 43% dos adenomas e em 67% dos carcinomas[33] e perda de heterozigosidade (processo que compreende a conversão do estado heterozigoto para homozigoto em função da perda de um dos alelos) em relação ao gene de reparo do DNA *hMSH2* e aos supressores de tumor *APC* e *TP53* em 45% das metaplasias e em 73% dos adenocarcinomas[31].

Os mecanismos moleculares associados à etiologia do tumor gástrico incluem alterações em vários genes. Por exemplo, no tipo intestinal, ocorrem principalmente amplificações em *c-ERBB2*, *c-MET* e *ciclina E*, mutações no *K-RAS*, inativação do *APC*, *TP53*, *p16*, *MGMT* e *MLH1*, perda de heterozigosidade (LOH) do *TP73* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23, enquanto no tipo difuso, são citadas redução ou perda de função das caderinas, inativação do *TP53*, LOH da região 17q21, amplificação dos genes *K-SAM*, *c-MET* e *ciclina E* e redução na expressão das proteínas p27 e nm23[3, 15, 41, 44, 49, 54, 63, 64, 65, 69, 71].

Os genes citados codificam receptores de membrana relacionados com a transdução de mensagens ao núcleo (*K-RAS*), receptores de fator de crescimento (*c-ERBB2*, *c-MET* e *K-SAM*), proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular como *TP53*, *APC*, *TP73* (mapeado em 1p36), *CDKN1A* (p27) e *CCNE1* (*ciclina E*) ou proteínas de adesão (caderinas).

Várias alterações epigenéticas também atuam no processo multipassos da carcinogênese gástrica[39]. Por exemplo, na etapa inicial, detectou-se a ativação da telomerase, observada em vários casos de metaplasia intestinal e adenomas gástricos. Essa enzima é responsável pela adição de seqüências teloméricas às extremidades dos cromossomos, para compensar as perdas que ocorrem em cada divisão celular.

Os dados citogenéticos, que podem trazer importantes informações sobre as regiões do genoma envolvidas na malignização, são relativamente escassos nas lesões de estômago. Esse fato decorre, principalmente, das dificuldades de análise em metáfases obtidas em culturas de tumores primários. Mais recentemente, técnicas de citogenética molecular, como a hibridação in situ fluorescente (FISH) e a hibridação genômica comparativa (CGH), têm enriquecido esses dados e indicado o envolvimento de diferentes cromossomos e regiões cromossômicas nos processos de iniciação e progressão tumoral[21, 32, 33, 48, 67]. Ambas as técnicas estão baseadas na propriedade de hibridação de moléculas de ácidos nucléicos complementares. Utilizam DNAs ligados a compostos fluorescentes que, após o procedimento de hibridação, permitem a marcação de segmentos do genoma e a identificação daqueles com número anormal de cópias ou mesmo com alterações estruturais.

A técnica de CGH, em função de suas características, tem revelado perdas e ganhos de diferentes segmentos. Os ganhos são mais freqüentes e envolvem, principalmente, as regiões 1q22-q31, 2q, 7pq, 8pq (8q23-qter), 9q33-qter, 13q, 17p11.2-q22, 18q e 20pq. Em especial, a banda 17q21 tem revelado alto nível de amplificação. As perdas afetam as regiões 4q32 e 17p e, menos freqüentemente, 1q, 5p, 9p, 18q e todo o cromossomo 21[36, 38, 56].

A técnica de FISH também tem auxiliado no mapeamento de genes e na elucidação de alterações cromossômicas não definidas pela citogenética clássica. Sua principal vantagem é o fato de permitir o estudo tanto de metáfases, como de núcleos interfásicos procedentes de células em cultura, tecidos frescos, material de arquivo emblocado em parafina e aspirado celular. Os resultados obtidos por essa técnica em tumores gástricos têm revelado, como no caso da CGH, grande número de alterações cromossômicas numéricas. O ganho dos cromossomos 1, 2, 4, 7 e 20 é observado em estágios precoces da carcinogênese gástrica[16, 32, 48]. Por outro lado, trissomias e polissomias dos cromossomos 3, 6-8, 10-12, 15-17 e das regiões 7q31, 8q24, 9p21, 9p22-pter e 9p32-33 parecem estar relacionadas com transformação maligna e com invasão ou com tempo curto de sobrevida[4, 26, 32, 56, 60, 62]. Alguns dos genes presentes nessas regiões incluem os protooncogenes *c-MET*, *c-MYC* e *c-ERBB2* e os supressores de tumor *CDKN2A*, *CDKN2B* e *TP53*[23, 26, 44, 56, 60], esses últimos responsáveis pela regulação do ciclo celular.

As regiões 7q31 e 17p13.1 estão entre as mais afetadas. Na região 7q31 está mapeado o gene *c-MET*, que codifica um receptor de fator de crescimento (HGF) envolvido no controle da proliferação de células do fígado e do trato gastrointestinal e, provavelmente, é importante no reparo da mucosa danificada[65]. Na região 17p13.1 está localizado

unesp

o supressor de tumor *TP53*. A mutação ou a perda desse gene é evento inicial na tumorigênese gástrica[23] e também tem sido observada em lesões benignas ou pré-cancerosas, como gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia. Seu produto tem papel essencial na regulação da proliferação celular e, em presença de lesões no DNA, é responsável pelo bloqueio do ciclo celular entre as fases G1-S. Nos casos em que o DNA não é reparado adequadamente, a proteína p53 ativa o processo de apoptose por meio da regulação transcricional e da interação direta com as proteínas bcl-2 e bax.

Ainda não está esclarecido se as alterações no gene *TP53* são desencadeadas pela inflamação provocada pelo *H. pylori*. Entretanto, DEGUCHI et al.[13] observaram freqüências mais elevadas de mutações no *TP53* em pacientes com câncer gástrico infectados pelo *H. pylori cagA+* do que nos grupos *H. pylori*-positivo/*cagA*-negativo e *H. pylori*-negativo.

Existem também indicações de que a infecção crônica pelo *H. pylori* é responsável pela instabilidade genômica observada em alguns casos de gastrite atrófica crônica e pelo aumento da proliferação celular[24, 39] e da apoptose na mucosa gástrica, provavelmente em conseqüência da resposta inflamatória[29]. Tem sido sugerido que a erradicação da infecção reverte o processo inflamatório e, conseqüentemente, a atrofia, a metaplasia e a instabilidade genômica[7, 18, 24, 39, 46].

A proliferação celular na mucosa gástrica de indivíduos *H. pylori*-positivo ocorre independentemente da cepa ser *cagA*-positiva, mas a taxa de apoptose é significativamente maior nos indivíduos infectados por essa cepa[43]. Tal conclusão é, porém, controversa, sendo apoiada por alguns estudos realizados com cultura celular[51, 53], mas não por outros[69].

Em conclusão, parece que a infecção provocada pelo *H. pylori* atua como co-fator na carcinogênese gástrica, favorecendo o aparecimento de danos no DNA e alterando os processos de proliferação celular e apoptose. A somatória desse e de outros fatores ambientais, juntamente com a suscetibilidade genética, deve facilitar o aparecimento de alterações genéticas somáticas que acompanham a evolução de lesões pré-cancerosas a câncer gástrico, mas muitos estudos são ainda necessários para a devida avaliação da verdadeira importância e do grau de participação de cada um desses fatores nas diferentes etapas da tumorigênese.

COMENTÁRIOS FINAIS

A carcinogênese gástrica é um processo com múltiplas etapas, em que as mudanças morfológicas são conseqüência das alterações genéticas, que ocorrem sucessivamente durante esse processo e podem levar à evolução de gastrite crônica em atrófica, associada ou não à metaplasia. Até essa etapa, as alterações na forma da célula e do núcleo podem ser revertidas, muitas vezes, após tratamento da infecção pelo *H. pylori* e mudanças na dieta e no estilo de vida. Todavia, parcela dessas gastrites atróficas associadas à metaplasia podem evoluir para displasia e, conseqüentemente, para o carcinoma in situ.

Muitas alterações genéticas observadas em lesões metaplásicas e adenomas são encontradas nas neoplasias gástricas, demonstrando a sua heterogeneidade ao longo do processo de malignização.

Os critérios histopatológicos são extremamente importantes para definir e dar suporte ao diagnóstico e prognóstico, todavia são limitados e subjetivos, gerando muitas vezes discordância entre observadores diferentes, principalmente quanto às lesões displásicas e carcinoma in situ. Por exemplo, os patologistas japoneses, ao contrário dos ocidentais, não consideram a existência de lesões displásicas, o que confunde os clínicos.

Tais dificuldades apontam para a necessidade de classificação que utilize critérios menos subjetivos. Os avanços na área molecular abrem a possibilidade de utilização de marcadores genéticos que, somados aos dados histopatológicos e imunohistoquímicos poderá levar a diagnósticos e prognósticos mais seguros.

César ACG, Silva AE, Tajara EH. Genetics and environmental factors in gastric carcinogenesis. Arq Gastroenterol 2002;39(4):253-259.

ABSTRACT – ***Background*** - Gastric cancer is considered to be the second most common cancer worldwide. Carcinogenesis of the stomach is a multi-stage process. The progression from normal epithelial to tumor cells may involve at least five stages: superficial gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma. These sequential changes in the gastric mucosa may occur over a period of many years as a result of exposure to a variety of exogenous and/or endogenous factors which cause genetic alterations. Recent developments in molecular genetics have shown that the accumulation of these multiple genetic alterations, including activation of oncogenes and inactivation of tumor-suppressor genes, results in cancer development. Genetic alterations previously reported in gastric carcinomas include amplifications or mutations of the *c-ERBB2*, *K-RAS*, *c-MET* and *TP53*. Chromosomal gains were also found in various combinations with chromosomal losses and may be associated with the overexpression of dominant oncogenes contributing to tumor progression. ***Conclusions*** - These accumulated genetic changes in carcinomas provide evidences for the stepwise mode of gastric carcinogenesis through the accumulation of a series of genetic alterations.

HEADINGS - Stomach neoplasms, genetics.

---

unesp

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AICR - American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: Banta Book Group, 1997.
2. Anand BS, Graham DY. Ulcer and gastritis. Endoscopy 1999;31:215-25.
3. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:17771-7.
4. Blanco R, Lyda M, Davis B, Kraus M, Fenoglio-Preiseer C. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone-B cell (mucosa-associated lymphoid tissue) origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. Human Pathol 1999;30:706-11.
5. Brien TP, Depowski MD, Sheehan CE, Ross JS, McKenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. Mod Pathol 1998;11:870-7.
6. Buonsanti G, Calistri D, Padovan L. Microsatellite instability in intestinal- and diffuse-type gastric carcinoma. J Pathol 1997;182:167-73.
7. Cahill RJ, Xia H, Kilgallen C, Beattie S, Hamilton H, O'Morain C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. Dig Dis Sci 1995;40:1627-31.
8. Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui WM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-cadherine is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. Gut 2001;48:668-11.
9. Cheli R, Giacosa A. Atrophic gastritis. In: Sherlock P, Morson BC, Barbara L, Veronesi U, editors. Precancerous lesions for the gastrointestinal tract. New York: Raven Press; 1983.
10. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. Cancer 1992;70:1727-31.
11. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of disease. 6 ed. Philadelphia: W B. Saunders; 1999.
12. Dani R. Gastroenterologia essencial. Rio de Janeiro: Guanabara; 1998.
13. Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. Int J Cancer 2001;91:481-5.
14. De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer – Principles and practice of oncology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. v.1.
15. Endoh Y, Sakata K, Tamura G, Ohmura K, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. J Pathol 2000;191:257-63.
16. Espinoza LA, Neto BJ, Casartelli C. Pathologies and karyotypic abnormalities in advanced gastric carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 1999;109:45-50.
17. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61:759-67.
18. Fraser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounder RE. Effect of eradiction of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. Aliment Pharmacol Ther 1994;8:167-73.
19. Genta RM. *Helicobacter pylori* as a promotor of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7:S25-S30.
20. Genta RM. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:17-23.
21. Guan XY, Fu SB, Xia JC, Fang Y, Sham JST, Du BD, Zhou H, Lu S, Wang BQ, Lin YZ, Liang Q, Lim XM, Ju B, Ning XM, Du JR, Lim P, Trent JM. Reccurent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. Cancer Genetic Cytogenetic 2000;123:27-34.
22. Hansson L, Nyren O, Hsing AW. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. N Engl J Med 1996;335:242-9.
23. Hao Y, Zhang J, Yi C, Qian W. Abnormal change of p53 gene in gastric and precancerous lesions and APC gene deletion in gastric carcinoma and near tissues. J Tongji Med Univ 1997;17:75-8.
24. Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. Am J Clin Pathol 1997;108:26-34.
25. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. Gut 1992;33:429-31.
26. Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Kimura I, Harada Y, Sugimura T, Terada M. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. Cancer Res 1995;55:3421-3.
27. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2002.
28. Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kato T, Kohli Y, Keida Y, Kuriyama M. Sequence analysis and clinical significance of the iceA gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. J Clin Microbiol 2000;38:483-8.
29. Jang TJ, Lim JR. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol 2000;35:265-71.
30. Jass JR, Filipe MI. Variants of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma: A histochemical study. Histopathology 1977;3:191-9.
31. Kim YH, Kim NG, Lim JG, Park C, Kim H. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas. Am J Pathol 2001;158:655-62.
32. Kitayama Y, Igarashi H, Sugimura H. Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. Clin Cancer Res 2000;6:3139-46.
33. Kobayashi K, Okamoto T, Takayama S, Akiyama M, Ohono T, Yamada H. Genetic instability in intestinal metaplasia is a frequent event leading to well-differentiated early adenocarcinoma of the stomach. Eur J Cancer 2000;36:1113-9.
34. Kokkola A, Haapiainen R, Laxen F, Puolakkaninen P, Kivilalkso E, Virtamo J, Sipponen P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow-up study. J Clin Pathol 1996;49:979-84.
35. Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. Cancer Causes Control 1996;7:41-55.
36. Koo SH, Kwon KC, Shin SY, Jeon YM, Park JW, Kim SH, Noh MS. Genetic alterations of gastric cancer: comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization studies. Cancer Genet Cytogenet 2000;117:97-103.
37. Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:3-11.
38. Larramendy ML, El-Rifai W, Kokkola A, Puolakkainen P, Monni O, Salovaara R, Aarnio M, Knuutila S. Comparative genomic hybridization reveals differences in DNA copy number changes between sporadic gastric carcinomas and gastric carcinomas from patients with hereditary nonpoluposis colorectal cancer. Cancer Genet Cytogenet 1998;106:62-5.
39. Lynch DAF, Mapstone NP, Clarke AMT, Jackson P, Moayyedi R, Dixon MF, Quirke P, Axon ATR. Correlation between epithelial cell proliferation and histological grading in gastric mucosa. J Clin Pathol 1999;52:367-71.
40. Ma JL, You WC, Gail MH, Zhang L, Blot WJ, Chang YS, Jiang J, Liu WD, Hu YR, Brown LM, Xu GW, Fraumeni JF Jr. *Helicobacter pylori* infection and mode of transmission in a population at high risk of stomach cancer. Int J Epidemiol 1998;27:570-3.
41. Maeta M, Saito H, Oka S, Tsujitani S, Ikeguchi N, Kaibara N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. J Exp Clin Cancer Res 2000;19:489-95.
42. Ming SC, Hirota T. Malignant epithelial tumors of the stomach. In: Ming SC, Goldman H, editors. Pathology of the gastrointestinal tract. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p.607-47.
43. Moss SF, Sordillo EM, Abdalla AM, Makarov V, Hanzely Z, Perez-Perez G, Blaser MJ, Holt PR. Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. Cancer Res 2001;61:1406-11.
44. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erbB-2 in human gastric carcinomas. Cancer 2000;88:1894-902.
45. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearance. Jpn J Cancer Res 1968;69:930-5.
46. Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'Armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. Gut 1999;44:789-99.
47. Oashima H, Friesen M, Malaveille C, Brouet I, Hautefeuille A, Bartsch H. Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. Food Chem Toxicol 1989;27:193-200.
48. Okada K, Sugihara H, Bamba M, Bamba T, Hattori T. Sequential numerical changes of chromosomes 7 and 18 in diffuse-type stomach cancer cell lines: combined comparative genomica hybridization, fluorescence in situ hybridization and ploidy analyses. Cancer Genet Cytogenet 2000;118:99-107.
49. Park WS, Oh RR, Park JY, Shin MS, Lee HK, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Absence of mutations in the kinase domain of the Met gene and frequent expression of Met and HGF/SF protein in primary gastric carcinomas. APMIS 2000;108:195-200.
50. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. Proc Assoc Am Physicians 1998;110:531-44.
51. Peek RM, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishnan U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. Cancer Res 1999;59:6124-31.

52. Polkinghorn C, Vandell DW, Huang Q, Little JB, Melhus W, Schmid KW, Becker W, Dockhorn-Dworniczak B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. Virchows Arch 1995;426:447-55.
53. Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH, Galle PR, Stremmel W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. J Clin Invest 1998;102:1506-14.
54. Russo A, Bazan V, Migliavacca M, Tubiolo C, Macaluso M, Zanna I, Corsale S, Latteri F, Valerio MR, Pantuso G, Morello V, Dardanoni G, Latteri MA, Colucci G, Tomasino RM, Gebbia N. DNA aneuploidy and high proliferative activity but not K-ras-2 mutations as independent predictors of clinical in operable gastric carcinoma: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell' Italia Meridionale (GOIM) prospective study. Cancer 2001;92:294-302.
55. Safatle-Ribeiro A, Ribeiro U, Reynolds JC. Gastric stump cancer: What is the risk? Dig Dis 1998;16:159-68.
56. Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer 1999;24:299-305.
57. Shiao YH, Rugge M, Correa I, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. Am J Pathol 1994;144:511-7.
58. Sierra R, Munoz N, Pena AS. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomark Prevent 1992;1:449-54.
59. Sipponen P, Kekki M, Siurala M. Precancerous conditions. In: Filipe MI, Jass JR, editors. Gastric cancer. Current problems in tumour pathology. London: Churchill Livingstone, 1985. p. 152-71.
60. Tahara E. Molecular mechanisms of stomach carcinogenesis. J Cancer Res Clin Oncol 1993;119:265-72.
61. Tahara E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. Exp Toxicol Pathol 1998;50:375-8.
62. Takahashi Y, Shintaku K, Ishii Y, Terai S, Ishikawa K, Fujii M. Analysis of MYC and chromosome 8 copy number changes in gastrointestinal cancers by dual color fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1998;107:61-4.
63. Takahashi Y, Nagata T, Sataoshi A, Shintaku K, Eguchi T, Ishii Y, Fujii M, Ishikawa K. Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual-two-color fluorescence in situ hybridization and genechip p53 assay. Cancer Genet Cytogenet 2000;121:38-43.
64. Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi HC, Okayasu I. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. Am J Pathol 2000;156:585-94.
65. Tarasova NI, Rulong S, Oskarsson M. Cellular localization of met and its ligand hepatocyte growth factor/scatter factor in human stomach epithelium. Gastroenterology 1996;110:1125.
66. Tytgat GN. *Helicobacter pylori* in man: problems to be solved. Dig Dis 1998;16:192-7.
67. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, Boer W, Quint W. Clinical revelance of the cagA, vacA and iceA status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998;115:58-66.
68. Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. J Gastroenterol 2000;35:111-5.
69. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. Gastric Cancer 2001;4:113-21.
70. Ward MH, Sinha R, Heineman EF. Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. Int J Cancer 1997;71:14-9.
71. Werner M, Becker KF, Keller GC, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. J Cancer Res Clin Oncol 2001;127:207-16.

Recebido em 8/1/2002
Aprovado em 13/8/2002

9. COMPARISON OF HISTOLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF *HELICOBACTER pylori* IN BENIGN LESIONS AND GASTRIC ADENOCARCINOMA

Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma

Ana Cristina Gobbo César
PhD in Genetics, Full Professor, UNIP – Araçatuba-SP, Brazil

Patrícia Maluf Cury
PhD in Pathology, Doctor Assistant Professor of Pathology, FAMERP – São José do Rio Preto-SP, Brazil

Spencer Luiz Marques Payão
PhD in Morphology, Doctor Assistant Professor of Genetics, FAMEMA – Marília-SP, Brazil

Paula Rahal Liberatore
PhD in Biological Sciences, Doctor Assistant Professor, Department of Biology, UNESP – São José do Rio Preto-SP, Brazil

Ana Elizabete Silva*
PhD in Genetics, Doctor Assistant Professor, Department of Biology, UNESP – São José do Rio Preto-SP, Brazil

Address correspondence to:
Ana Elizabete Silva
Departamento de Biologia
UNESP – Campus de São José do Rio Preto
Rua Cristóvão Colombo, 2265
15054-000 – São José do Rio Preto, SP-Brazil
E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br
Phone: 55 (17) 221-2384 FAX: 55 (17) 221-2390
Braziliam Journal of Microbiology, 2004, *submitted*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori colonization is associated with chronic gastritis, peptic ulcers, intestinal metaplasia, adenocarcinoma and lymphoma of the stomach. The objective of this study was to compare the results of the routinely used histology with molecular diagnosis for the detection of *H. pylori*. Eighty samples from gastric lesions (chronic gastritis, atrophic gastritis, gastric ulcer, and intestinal metaplasia), 18 gastric adenocarcinoma and 10 normal mucosa *H. pylori*-negative (control) samples were obtained. All samples were examined histologically (hematoxylin-eosin and Giemsa staining), and PCR amplifications of the species-specific antigen gene (H3H4) and urease A gene segment (H5H6) of *H. pylori* were made, using the human gene *CYP1A1* for DNA quality control. In the benign lesion and adenocarcinoma the infection was detected in 43% (42/98) and 71% (70/98) by histological and molecular diagnosis (p=0.0000), respectively. The PCR test detected *H. pylori* in 27.5% (22/80) of the benign gastric lesions and in 50% (9/18) of the gastric adenocarcinoma cases, the histological diagnosis being negative for this bacterium. About 2.5% of the samples, exclusively from benign lesions and with a positive histological diagnosis, showed negative molecular results for both primers. Statistically significant differences were found between the histological and the molecular method in intestinal metaplasia (p=0.0179) and gastric adenocarcinoma (p=0.0026), due to underdetection of *H. pylori* by the histological method, which is probably due to the low density of the bacterium as a consequence of the severe atrophy of the gastric mucosa. Our findings suggest that PCR is the more efficient method for the assessment of *H. pylori* infection, especially in metaplasia and gastric adenocarcinoma.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric lesions, adenocarcinoma, histological diagnosis, PCR.

RESUMO

A colonização do *Helicobacter pylori* está associada com gastrite crônica, úlcera péptica, metaplasia intestinal, adenocarcinoma e linfoma gástrico. O objetivo desse estudo foi comparar os resultados do diagnóstico histológico usado de rotina na detecção do *H. pylori* com o diagnóstico molecular. Foram utilizadas amostras de 80 lesões gástricas (gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal), 18 amostras de adenocarcinoma gástrico e 10 amostras de mucosa gástrica normal *H. pylori* negativas (controle). Todas as amostras foram avaliadas histologicamente (coloração com hematoxilina-eosina e Giemsa) e pela PCR com a amplificação dos genes antígeno espécie-específico (H3H4) e urease A (H5H6) do *H. pylori* e pelo gene humano *CYP1A1*, como controle da qualidade do DNA. Nas amostras de lesão benigna e adenocarcinoma gástrico, a infecção foi detectada em 43% (42/98) e 71% (70/98), respectivamente, para os diagnósticos histológico e molecular (p=0,0000). O teste de PCR detectou o *H. pylori* em 27,5% (22/80) das lesões gástricas benignas e em 50% (9/18) dos adenocarcinomas gástricos, com diagnóstico histológico negativo para essa bactéria. Cerca de 2,5% das amostras, exclusivamente de lesões benignas, com diagnóstico histológico positivo apresentaram resultado molecular negativo, para ambos os primers. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os métodos histológico e molecular, em metaplasia intestinal (p=0,0179) e adenocarcinoma gástrico (p=0,0026), devido à subdetecção do *H. pylori* pelo método histológico, e provavelmente pela baixa densidade da bactéria conseqüente à atrofia severa da mucosa gástrica, nesses dois tipos de lesões. Nossos achados demonstram que o método de PCR é mais eficaz para diagnosticar a infecção por *H. pylori*, principalmente, em metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, lesões gástricas, adenocarcinoma, diagnóstico histológico, PCR.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral flagellated bacterium that colonizes the gastric mucosa. It induces chronic gastritis and is associated with the development of gastric and duodenal ulcers, gastric carcinoma, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (11, 38). This bacterium is the main etiologic agent in 95% of chronic gastritis cases and in 20% of gastric ulcers, and has been responsible for an approximately ninefold increase of the risk for gastric cancer (21, 31). Although 60-80% of gastric cancer cases have a positive diagnosis for *H. pylori* (21), the infection is not the sole triggering factor, since the risk is only about 1-2% in infected people (31). Thus, other factors should be considered, such as the age of onset of the infection, host factors, and the genotype of *H. pylori* strains.

Epidemiologic studies showed that *H. pylori* colonizes over 50% of the world population, affecting 40-50% of the population in the industrialized countries and 70-90% in developing countries (36).

Transmission occurs via person-to-person passage, usually during childhood. Factors influencing the transmission of *H. pylori* include socioeconomic status, density of living, educational level, sanitation and genetic predisposition (3).

The association between *H. pylori* infection and increased risk for gastric adenocarcinoma is not well understood. This bacterium produces large amounts of the enzyme urease that converts urea into carbon dioxide and ammonia, neutralizing the gastric acid and allowing the bacterium to colonize the stomach (24). *H. pylori* also stimulates the production of nitric oxide (NO) by macrophages and neutrophils. NO is a potent endogenous mutagen, because it causes genetic damage, whereas ammonia promotes gastric cell proliferation (34).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Other mechanisms also appear to be related with *H. pylori* colonization of the stomach and risk for developing gastric cancer, such as the production of anti-gastric auto-antibodies, correlated with the severity of gastritis and gastric mucosal atrophy (14), decreasing the intragastric levels of the antioxidant ascorbic acid which scavenges free oxygen metabolites and also inhibits the conversion of nitrite to N-nitrosamines (20) and infection by vacA- or CagA-producing *H. pylori* strains.

Many invasive and non-invasive methods are available for the detection of *H. pylori* infection. Invasive methods require endoscopy to obtain biopsies of gastric tissues, in which *H. pylori* can be diagnosed by urease activity, histology, PCR test or culture (19, 37). Noninvasive techniques to detect the bacterial infection include carbon urea breath tests (CUBT), antigen stool tests and serological methods for the detection of anti-*H. pylori* antibodies (35).

The aim of this study was to compare the results of histology (Giemsa staining) used as a routine to detect *H. pylori* with those of molecular diagnosis, obtained by polymerase chain reaction (PCR) using two sets of *H. pylori* oligonucleotides in benign gastric lesions and gastric adenocarcinoma.

MATERIAL AND METHODS

Samples

One hundred and eight samples were evaluated (10 from normal mucosa, 31 from non-atrophic gastritis, 13 from atrophic chronic gastritis, 18 from gastric ulcers, 18 from intestinal metaplasia, and 18 from gastric adenocarcinoma), obtained by biopsy or surgery fragments of fresh or paraffin-embedded material (seven cases). Samples of gastric lesions (92.5% from antrum and 7.5% from body) and adenocarcinoma (72% distal and 28%

proximal) were collected from 54 men and 44 women (range 2-94 years, mean age 55.8 years). Histologically normal and *H. pylori*-negative mucosa biopsies were obtained from 10 individuals with a mean age of 43 years (ranging from 19 to 75 years). Most of the samples were obtained biopsy fragments from the antrum (74.4% cases), of non-necrotic area. All samples were collected at the Hospital de Base of São José do Rio Preto, SP, Brazil. The endoscopic forceps were sterilized between experiments in 2% glutaraldehyde solution for a minimum of 20 minutes. This study was approved by the National Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients.

Histology

Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used for the diagnosis and classification of gastritis (9) and adenocarcinoma, according to Lauren (22). A modified Giemsa staining was used to visualize *H. pylori*.

DNA extraction and PCR for diagnosis of *H. pylori*

DNA was extracted by the phenol-chloroform method, after digestion with proteinase K (29). PCR assays were performed separately, with approximately 100ng of total DNA, using three different sets of oligonucleotides. One of them amplifies a 312bp segment of the gene *CYP1A1* (1) as a quality control DNA, the other (H3H4) amplifies a 298bp product of the gene encoding species-specific *H. pylori* antigen (18), and the last one (H5H6) amplifies a 411bp fragment corresponding to the urease A gene (6). Positive and negative controls were used in all experiments. The PCR products were separated by 7.5% polyacrylamide-gel electrophoresis, followed by silver nitrate staining. The assay was considered positive when at least one of the bacterial PCR products was present (12).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Statistical analysis

The chi-square test was used to determine statistical significance. Values of p lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Table 1 shows the results of histology and molecular diagnosis of *H. pylori* infection in the samples from benign lesions and gastric adenocarcinoma, except the normal mucosa sample that was *H. pylori*-negative for both methods.

In the benign lesions and adenocarcinoma samples the infection was present in 43% (42/98) and 71% (70/98), respectively, according to histological and molecular diagnosis (p=0.0000). The PCR products were concordant for both primers in 54% (53/98) of cases. The infection was considered positive when at least one of the bacterial PCR products was amplified.

The PCR test detected *H. pylori* in 27.5% (22/80) of the benign gastric lesions and in 50% (9/18) of the gastric adenocarcinoma samples, with negative histological diagnosis for this bacterium. About 2.5% of the samples, exclusively from benign lesions and with a positive histological diagnosis, showed negative molecular results for both primers. Statistically significant differences were found between the histological and the molecular method in intestinal metaplasia (p=0.0179), gastric adenocarcinoma (p=0.0026), and all samples jointly (p=0.0000), but not with regard to non-atrophic (p=0.0754) and atrophic (p=0.6802) gastritis and gastric ulcer (p=0.0543).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

DISCUSSION

Several mechanisms were postulated to link *H. pylori* infection and gastric carcinogenesis, such as increased ammonia production leading to gastric mucosal atrophy (7), decreased intragastric levels of the antioxidant ascorbic acid (3), increased production of mutagenic free radicals (8), and increased cellular proliferation and occurrence of apoptosis in gastric epithelial cells (17).

H. pylori may be present in the initial steps of gastric tumorigenesis, and this infection may precede mutations or deletions of genes engaged in this process, such as *TP53, c-ERBB-2, CDH-1* and *cyclin D1* (40).

Actually, no single test can be absolutely relied upon to detect colonization by *H. pylori*, and a combination of two tests is recommended if feasible (28). Many invasive and non-invasive methods were developed. In clinical practice, histology and urea breath test are the most used ones (26). The sensitivity of invasive methods depends of some factors such as the number of biopsies collected, density of bacterium in the biopsy specimens, persistence of *H. pylori* in the endoscopic equipment and presence of microorganisms other than *H. pylori* (28).

The rapid urease test, histology and culture may give false-negative results, due to low density of *H. pylori* present in the specimens. False-negative results of the rapid urease test may also be observed when *H. pylori* is present in the coccoid form, thus lacking urease activity. On the other hand, the presence of other microorganisms with urease activity, such as *Proteus, Yersinia, Klebsiella* and *Pseudomonas*, may be held responsible for a false-positive urease test, while spiral Gram-negative bacteria, such as *Campylobacter jejuni*, that may resemble *H. pylori*, can lead to false-positive histology (28).

unesp

The PCR assay has so far not been widely used in clinical practice, despite its high specificity and sensitivity in detecting genetic information of *H. pylori* (15, 30). The presence of genes encoding proteins that enhance the virulence of the strain (5, 39) or mutations that confer antibiotic resistance will also be useful in the choice of the appropriate therapy.

Our study detected 43% *H. pylori*-positive samples by histological assay. About 31.6% (31/98) of the cases which tested negative for *H. pylori* by Giemsa staining were found to be positive by PCR. This could be explained by the fact that *H. pylori* colonizes the gastric mucosa in a patchy manner, or that the number of present bacteria was very small or, less likely, by contamination of the biopsies by *H. pylori* DNA from the endoscopes (33). This last hypothesis is unlikely, since Paoluzzi *et al.* (28) did not detect *H. pylori* DNA in aliquots of the water used in maneuvers for cleaning endoscopic equipment, after disinfection with 2% glutaraldehyde. In the present study, the same cleansing routine was thoroughly employed.

As mentioned earlier, PCR detection of bacterial DNA is not yet widely used in clinical diagnosis, but is has been proven reliable for the detection of *H. pylori* DNA in gastric biopsies (13), gastric juice (10), and feces (2).

Nogueira *et al.* (27) studies mucosal fragments of forty patients receiving gastrectomy for gastric carcinoma. Nineteen cases were studies by microbiology method and *H. pylori* was detected in 82.5% of the cases. These authors examined areas without atrophy or with minor atrophic changes. In our study, the lower percentage of *H. pylori*-positive samples by histological assay might be explain for collection of samples regardless presence of atrophy, sensitivity of method and the variation in *H. pylori* infection rates.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

In the present study, the frequency of *H. pylori*-positive samples detected by PCR was 71% (70/98). Other studies carried out in the Brazilian population have reported differences in the frequency of *H. pylori* infection, probably due to different factors showing regional variation, such as socioeconomic status, educational level, sanitation and also the methods diagnosed employed. A percentage of 86.6% was found in Campinas-SP (23), of 76.3% in São Paulo-SP (16), 59.5% in Rio de Janeiro-RJ (32), 83% in Santa Maria-RS (25), and 96% in São Luís-MA (4).

Ours findings suggest that the PCR method is more efficient to assess *H. pylori* infection than histology, especially in metaplasia and gastric adenocarcinoma. The differences between these two methods may be explained by changes in the gastric mucosa, leading to a decrease in the secretion of normal mucus, thus making it difficult for *H. pylori* to survive in this altered environment. The bacteria then migrate to another site of the stomach or the infection comes to an end. In metaplastic regions, a minor affinity with the acid mucus is responsible for insufficient presence of *H. pylori*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was sponsored by the Brazilian Agency FAPESP.

unesp

Table 1. A comparison of relative and percentage frequencies and χ^2 test values of *H. pylori* infection, as diagnosed by histology and molecular diagnosis in benign lesions and gastric adenocarcinoma.

SAMPLES	N	HISTOLOGY (%)		MOLECULAR (%)				χ^2	*p*
				H3H4		H5H6			
		Hp-	Hp+	Hp-	Hp+	Hp-	Hp+		
Non-atrophic gastritis	31	19/31 (61.2%)	12/31 (38.7%)	13/31 (41.9%)	18/31 (58.0%)	15/31 (48.3%)	16/31 (51.6%)	3.16	0.0754
Atrophic gastritis	13	5/13 (38.5%)	8/13 (61.5%)	4/13 (30.7%)	9/13 (69.2%)	6/13 (46.1%)	7/13 (53.8%)	0.17	0.6802
Gastric ulcer	18	7/18 (38.9%)	11/18 (61.1%)	3/18 (16.6%)	15/18 (83.3%)	3/18 (16.7%)	15/18 (83.3%)	3.70	0.0543
Metaplasia	18	11/18 (61.1%)	7/18 (38.9%)	6/18 (33.3%)	12/18 (66.7%)	5/18 (27.7%)	13/18 (72.2%)	5.60	0.0179
Adenocarcinoma	18	14/18 (77.8%)	4/18 (22.2%)	9/18 (50.0%)	9/18 (50.0%)	9/18 (50.0%)	9/18 (50.0%)	9.02	0.0026
Total	98	56/98 (57.1%)	42/98 (42.8%)	35/98 (35.7%)	63/98 (64.3%)	38/98 (38.7%)	60/98 (61.2%)	17.57	0.0000

Hp- = *H. pylori*-negative; Hp+ = *H. pylori*-positive; N = number of samples

REFERENCES

1. Abdel-Rahman, S.Z.; El-Zein, R.A.; Anwar, W.A.; Au, W.W. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the GSTM and GSTT1 genes in humans. *Cancer Letters*, 104: 229-233, 1996.

2. Argyros, F.C.; Ghosh, M.; Huang, L.; Masubuchi, N.; Cave, D.R.; Grubel, P. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3755-3758, 2000.

3. Baker, K.H.; Hegarty, J.P. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scand. J. Infect. Dis.;* 33: 744-746, 2001.

4. Bezerra, J.M.; Vale, A.V.; Lobato Filho, J.C.; Martins, S.F.; Albarelli, A.L.; Freire, S.J.A.; Oliveira, G.E.; Longo, J.C. Infecção gástrica por *Helicobacter pylori* em pacientes sintomáticos da ilha de São Luís, MA: correlação endoscópica, anatomopatológica e microbiológica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29: 245-250, 1996.

5. Chisholm, S.A.; Teare, E.L.; Patel, B.; Owen, R.J. Determination of *Helicobacter pylori* vacA allelic types by single-step multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35: 42-46, 2002.

6. Clayton, C.L.; Kleanthous, H.; Coates, P.J.; Morgan, D.D.; Tabaqchali, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 192-200, 1992.

7. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – first American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.*, 52: 6735-6740, 1992.

8. Davies, G.R.; Banatvala, N.; Collins, C.E.; Sheaff, M.T.; Abdi, Y.; Clements, L.; Rampton, D.S. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.*, 29: 419-424, 1994.

9. Dixon, M.F.; Genta, R.M.; Yardley, J.H.; Correa, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International workshop on the histopathology of gastritis. Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.*, 20: 1161-1181, 1996.

10. Dominguez-Bello, M.G.; Cienfuentes, C.; Romero, R.; Garcia, P.; Gómez, I.; Mago, V.; Reyes, N.; Gueneau, D.E.; Novoa, P. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. *FEMS Microbiol. Letters,* 198: 15-16, 2001.

11. Dunn, B.E.; Cohen, H.; Blaser, M.J. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 720-741, 1997.

12. Dzierzanowska, D.; Gzyl, A.; Rozyned, E.; Augustynowicz, E.; Celinska-Cedro, U.D.; Sankowska, M.; Wadström, T. Polymerase chain reaction for identification and typing of *Helicobacter pylori* isolated from children. *J. Physiol. Pharmacol.*, 47(1): 101-114, 1996.

13. Fabre, R.; Sobhani, I.; Laurent-Puig, P.; Hedef, N.; Yazigi, N.; Visuzaine, C.; Rodde, I.; Potet, F.; Mignon, M.; Etienne, J.P. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut*, 35: 905-908, 1994.

14. Faller, G.; Steininger, H.; Kränzlein, J.; Maul, H.; Kerkau, T.; Hensen, J.; Hahn, E.G.; Kierchner, T. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection, implications of histological and clinical parameters of gastritis. *Gut*, 41: 619-623, 1997.

15. Fernando, N.; Holton, J.; Vaira, D.; Desilva, M.; Fernando, D. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Sri Lanka as determined by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 2675-2676, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

16. Ferrari Jr., A.P.; Geocze, S.; Trabulsi, L.R. *Campylobacter pylori* in dyspeptic patients. *Ver. Hosp. S. Paulo – Esc. Paul. Med.*, 1: 65-68, 1989.

17. Gao, H.; Wang, J.Y.; Shen, X.Z.; Liu, J.J. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *World J. Gastroenterol.*, 6: 442-444, 2000.

18. Hammar, M.; Tysabewicz, T.; Wadstrom, T.; O'Toole, P.W. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 54-58, 1992.

19. Ho, G.Y.; Windsor, H.M. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase Chain Reaction tests. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 29(4): 903-915, 2000.

20. Kuipers, E.J.; Appelmelk, B.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51: 150-155, 1997.

21. Kuipers, E.J. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13: 3-11, 1999.

22. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 64: 31-39, 1965.

23. Magalhães, A.F.N.; Almeida, J.R.S.; Guerrazzi, F.; Yamanaka, A.; Mesquita, M.A.; Trevisan, M.A.S.; Ulson, C.M. Gastrite crônica associada ao *Helicobacter pylori* em pacientes com dispepsia não ulcerosa e com úlcera duodenal. *Ver. Paul. Méd.*, 109: 197-203, 1991.

24. Marshall, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin. Med.*, 2: 147-152, 2002.

25. Mello, E.S.; Melo, C.R. Prevalência dos diferentes tipos de gastrites em pacientes com queixas digestivas altas. *Arq. Gastroenterol.*, 29: 43-50, 1991.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

26. Metz, D.C.; Furth, E.E.; Faigel, D.O.; Kroser, J.A.; Alavil, A.; Barrett, D.M.; Montone, K. Realities of diagnosing *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: a case for non-invasive indirect methodologies. *Yale J. Biol. Med.*, 71: 81-90, 1998.

27. Nogueira, A.M.; Ribeiro, G.M.; Rodrigues, M.A.; Queiroz, D.M.; Mendes, E.N.; Rocha, G.A.; Barbosa, A.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Brazilian patients with gastric carcinoma. Am. J. Clin. Pathol., 100(3):236-239, 1993

28. Paoluzzi, O.A.; Rossi, P.; Bernardi, S.; Marchione, O.P.; Carnieri, E.; Luzzi, I.; Nardi, F.; Iacopini, F.; Paoluzzi, P. Polymerase Chain Reaction assay is more accurate than rapid urease test, histology and culture in the invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol. Intern.*, 12: 5-10, 1999.

29. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab., New York, 1989.

30. Saruc, M.; Demir, M.A.; Kucukmetin, N.; Kandiloglu, A.R.; Akarca, U.S.; Yuceyar, H. Histological and clinical predictive value of determination of tissue CagA status by PCR in *Helicobacter pylori* infected patients; results of the large population-based study in western Turkey. *Hepatogastroenterol.*, 49: 878-881, 2002.

31. Scholte, G.H.A.; Van Door, L.J.; Cats, A.; Bloemena, E.; Lindeman, J.; Quint, W.G.V.; Meuwissen, S.G.M.; Kuipers, E.J. Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. *Am. J. Gastroenterol.*, 97: 1687-1695, 2002.

32. Solari, C.A.; Araruna, R.P.N.; Eliane, R.M.F.; Hofer, E.; Dias, G.; Moraes, G.; Basilio, C.A.; Rodriguez, C.M.S.; Luna, L.L. *Helicobacter pylori* in dyspeptic children and adults: endoscopic, bacteriologic and histologic correlations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 89: 581-586, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

33. Thoreson, A.C.E.; Borre, M.; Andersen, L.P.; Jorgensen, F.; Kilerrich, S.; Scheibel, J.; Rath, J.; Krogfelt, K.A. *Helicobacter pylori* detection in human biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results. *FEMS Immun. Med. Microbiol.,* 24: 201-208, 1999.

34. Tsuji, S.; Tsujii, M.; Sun, W-H.; Gunawan, E.S.; Murata, H.; Kawano, S.; Hori, M. *Helicobacter pylori* and Gastric Carcinogenesis. *J. Clin. Gastroenterol.,* 25: S186-S197, 1997.

35. Vaira, D.; Malfertheiner, P.; Megraud, F.; Axon, A.T.; Deltenre, M.; Hirschl, A.M.; Gasbarrini, G.; O'Morain, C.; Garcia, J.M.; Quina, M.; Tytgat, G.N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new noninvasive antigen-based assay group. *Lancet,* 354: 330-333, 1999.

36. Varanasi, R.V.; Fantry, G.T.; Wilson, K.T. *Helicobacter,* 3: 188-194, 1998.

37. Weijnen, C.F.; Hendriks, H.A.; Hoes, A.W.; Verweij, W.M.; Verheij, T.J.M.; Wit, N.J. New immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* infection compared with urease test, ^{13}C breath test and histology: validation in the primary care seting. *J. Microbiol. Meth.,* 46: 235-240, 2001.

38. Wotherspoon, A.C. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br. Med. Bull.,* 54: 79-85, 1998.

39. Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Gutierrez, O.; Kim, J.G.; Kashima, K.; Graham, D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA e vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol.,* 37: 2274-2279, 1999.

40. Yasui, W.; Oue, N.; Kuniyasu, H.; Ito, R.; Tahara, E.; Yokozaki, H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer*, 4: 113-121, 2001.

10. ANEUPLOIDIES, DELETION AND OVEREXPRESSION OF *TP53* GENE IN INTESTINAL METAPLASIA OF PATIENTS WITHOUT GASTRIC CANCER

ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics ■ (2004) ■

CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS

Aneuploidies, deletion, and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer

Ana Cristina Gobbo César[a], Aldenis Albaneze Borim[b], Alaor Caetano[b], Patrícia Maluf Cury[b], Ana Elizabete Silva[a,*]

[a]*Departamento de Biologia, UNESP-Campus de São José do Rio Preto-SP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 5054-000-São José do Rio Preto, SP, Brazil*
[b]*Hospital de Base, Faculdade de Medicina, FAMERP, São José do Rio Preto-SP, Brazil*

Received 12 September 2003; received in revised form 8 January 2004; accepted 20 January 2004

Abstract Gastric carcinogenesis is attributable to interacting environmental and genetic factors, through a sequence of events including intestinal metaplasia. Using a fluorescence in situ hybridization technique, we investigated the occurrence of aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17, *TP53* gene deletion, and expression of p53 in 21 intestinal metaplasia (IM) samples from cancer-free patients and in 20 gastric adenocarcinoma samples. Aneuploidies were found in 71% (15/21) of the IM samples. Trisomy of chromosomes 7 and 9 occurred mainly in complete-type IM; in the incomplete type, trisomy of chromosomes 7 and 8 were more commonly found. The *TP53* gene deletion was observed in 60% (3/5) of the IM cases, and immunohistochemistry revealed p53 overexpression in 12% (2/17) of the analyzed IM cases. All gastric adenocarcinoma cases presented higher frequencies of trisomy or tetrasomy of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17. The *TP53* deletion was found in all three of the gastric adenocarcinoma analyzed for it, and immunohistochemistry detected overexpression of protein p53 in 80% (12/15) of the analyzed cases. Our study revealed for the first time the presence of aneuploidies of chromosomes 7, 8, 9, and 17 and of *TP53* gene deletion and overexpression in IM samples from cancer-free patients. These results suggest that IM and gastric adenocarcinoma may share the same genetic alterations. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gastric intestinal metaplasia (IM) has been considered a precancerous lesion, because of its frequent association with adenoma and well-differentiated adenocarcinoma [1]. This type of gastric cancer, classified as intestinal, is preceded by a sequence of morphologic events: chronic gastritis, atrophy, metaplasia, dysplasia, early carcinoma, and invasion [2].

Intestinal metaplasia has been categorized on the basis of morphology and enzyme histochemistry into complete and incomplete types [3]. Complete (type I) metaplasia is believed to carry the lowest risk of gastric cancer, whereas those forms of incomplete metaplasia that present large intestinal characteristics (type III metaplasia) have been closely linked to carcinoma by some authors [4–6], but not by others [7,8].

The development and progression of gastric tumors is generally driven by an accumulation of genetic alterations [9,10] that have also been detected in precancerous lesions, such as intestinal metaplasia adjacent to gastric carcinoma [2,6,11–14].

Among the genetic alterations, mutations in the *TP53* gene seem to be the key factor in the development of gastric carcinoma [6]. Other alterations, such as mutations in genes *APC* and *KRAS* and amplification of genes *ERBB2*, *MET*, and *CCNE1*, are important events involved in progression of gastric carcinogenesis [10,15,16].

Metaplasia has been associated with various inflammatory processes, the most frequent of which is *Helicobacter pylori* infection [17]. There are no reports in the literature about regression of intestinal metaplasia after *H. pylori* eradication. It is possible, however, that the eradication of *H. pylori* interrupts the progression of gastric carcinogenesis [18].

* Corresponding author. Tel.: +55-17-221-2384; fax: +55-17-221-2390.
E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br (A.E. Silva).

0165-4608/04/$ – see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cancergencyto.2004.01.017

Our objective was to verify the occurrence of aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 (which carry important genes involved in cell cycle control) and of *TP53* gene deletions by means of a fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, in addition to p53 expression, in early stages of gastric carcinogenesis, such as intestinal metaplasia in cancer-free patients. The results were compared with *H. pylori* infection and other clinicopathologic variables, and also with gastric adenocarcinoma, to investigate their potential relationship.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Intestinal metaplasia samples were obtained from 21 patients (11 men and 10 women) without gastric cancer through biopsy performed immediately after endoscopic evaluation. The mean age of these patients was 65 years (range 22–94 years). The metaplasia was histopathologically diagnosed and classified according to the Sydney classification [3]. Tumor specimens were collected shortly after surgery from 20 patients (16 men and 4 women) diagnosed with gastric adenocarcinoma who underwent gastrectomy. The mean age of these patients was 64 years (range 28–93 years). None of the patients had received either chemotherapy or radiotherapy before surgery. The tumors were histologically classified according to Lauren [19] as intestinal-type or diffuse. Biopsies of histologically confirmed normal and *H.* pylori–negative mucosa were obtained from 10 individuals with a mean age of 43 years (range 19–75 years). All specimens were collected at the Hospital de Base of São José do Rio Preto, SP, Brazil. All biopsies of normal mucosa and intestinal metaplasia were collected from the antrum region of the stomach; those of adenocarcinomas were collected mainly from the antrum and corpus. The study was approved by the Brazilian National Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all individuals.

2.2. DNA extraction and polymerase chain reaction for H. pylori diagnosis

DNA was extracted with the phenol–chloroform method, after digestion with proteinase K [20]. Polymerase chain reaction (PCR) assays were performed separately, using approximately 100 ng of total DNA and three different sets of oligonucleotides. One of these amplifies a 312-bp segment of the gene *CYP1A1* [21], as a DNA quality control; another amplifies a 298-bp product of the gene encoding species-specific *H. pylori* antigen [22]; and the third amplifies a 411-bp fragment corresponding to the urease A gene [23]. Positive and negative controls were used in all experiments. The PCR products were separated using 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis, followed by silver nitrate staining. The assay was considered positive when at least one of the bacterial PCR products was present [24].

2.3. FISH

All the samples were mechanically and enzymatically disaggregated with pepsin 0.008%, and the single-cell suspension obtained was treated with hypotonic solution (0.075 mol/L KCl) and fixed in methanol–acetic acid (3:1) overnight [25]. After washes in 60% acetic acid, the resulting cell suspension was dropped onto microscope slides and stored at −70°C until use for FISH assay.

FISH analysis was performed with centromere probes (CEP) for chromosomes 3, 7, and 8 directly labeled with digoxigenin and for chromosome 9 labeled with rhodamine. Dual-color FISH assays were performed using TP53 probe kits (Vysis, Downers Grove, IL): the LSI TP53 sequence labeled in SpectrumOrange, with the centromere probe for chromosome 17 labeled in SpectrumGreen. The hybridization and detection protocols followed the manufacturer's instructions.

For each probe, signals of ~300 intact and nonoverlapping nuclei were evaluated by two independent observers, according to the criteria described by Eastmond et al. [26]. Cutoff levels for aneuploidies were based on the upper-limit mean +4 SD of the normal gastric mucosa biopsies. By definition, for monosomy of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 the cutoff values were set at 10.0%, 11.0%, 11.0%, 8.5%, and 7.5%, respectively, and, for trisomy of the same chromosomes, at 10.0%, 9.0%, 8.0%, 8.5%, and 7.0%, respectively. Tetrasomy and pentasomy were absent in the control samples; thus, 2% was arbitrarily taken as the cutoff value.

The scores of the *TP53* gene were taken together with those of the chromosome 17 centromere. To analyze the *TP53* gene deletion, the gene-to-centromere (G/C) ratio was calculated for each case; that is, the total number of gene signals observed was divided by the total number of chromosome signals. In the control group (normal gastric mucosa), the mean ratio observed was 0.98 (balanced); so, in the cases with a G/C ratio less than 0.9, gene deletion was assumed.

2.4. Immunohistochemical analysis

To assess p53 protein accumulation, the commercially available monoclonal antibody DO-7 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) was used in combination with the anti-Ig second-stage antibody and the ABC kit (Novocastra) on sections of paraffin-embedded material. This antibody recognizes both mutant and wild-type conformations of the protein. For the positive control, we processed sections from a breast adenocarcinoma previously shown to express high levels of p53 protein. For the normal control, we used 8 of the 10 available normal gastric mucosa biopsies. For each sample, 500 epithelial cells were counted. The positivity index was defined as greater than 10% of cells showing nuclear staining, because in only four of the eight cases of normal gastric mucosa was the intensity of p53 protein expression low (range 0.2–4.0%).



2.5. Statistical analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were used to determine statistical significance. Values of P less than 0.05 were considered significant.

3. Results

Tables 1 and 2 show the results regarding aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17, *TP53* gene deletion and expression, and clinicopathologic data for the 21 intestinal metaplasia and the 20 gastric adenocarcinoma samples, respectively.

In intestinal metaplasia (Table 1), 15 of the 21 (71%) cases showed aneuploidies. Trisomy of chromosomes 7 and 9 occurred mainly in the complete type, whereas in the incomplete type chromosome 7 and 8 trisomies were more frequent. A significant association between aneuploidy and *H. pylori* infection was found ($P = 0.0105$). Sex, age, tobacco and alcohol consumption, and histology did not show any association with the evaluated chromosomes.

TP53 gene deletion was observed in 3 of the 5 (60%) metaplasia cases: IM05, IM11, and IM18. In these three cases, the gene-to-chromosome ratio ranged between 0.78 and 0.86. The concomitant analysis of the chromosome 17 centromere and *TP53* gene showed absence of one or two signals for chromosome 17 and *TP53* gene in 4.5 and 21.1% of the cells, respectively (data not shown).

Immunohistochemical analysis revealed p53 overexpression in 2 of the 17 (12%) metaplasia cases analyzed (IM05 and IM13), but with reduced stain intensity. One case was intestinal metaplasia of the complete type; the other, the incomplete type. No association was observed between *TP53* overexpression and the clinicopathologic variables investigated, including *H. pylori* infection.

All cases of gastric adenocarcinoma presented higher frequencies of trisomy or tetrasomy of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 (Table 2). A gain of all five chromosomes occurred in four intestinal-type and two diffuse-type cases. No association was observed between aneuploidy and location in the stomach, histologic type, or degree of differentiation of the gastric adenocarcinoma, nor with any other clinicopathologic parameter tested.

TP53 deletion was found in all three gastric adenocarcinoma samples analyzed, with a gene/centromere ratio ranging between 0.60 and 0.81. In these cases, the absence of one or two signals for chromosome 17 and gene *TP53* was observed in 2.4 and 32.7% of the cells, respectively (data not shown).

Immunohistochemical analysis detected overexpression of nuclear p53 protein in 12 out of 15 (80%) gastric adenocarcinoma samples. The nuclear staining was usually strong, with 15.6–90.4% immunostained nuclei. Seven out of 10 intestinal-type cases (70%) 5 of 5 diffuse-type cases (100%) showed p53 overexpression. No association was observed between this overexpression and *H. pylori* infection in gastric adenocarcinoma cases, nor with any other of the clinicopathologic parameters evaluated.

Table 1
Aneuploidy, *TP53* gene deletion and expression and clinicopathologic data in intestinal metaplasia (IM)

Case no.	Sex/age	Tobacco/alcohol consumption	*H. pylori*	Histology	Location	*TP53* deletion (G/C < 0.9	p53 IHC (> 10%)	Aneuploidy
IM01	F/50	−/−	−	CIM	A	ND	2.6	+9
IM02	F/54	+/−	−	CIM	A	0.90	0	+7/++7, +9/++9
IM03	F/67	−/−	−	CIM	A	ND	ND	—
IM04	M/75	−/+	−	CIM	A	0.92	0.6	—
IM05	M/74	+/+	−	CIM	A	0.86	13.0	+17
IM06	M/72	+/+	−	CIM	A	ND	1.2	—
IM07	F/73	+/+	−	IIM	A	ND	0.8	+7/++7
IM08	F/46	+/−	+	IIM	A	ND	0	+7, −9[a]
IM09	M/58	+/+	+	CIM	A	ND	0	—
IM10	F/70	−/−	+	CIM	A	ND	0.4	+7
IM11	F/68	−/−	+	CIM/IIM	A	0.78	0.8	−3, +3/++3, +7/++7, −8, −17
IM12	M/73	−/−	+	IIM	A	ND	0.4	+8
IM13	F/80	−/−	+	IIM	A	ND	20.8	+8[a]
IM14	M/94	+/+	+	IIM	A	ND	3.4	+7/++7[a]
IM15	M/22	−/−	+	IIM	A	ND	0.2	—
IM16	F/61	+/+	+	CIM/IIM	A	ND	10.0	—
IM17	M/75	+/−	+	IIM	A	ND	0	+7, +8, +17
IM18	M/47	+/+	+	CIM/IIM	A	0.78	ND	+7/++7, +8
IM19	M/57	−/−	+	IIM	A	ND	ND	+7, +17
IM20	M/75	−/−	+	CIM	A	ND	ND	+9
IM21	F/91	+/−	+	CIM	A	ND	2.2	+7[a]

Abbreviations: A, antrum; CIM, complete intestinal metaplasia; F, female; G/C, gene-to-chromosome ratio; IHC, immunohistochemistry; IIM, incomplete intestinal metaplasia; M, male; ND, not done.

[a] Chromosome 17 not analyzed.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Table 2
Aneuploidy, *TP53* gene deletion and expression and clinicopathologic data in gastric adenocarcinoma (GC)

Case no.	Sex/age	Tobacco/alcohol consumption	*H. pylori*	TNM classification/ stage	Location	*TP 53* deletion (G/C < 0.9)	P53 IHC (>10%)	Aneuploidy
Intestinal type								
GC03	M/62	+/+	−	T3N2M0/III	A/C	ND	ND	+7/++7,+8/++8,+9/++9,+17/++17
GC04	M/63	+/+	−	T4N1Mx/IV	A/C	ND	15.6	+3/++3, +7/++7, +8/++8, +9, +17/++17
GC05	M/62	+/+	−	NA	F/C	ND	20.8	+3/++3, +7, +8/++8, +9/−+9, −17
GC06	M/66	+/+	−	TxNxM1/IV	A	ND	2.0	+3/++3/ +7, −8, +9/++9, −17
GC07	M/51	+/+	−	T4N1Mx/IV	A	ND	49.0	+3/++3, +7/++7, +17
GC08	F/86	−/−	+	NA	F	0.81	88.2	+7/++7, +8/++8, +9/++9
GC09	M/76	+/+	+	T3N0M0/II	A	0.80	22.1	+7/++7, +9, +17/++17
GC10	M/71	+/+	+	T3N0M0/II	A/C	ND	22.4	+7/++7, +8/++8, +9[a]
GC14	M/72	+/+	+	TxNxM1/IV	A/C	ND	21.4	+7/++7, +8/++8, +9/−+9, +17
GC15	M/77	+/+	+	T4N1Mx/IV	A/C	ND	90.4	+3/++3, +7/++7, +8/++8, +9/++9, +17
GC17	M/93	+/+	+	NA	F/C	ND	86.4	+3, +7, +8, +17/++17
GC19	M/58	+/−	+	T4N1Mx/IV	A	ND	ND	+8, +9/++9, +17
Diffuse type								
GC01	M/71	+/−	−	NA	Ca	ND	88.4	+3/++3, +7/++7, +8/++8, +9[a]
GC11	F/28	−/−	+	T4N2/IV	A	0.60	ND	+3/++3, +7/++7, +8/++8, +9/−+9, +17/++17
GC12	M/83	+/+	+	T3N1/III	A/C/F	ND	32.8	+3/++3, +7/++7, +9, +17/++17
GC13	M/71	+/+	+	NA	Ca/C	ND	85.8	+3, +7/++7, +8/++8, +9/−+9[a]
GC16	F/66	−/−	+	NA	A/C	ND	ND	+3/++3, +7/++7, +8/++8, +9/++9, +17/++17
GC18	M/44	+/+	+	T1N0M0/I	A	ND	0	+7, +8/++8, +9, +17
GC20	F/38	−/−	+	T3N1M1/IV	A	ND	5.8	+3/++3, +7/++7, +17
Undifferentiated								
GC02	M/48	+/+	−	T3N2M0/III	A	ND	ND	+7, +8/++8, +9, +17/++17

Abbreviations: A, antrum; C, corpus; Ca, cardia; F, female; F, fundus; G/C, gene-to-chromosome ratio; L, location; M, male; M, metastasis; N, node; NA, data not available; ND, not done; T, tumor; TNM, tumor–node–metastasis.

[a] Chromosome 17 not analyzed.

4. Discussion

The role of intestinal metaplasia as a precancerous lesion is widely accepted, although reports showing a connection between intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma of the stomach are rare [13]. To address this problem, we investigated the occurrence of genetic alterations in intestinal metaplasia samples from patients without a cancer history and compared it with their occurrence in gastric adenocarcinoma samples. The frequency of aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17 found in the intestinal metaplasia cases (71%) was lower than in the gastric adenocarcinoma cases. Moreover, the intestinal metaplasia cases showed *TP53* gene deletion (60%) and nuclear overexpression of the p53 protein (12%).

Gomyo et al. [6] found cells with nuclear p53 protein in 5 of 23 (22%) specimens of intestinal metaplasia adjacent to gastric cancer, but they did not detect any numerical aberrations of chromosome 17, nor a *TP53* gene deletion in these cases. Thus, our results reveal (to our knowledge, for the first time) a high frequency of numeric alterations in intestinal metaplasia biopsies from patients with dyspepsia but still without gastric cancer. In intestinal metaplasia, the most frequent aneuploidies were trisomy of chromosomes 7, 8, and 9. As for most of the gastric adenocarcinoma cases, the gain (trisomy or tetrasomy) involved mainly chromosomes 7, 8, 9, and 17. This finding implies that, in many cases, cancer conserves the status in metaplasia lesions, suggesting a chronological connection between these two different lesions. Although the cancer cases studied by Kim et al. [14] harbored the same genetic abnormalities as the premalignant lesions, providing evidence of monoclonal expansion of mutated cells, they did not observe an identical mutation of the p53 gene in intestinal metaplasia and in carcinoma. Thus, these authors suggested that IM adjacent to gastric carcinoma, irrespective of its subtype, does not have the genetic alterations shown in their carcinoma tissues.

According to the hypothesis raised by Duesberg [27], cancer is initiated by random aneuploidy, generated either by a carcinogen or spontaneously. Aneuploidy inevitably generates abnormal phenotypes, as a consequence of abnormal dosages and expression of thousands of normal genes. The many abnormally expressed genes of cancer cells predicted by the aneuploidy hypothesis were recently confirmed experimentally [28–30]. Once cancer-specific aneuploidy has emerged, its inherent karyotypic instability [31] will generate ever-new phenotypes, including metastatic and drug-resistant ones. Preneoplastic aneuploidy may become the single most reliable indicator of incipient carcinogenesis [27,32].

Chromosomes 7, 8, 9, and 17 carry important genes, such as *MET* (7q31), *MYC* (8q24), *CDKN2A* (9p21), *TP53* (17p13), and *ERBB2* (17q21) [9,33–36], that act on cell

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

proliferation control and homeostasis of gastric mucosa turnover. Thus, an imbalance in the expression of these genes might lead to proliferative advantage. Mutations and overexpression of the *TP53* gene have been studied previously in subtypes of intestinal metaplasia. The incidence of *TP53* mutations in IM has been reported as ranging from 6.6 to 50%, but these reports included intestinal metaplasia adjacent to tumors [2,6,12,14,34], whereas we showed the presence of *TP53* gene deletion in 3 out of 5 cases, and overexpression of p53 protein in 2 out of 17 cases of IM in patients who had not yet developed gastric cancer.

Increased immunostaining of p53 can depend on either increased synthesis of wild-type protein or accumulation of mutated protein in the cell, since the antibody recognizes both types of the protein. Therefore, due to the increased frequency of immunostained nuclei and the greater staining intensity observed in IM, as compared to normal mucosa, we suggest that overexpression might be related to the mutated type of p53 protein.

The increase of detectable p53 in IM was shown by Ochiai et al. [12], who found that 2.5% of cases of incomplete-type IM were positive for the immunohistochemical p53 staining. Marinone et al. [37] and Petersson et al. [38] observed p53 overexpression in both gastritis and IM, probably related to an inflammatory response induced by *H. pylori* infection. Other authors, however, have failed to show any increased expression of p53 in these lesions [39,40]. In gastric cancer, a significant association between p53 overexpression and the metastatic spread to lymph nodes has been found by some authors [41,42], but not by others [43,44]. The contradictory results may be due to a difference in the antibodies used [44].

In the present study, we observed a significant association between aneuploidy and *H. pylori* infection only in intestinal metaplasia; however, no association was observed, in either IM or gastric adenocarcinoma, between p53 overexpression and other clinicopathologic parameters (such as sex, age, or tobacco and alcohol consumption) previously reported [44,45]. *Helicobacter pylori* infection has been linked to altered proliferation activity changes in various cell cycle regulating proteins. Petersson et al. [38] showed significantly increased proliferative activity and expression of p53 in subjects with *H. pylori* infection, compared with uninfected individuals. Persistent *H. pylori*-associated hyperproliferation increases the risk of irreversible genetic errors, and accumulation of such errors may lead to malignant transformation [37].

In two of the analyzed cases (IM05 and GC09), we observed the presence of *TP53* gene deletion concurrently with a gain of chromosome 17. Generally, in human tumors, the pattern of somatic mutations in the *TP53* gene consists of a mutation in one allele accompanied by loss or rearrangement of the second allele [46]. Another instance of preneoplastic alteration is Barrett esophagus, which carries an increased risk of esophageal adenocarcinoma. *TP53* gene mutations, loss of heterozygosity, and some deletions have been found in peritumoral Barrett epithelium and esophageal adenocarcinoma [47,48].

In conclusion, our results suggest that IM in cancer-free patients and well-differentiated adenocarcinoma may share the same genetic background, supporting the hypothesis that intestinal metaplasia may be a precursor of intestinal-type adenocarcinoma.

Acknowledgments

We thank Dr. Marileila Varella-Garcia for help with the FISH technique, and the second observers Lucimari Bizari Di-Cézar and Fernanda da Silva Manoel-Caetano for their help in the FISH scoring. This study was sponsored by the Brazilian Agency FAPESP.

References

[1] Correa P, Shiao Y-H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. Cancer Res 1994;54(Suppl):1941s–3s.
[2] Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. Am J Pathol 1994;144:511–7.
[3] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996;20:1161–81.
[4] Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. Gut 1991;32:1110–3.
[5] Tosi P, Filipe MI, Luzi P, Miracco C, Santopietro R, Lio R, Sforza V, Barbini P. Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. J Pathol 1993; 169:73–8.
[6] Gomyo Y, Osaki M, Kaibara N, Ito H. Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP. Int J Cancer 1996;66:594–9.
[7] Filipe MI, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kim V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. Int J Cancer 1994;57:324–9.
[8] Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer [Review]. Aliment Pharmacol Ther 1999;13(Suppl):3–11.
[9] Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. J Cancer Res Clin Oncol 1993;119:265–72.
[10] Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. Gastric Cancer 2001; 4:113–21.
[11] Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. Hum Pathol 1994;25:968–81.
[12] Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. Int J Cancer 1996;69:28–33.
[13] Kobayashi K, Okamoto T, Takayama S, Akiyama M, Ohno T, Yamada H. Genetic instability in intestinal metaplasia is a frequent event leading to well-differentiated early adenocarcinoma of the stomach. Eur J Cancer 2000;36:1113–9.
[14] Kim SS, Bhang CS, Min KO, Chae HS, Choi SW, Lee CD, Lim KW, Chung IS, Park DH. p53 mutations and microsatellite instabilities

in the subtype of intestinal metaplasia of the stomach. J Korean Med Sci 2002;17:490–6.

[15] Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of *c-met* and *c-erbB-2* in human gastric carcinomas. Cancer 2000;88:1894–902.

[16] Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. Am J Pathol 2000;156:585–94.

[17] Munoz N, Kato I, Peraza S, Lopez G, Carrillo E, Ramirez H, Vivas J, Castro D, Sanchez V, Andrade O, Buiatti E, Oliver W. Prevalence of precancerous lesions of the stomach in Venezuela. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996;5:41–6.

[18] Valle J, Gisbert JP. *Helicobacter pylori* infection and precancerous lesions of the stomach. Hepatogastroenterology 2001;48:1548–51.

[19] Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31–49.

[20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[21] Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. Cancer Lett 1996;106:229–33.

[22] Hammar M, Tysabewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:54–8.

[23] Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:192–200.

[24] Dzierzanowska D, Gzyl A, Rozynek E, Augustynowicz E, Wojda U, Celinska-Cedro UD, Sankowska M, Wadström T. PCR for identification and typing of *Helicobacter pylori* isolated from children. J Physiol Pharmacol 1996;47:101–14.

[25] Barril N, Carvalho-Sales AB, Tajara EH. Detection of numerical chromosome anomalies in interphase cells of benign and malignant thyroid lesions using fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 2000;117:50–6.

[26] Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. Mutat Res 1995;348:153–62.

[27] Duesberg PH. Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy? Cancer Genet Cytogenet 2003;143:89–91.

[28] Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science 1997;276:1268–72.

[29] Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alterations in the transcriptional program of human breast tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:12963–8.

[30] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002;415:530–6.

[31] Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:13692–7.

[32] Duesberg P, Li R, Rasnick D, Rausch C, Willer A, Kraemer A, Yerganian G, Hehlmann R. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. Cancer Genet Cytogenet 2000;119:83–93.

[33] Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Kimura T, Harada Y, Sugimura T, Terada M. Mutation frequency of the *p16/CDKN2* gene in primary cancers in the upper digestive tract. Cancer Res 1995;55:3421–3.

[34] Hao Y, Zhang J, Yi C, Qian W. Abnormal change of p53 gene in gastric and precancerous lesions and *APC* gene deletion in gastric carcinoma and near tissues. J Tongji Med Univ 1997;17:75–8.

[35] Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer 1999;24:299–305.

[36] Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of *c-met* and *c-erbB-2* in human gastric carcinomas. Cancer 1999;85:1894–902.

[37] Marinone C, Martinetti A, Mestriner M, Seregni E, Geuna M, Ferrari L, Strola G, Bonardi L, Fea E, Bombardieri E. p53 evaluation in gastric mucosa of patients with chronic *Helicobacter pylori* infection. Anticancer Res 2001;21:1115–8.

[38] Petersson F, Borch K, Franzen LE. Gastric epithelial proliferation and p53 and p21 expression in a general population sample: relations to age, sex, and mucosal changes associated with *H. pylori* infection. Dig Dis Sci 2002;47:1558–66.

[39] Lauwers GY, Wahl SJ, Melamed J, Rojas-Corona RR. p53 expression in precancerous gastric lesions: an immunohistochemical study of PAb 1801 monoclonal antibody on adenomatous and hyperplastic gastric polyps. [Erratum: Am J Gastroenterol 1994;89:300.] Am J Gastroenterol 1993;88:1916–9.

[40] Romiti A, Moretti A, Vecchione A, Muraro R, Feudi ML, Rinaldi V, Mancini R, Valli C, Mozzicafreddo A, Frati L, Tomao S. Analysis of p53 expression in precancerous and malignant gastric mucosa. Oncol Rep 1998;5:109–13.

[41] Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, Sugimachi K. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasizing to lymph nodes. Br J Cancer 1993;67:589–93.

[42] Yonemura Y, Fushida S, Tsugawa K, Ninomiya I, Fonseca L, Yamaguchi A, Miyazaki I, Urano T, Shiku H. Correlation of p53 expression and proliferative activity in gastric cancer. Anal Cell Pathol 1993;5:277–88.

[43] Joypaul BV, Newman EL, Hopwood D, Grant A, Qureshi S, Lane DP, Cuschieri A. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. J Pathol 1993;170:279–83.

[44] Ioachim E, Goussia A, Stefanou D, Agnantis NJ. Expression of p53 protein in gastric cancer: an immunohistochemical study with correlation to proliferation activity. Anticancer Res 1997;17:513–7.

[45] Fonseca L, Yonemura Y, De Aretxabala X, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. Oncology 1994;51:485–90.

[46] Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991;351:453–6.

[47] Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. *TP53* mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. Dis Esophagus 2003;16:83–9.

[48] Sanz-Ortega J, Hernandez S, Saez MC, Sierra E, Sanz-Ortega G, Torres A, Balibrea JL, Sanz-Esponera J, Merino MJ. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13.1 allelic deletions are potential markers of individuals with a high risk of developing adenocarcinoma in Barrett's epithelium without dysplasia. Hepatogastroenterology 2003;50:404–7.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

11. GENETIC ALTERATIONS IN BENIGN LESIONS: CHRONIC GASTRITIS AND GASTRIC ULCER

Genetic Alterations in Benign Lesions: Chronic Gastritis and Gastric Ulcer

Ana Cristina Gobbo César
PhD in Genetics, UNESP- São José do Rio Preto-SP, Full Professor, UNIP – Araçatuba-SP and Faculdades Católicas Salesianas – Araçatuba-SP, Brazil
Marília de Freitas Calmon
MSc in Genetics, Departament of Biology, UNESP- São José do Rio Preto-SP, Brazil
Patrícia Maluf Cury
PhD in Pathology, Assistant Professor of Pathology, FAMERP – São José do Rio Preto-SP, Brazil
Alaor Caetano
MD, Hospital de Base, FAMERP, São José do Rio Preto-SP, Brazil
Aldenis Albaneze Borim
MD, Hospital de Base, FAMERP, São José do Rio Preto-SP, Brazil

Ana Elizabete Silva*
PhD in Genetics, Assistant Professor, Department of Biology, UNESP – São José do Rio Preto-SP, Brazil

ACKNOWLEDGMENTS

This study was sponsored by the Brazilian Agency FAPESP.

Address correspondence to:
Ana Elizabete Silva
Departamento de Biologia - UNESP – Campus de São José do Rio Preto
Rua Cristóvão Colombo, 2265
15054-000 – São José do Rio Preto, SP-Brazil
E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br
Phone: +55 (17) 221-2384 FAX: +55 (17) 221-2390

American Journal of Gastroenterology, 2004, submitted.

Abstract

Objectives: Gastric carcinogenesis is attributable to a sequence of events going from chronic gastritis up to dysplasia, as a result of exposure to a variety of factors such as *Helicobacter pylori* infection. This study investigated the occurrence of chromosome 3, 7, 8, 9, and 17 aneuploidies, *TP53* gene deletion and p53 protein expression in chronic gastritis, atrophic gastritis and gastric ulcer, and their association with *H. pylori* infection.

Methods: Gastric biopsies from normal mucosa (NM) [n=10], chronic gastritis (CG) [n=38], atrophic gastritis-CAG (n=13) and ulcer-GU (n=21) were studied by FISH and immunohistochemical techniques, and these features were associated with *H. pylori* infection, diagnosed by the PCR molecular technique.

Results: Aneuploidies were increasingly found from CG (21%) to CAG (31%) and to GU (62%), involving mainly monosomy and trisomy 7, trisomies 7 and 8, and trisomies 7 and 17, respectively. An association was found between *H. pylori* infection and aneuploidies in CAG (p=0.0143) and GU (p=0.0498). No *TP53* deletion was found in these gastric lesions, but p53-positive immunoreactivity was detected in 45% (5/11) and 12% (2/17) of cases of CG and GU, respectively. However, there was no significant association between p53 expression and *H. pylori* infection.

Conclusions: The occurrence of aneuploidies in benign lesions evidences chromosomal instability in early stages of gastric carcinogenesis associated with *H. pylori* infection. The increase of p53 protein expression in CG and GU may be due to overproduction of the wild-type protein related to an inflammatory response in mucosa induced by other factors, since no deletion in the *TP53* gene or any association with *H. pylori* were observed.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Introduction

Gastric carcinogenesis is considered a multistep process, going from normal gastric mucosa with epithelial hyperproliferation to chronic gastritis with variable degrees of atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia, and ultimately carcinoma [1]. In most cases, chronic gastritis, frequently associated with *H. pylori* infection, precedes the formation of gastric cancer, and a great proportion of the clinical tumors occur in connection with severe atrophic gastritis and extensive intestinal metaplasia [2]. Efforts have been made to identify changes of a precancerous nature in the gastric epithelium. The identification of such changes may help to prevent the occurrence of gastric cancer [3].

Gastritis may also play a role in the pathogenesis of peptic ulcer disease by impairing the resistance of the gastric mucosa and consequently increasing the risk of ulcer [3]. In practice, the cancer risk in peptic ulcer disease applies exclusively to gastric ulcer. Epidemiological data on the incidence of peptic ulcer disease with gastric cancer suggest that ulcer disease may not be an important precursor of gastric cancer. However, possible links between the two are suggested by a similar relationship with chronic gastritis [2].

H. pylori infection is accepted as the major causal factor for the histological features leading to severe gastroduodenal disease, including chronic gastritis, peptic ulcer disease, intestinal-type gastric cancer and gastric MALT lymphoma. Only a small proportion of the infected cases will develop clinically significant disease. About one in 5-6 individuals will develop peptic ulcer disease during their lifetime, and < 1% will develop gastric cancer [4].

It is particularly important to recognize and define the characteristics of benign and pre-malignant lesions, for application to studies of carcinogenesis and cancer prevention. Hence, the aim of this study was to verify the occurrence of aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17, and of *TP53* gene deletions using the FISH technique, besides p53

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

expression, in benign lesions such as chronic gastritis, atrophic gastritis and gastric ulcer. The results were associated with *H. pylori* infection and other clinicopathological features, such as sex, age, smoking and alcohol consumption.

Materials and Methods

Samples

Chronic gastritis (CG), atrophic gastritis (CAG) and gastric ulcer GU) samples were obtained, respectively, from 38 (13 males and 25 females), 13 (7 males and 6 females) and 21 patients (15 males and 6 females) by biopsy performed during endoscopic evaluation. The mean age of these patients was 53 years (ranging from 2 to 89 years). Biopsies of histologically confirmed normal and *H. pylori*-negative mucosa (NM) were obtained from 10 healthy individuals (2 males and 8 females) with a mean age of 43 years (ranging from 19 to 75 years). All specimens were collected at the Hospital de Base of São José do Rio Preto, SP, Brazil. All biopsies of normal mucosa and gastric ulcer were collected from the antrum region of the stomach, whereas those of chronic gastritis and atrophic gastritis were mainly collected from the antrum and corpus. The study was approved by the National Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all individuals.

Histology

Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used for the diagnosis and classification of gastritis [5]. A modified Giemsa staining technique was used to visualize *H. pylori*.

DNA extraction and PCR for *H. pylori* diagnosis

DNA was extracted by the phenol-chloroform method, after digestion with proteinase K [6]. PCR assays were performed separately, with approximately 100ng of total DNA, using three different sets of oligonucleotides. One of them amplifies a 312bp segment of the gene *CYP1A1* [7], as a DNA quality control, the other amplifies a 298bp product of the gene encoding species-specific *H. pylori* antigen [8], and the last one amplifies a 411bp fragment corresponding to the urease A gene [9]. Positive and negative controls were used in all experiments. PCR products were separated by 7.5% polyacrylamide-gel electrophoresis, followed by silver nitrate staining. The assay was considered positive when at least one of the bacterial PCR products was present [10].

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Nuclear suspensions from all samples were obtained by mechanical and enzymatic disaggregation. The suspensions were dropped onto microscope slides and stored at -70°C until use for FISH assay.

FISH analysis was performed with centromere probes (CEP) for chromosomes 3, 7, and 8 directly labeled with digoxigenine, and for chromosome 9 labeled with rhodamine. Dual-color FISH assays were performed using *TP53* probe kits (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA), thus the LSI *TP53* sequence labeled in Spectrum Orange, with the centromere probe for chromosome 17 labeled in Spectrum Green. The hybridization and detection protocols followed the manufacturer's instructions.

For each probe, signals of about 300 intact and non-overlapping nuclei were evaluated by two independent observers, according to the criteria described by Eastmond *et*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

al. [11]. Cutoff levels for aneuploidies were based on the upper-limit mean +4 SD of the normal gastric mucosa biopsies. By definition, for monosomy of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17, the cutoff values were set at 10.0%, 11.0%, 11.0%, 8.5%, and 7.5%, respectively, and, for trisomy of the same chromosomes, at 10.0%, 9.0%, 8.0%, 8.5%, and 7.0%, respectively. Tetrasomy and pentasomy were absent in the normal mucosa samples; thus, 2% was arbitrarily taken as cutoff value.

The *TP53* gene scores were taken together with those of the chromosome 17 centromere. To analyze the *TP53* gene deletion, the gene-to-chromosome ratio (G/C) was calculated for each case, that is, the total number of gene signals observed was divided by the total number of chromosome signals.

Immunohistochemical analysis

To assess p53 protein accumulation, the commercially available monoclonal antibody DO-7 (Novocastra, Newscastle, UK) was used in combination with the anti-Ig second-stage antibody and the ABC kit (Novocastra) on sections of paraffin-embedded material. This antibody recognizes both mutant and wild-types of the protein. As positive control, sections from a breast adenocarcinoma were processed, previously shown to express high levels of p53 protein. For each sample, 500 epithelial cells were counted, and the positivity index was defined as >10% of cells showing nuclear staining.

Statistical analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were used to determine statistical significance. Values of p less than 0.05 were considered significant.



Results

Table 1 and 2 show the results regarding aneuploidies of chromosomes 3, 7, 8, 9, and 17, *TP53* gene deletion, p53 expression, and clinicopathological data of the 10 samples of normal gastric mucosa (NM) and of the cases with benign lesions (chronic gastritis, atrophic gastritis and gastric ulcer) that showed some genetic alteration, respectively. Since, by the FISH technique, the *H. pylori*–negative normal mucosa cases showed from 89% to 99% of nuclei with disomy for chromosomes 3, 7, 8, 9 and 17, they were considered without aneuploidy. The gene/chromosome ratio (G/C) to *TP53* gene deletion ranged from 0.97 to 0.99 (mean of 0.98), so, in the cases of benign lesions with a G/C ratio <0.90, gene deletion was assumed. Low-intensity nuclear p53 protein immunoreactivity was observed only in 4 of the 8 evaluated cases of normal gastric mucosa, ranging from 0.2 to 4.0% of the immunostained nuclei.

In CG, CAG and GU, increasing frequencies of aneuploidies were detected in 8 out of the 38 (21%), 4 out of the 13 (31%), and 13 out of the 21 (62%) cases, respectively. The samples showed mainly monosomy and trisomy of chromosome 7 in CG, trisomy of chromosomes 7 and 8 in CAG, whereas in GU trisomy of chromosomes 7 and 17 was more frequent. About 75% (6/8) of CG, 100% (4/4) of CAG and 69% (9/13) of GU with aneuploidies were *H. pylori*-positive (Table 3). However, association between aneuploidies and *H. pylori* infection was found only in CAG ($p=0.0143$) and GU ($p=0.0498$), but parameters such as sex, age, smoking and alcohol consumption did not show any association with the occurrence of aneuploidies.

No *TP53* gene deletion was found, whether in CG, in CAG or in GU, but p53-positive immunoreactivity was present in 45% (5/11) and 12% (2/17) of the cases of CG and GU, respectively, ranging from 12 to 47.2% of p53-positive nuclei. No significant

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

association was found between p53 overexpression and *H. pylori* infection, or with the other clinicopathological features investigated.

Discussion

The development of gastric carcinoma is considered as a multistage progressive process due to alterations in oncogenes, tumor suppressor genes, cell-adhesion molecules, telomerase, as well as to a genetic instability at several microsatellite loci, possibly related to *H. pylori* infection [12,13]. The mechanisms leading to mutations, hyperproliferation and apoptosis of the epithelial cells are triggered very early in the *H. pylori* gastritis cascade, resulting in atrophic gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancer [2,12].

The identification of genetic alterations in biopsies of the epithelium of patients with gastric dyspepsia may aid to prevent the occurrence of gastric cancer. FISH is an accurate and sensitive technique for the detection of aneuploidies in interphase nuclei from biopsies, making it possible to identify changes in early stages of benign lesions such as gastritis and gastric ulcer. Such changes may be used as marker chromosomes to estimate the risk of gastric cancer.

A few studies evaluated aneuploidy in epithelial lesions of the stomach using DNA flow cytometry. In chronic and atrophic gastritis, Weiss *et al.* [14] found DNA aneuploidy in 5.2% and in 8.5% of the cases, respectively. Teodori *et al.* [15] observed aneuploidy in 9 out of 20 (45%) chronic atrophic gastritis specimens, whereas Abdel-Wahab *et al.* [3] detected quantitative DNA alterations in 18.8% of atrophic gastritis cases.

To our knowledge, studies about aneuploidy in gastric ulcer are not available in the literature. Our study using the FISH technique showed increasing aneuploidy from chronic gastritis (21%) to atrophic gastritis (31%) and to gastric ulcer (62%). The more frequent

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

aneuploidies were monosomy and trisomy 7 in CG, trisomies 7 and 8 in CAG, and trisomies 7 and 17 in GU. Moreover, in CAG and GU these aneuploidies occurred more frequently in the *H. pylori*-positive cases, probably being responsible for the chromosomal instability observed.

Chromosomes 7, 8 and 17 carry several important genes involved in the control of cell proliferation, such as *EGFR* (7p12-13), *c-MYC* (8q24), *HER-2/neu* (17q21), and *TP53* (17p13). Therefore, the presence of trisomy of these chromosomes in precancerous gastric lesions may confer proliferative advantage, increasing the risk of progression to gastric cancer.

The development of carcinoma in cases of gastric ulcer disease during long-term H(2)-blocker treatment is slowly increasing, and ulcers that require such treatment exhibit the characteristics of intractable conditions, including linear ulcers, simultaneous gastric and duodenal ulcers, immature intestinal metaplasia of the gastric epithelium, and atrophic gastritis accompanied by multiple ulcer cicatrices [16]. Hence, especially in these cases of gastric ulcer it is suggested that a genetic study should be performed, to allow early detection of malignant transformation.

Inactivation of the *TP53* gene by mutation or deletion occurs as an initial event in gastric tumorigenesis, possibly associated with *H. pylori* infection [13,17,18]. Using the FISH technique, Gomyo *et al.* [19] detected a *TP53* deletion in 10 out of 13 (77%) cases of gastric carcinoma.

In the present study, no *TP53* deletion was found in either chronic gastritis (15 cases), atrophic gastritis (3 cases) or gastric ulcer (3 cases), although it was observed in a previous study of our group [20] in 3/5 (60%) of the intestinal metaplasia and in 3/3



(100%) of the adenocarcinoma cases, corroborating the hypothesis that these pathologies share genetic alterations and progress jointly.

The p53 gene products are known to regulate cell growth and proliferation. Wild-type p53 protein suppresses cell growth by controlling the G1 checkpoint, and has several additional physiological functions, including control of the G2 cell checkpoint, as well as mediation of apoptosis [21]. The products of wild-type p53 can hardly be detected in normal cells by immunohistochemical techniques because of their short half-life. However, *TP53* gene alterations induced by many missense and point mutations may modify the conformation and stabilize the proteins, leading to their accumulation [22]. Therefore, overexpression of a p53 protein is a useful marker for detecting a mutated p53 gene [23,24].

To date, an increase of detectable p53 in our samples was observed in 5/11 (45%) of chronic gastritis and 2/17 (12%) of gastric ulcer cases, probably due to overexpression of the wild-type protein, related to an inflammatory response of the mucosa induced by other factors, since no association with *H. pylori* infection was observed. The lack of association between p53 expression and *H. pylori* infection may also be due to the smaller number of specimens from benign lesions evaluated.

Although some studies have described p53 protein accumulation in benign gastric lesions [12,25-28], their association with *H. pylori* infection in gastric carcinogenesis is not yet clear. Whereas some authors reported overexpression of p53 protein in *H. pylori*-positive chronic gastritis and intestinal metaplasia [12,25,27,28], Craanen *et al.* [29] did not observe p53 protein accumulation in either atrophic gastritis or intestinal metaplasia and suggested that this process may be a late event in gastric carcinogenesis. On the other hand, Lan *et al.* [12] reported that *H. pylori* infection might cause severe imbalance of



proliferation and apoptosis in the precancerous lesions first, leading to p53-Rb tumor suppressor system mutation and telomerase reactivation, and finally causing gastric cancer.

Finally, our study clearly showed the occurrence of aneuploidies that increased with the progression of lesions from chronic gastritis to atrophic gastritis and to gastric ulcer, frequently associated with *H. pylori* infection, evidencing chromosomal instability in benign and precancerous gastric lesions that may play an important role in gastric carcinogenesis. We did not observe *TP53* gene deletion in these samples, but p53 protein overexpression was detected in some cases of chronic gastritis and gastric ulcer. In these cases it was assumed that an accumulation of wild-type p53 protein had occurred, probably due to an inflammatory response induced by other factors than *H. pylori* infection.



References

1. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992;52:6735-40.

2. Sipponen P, Hyvärinen H, Seppäla K, Blaser MJ. Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:61-71.

3. Abdel-Wahab M, Attallah AM, Elsahl MF, Eldousoky I, Zalata KR, El-Ghawalby NA, Gad El-Hak N, El-Ebidy G, Ezzat F. Correlation between endoscopy, histopathology, and DNA flow cytometry in patients with gastric dyspepsia. Hepatogastroenterol 1996;43:1313-1320.

4. Go MF. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:3-15.

5. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney Sistem. International workshop on the histopathology of gastritis. Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996;20:1161-81.

6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.

7. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the GSTM and GSTT1 genes in human. Cancer Lett 1996;104:229-233.

8. Hammar M, Tysabewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;38:54-8.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

9. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:192-200.

10. Dzierzanowska D, Gzyl A, Rozyned E, Augustynowicz E, Celinska-Cedro UD, Sankowska M, Wadström T. Polymerase chain reaction for identification and typing of *Helicobacter pylori* isolated from children. J Physiol Pharmaco 1996;47(1):101-14.

11. Eastmond DA, Schler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. Mut Res 1995;348:153-162.

12. Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. World J Gastroenterol 2003;9:54-8.

13. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. IARC Sci Publ 2004;157:327-49.

14. Weiss H, Gutz HJ, Schroter J, Wildner GP. DNA distribution pattern in chronic gastritis. I. DNA ploidy and cell cycle distribution. Scand J Gastroenterol 1989;24:643-648.

15. Teodori L, Capurso L, Cordelli E, De Vita R, Koch M. Cytometrically determined relative DNA content as indicator of neoplasia in gastric lesions. Cytometry 1984;5:63-70.

16. Aoki T, Takayama S, Nimura H, Tsutsumi J. Effects of medical treatment on gastric mucosal abnormalities in gastroduodenal ulcer disase. World J Surg 2000;24(3):321-7.

17. Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Mitsuishi Y, Oda T, Nizhizono A, Nasu M. Analysis of p53 gene mutations in *Helicobacter pylori*-associated gastritis mucosa in endoscopic biopsy specimens. Scand J Gastroenterol 1999;34:474-7.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

18. Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. Dig Dis Sci 2002;47:107-13.

19. Gomyo Y, Osaki M, Kaibara N, Ito H. Numerical aberration and point mutations of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP. Int J Cancer 1996;66:594-9.

20. César ACG, Borim AA, Caetano A, Cury PM, Silva AE. Aneuploidies, deletion and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. Cancer Genet Cytogenet (*in press*).

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

22. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hcs70-p53 complex with an altered half-life. Mol Cell Biol 1988;8:531-9.

23. Rodrigues NR, Roman A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7555-9.

24. Chang F, Syrjanen S, Kurvianen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. Am J Gastroenterol 1993;88:174-86.

25. Marinone C, Martinetti A, Mestriner M, Seregni E, Geuna M, Ferrari L, Strola G, Bonardi L, Fea E, Bombardieri E. p53 Evaluation in gastric mucosa of patients with chronic *Helicobacter pylori* infection. Anticancer Res 2001;21:1115-1118.

26. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. BMC Cancer 2002;2:8.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

27. Unger Z, Molnar B, Pronai L, Szaleczky E, Zagoni T, Tulassay Z. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15(4):389-93.

28. Jorge O, Cuello Carrion FD, Jorge A, Ciocca DR. *Helicobacter pylori* infection affects the expression of PCNA, p53, c-erbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa. Rev Esp Enferm Dig 2003;95(2):97-104.

29. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJA, Tytgat GNJ. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. Gut 1995;36:848-52.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Table 1 – Aneuploidy, *TP53* gene deletion and expression, and clinicopathological data in normal gastric mucosa (NM) subjects.

Case	Sex/ Age	Smoking/ Alcohol consumption	*H. pylori*	L	*TP53* deletion (G/C < 0.9)	p53 IHC (> 10%)
NM01	M/35	-/-	–	A	0.98	0.2
NM02	F/58	-/-	–	A	0.97	0
NM03	F/19	-/-	–	A	*	*
NM04	F/22	-/-	–	A	*	*
NM05	F/75	-/-	–	A	0.98	0
NM06	M/38	-/-	–	A	0.99	0
NM07	F/20	-/-	–	A	0.99	0
NM08	F/56	-/-	–	A	*	2.4
NM09	F/66	-/-	–	A	*	4.0
NM10	F/42	-/-	–	A	*	0.4

M= male; F= female; L=location; – = negative; + = positive; A=antrum; * = not evaluated

Table 2 – Aneuploidy, *TP53* gene deletion and expression, and clinicopathological data in chronic gastritis (CG), atrophic gastritis (CAG) and gastric ulcer (GU) cases.

Case	Sex/ Age	Smoking/ Alcohol consumption	*H. pylori*	L	*TP53* deletion (G/C < 0.9)	p53 IHC (> 10%)	Aneuploidy
Chronic gastritis							
CG01	F/22	-/-	–	A	0.93	2.0	
CG03	M/32	-/-	–	A	*	*	-7, +8*
CG05	M/10	-/-	–	A	0.98	0.8	
CG06	M/02	-/-	–	A	0.97	15.6	
CG09	F/02	-/-	–	C	0.95	0	
CG11	F/40	+/-	–	A	0.98	*	
CG13	F/56	+/-	+	C	0.95	31.4	
CG14	F/36	+/-	+	A	0.94	0	-7
CG16	M/89	+/+	+	C	0.98	12.0	
CG02	F/54	-/+	–	A	0.90	15.0	+7
CG05	M/60	+/+	+	A	0.96	*	
CG06	F/48	-/-	+	A	0.94	*	
CG13	F/41	+/-	+	A	*	*	+7*
CG14	M/44	+/-	+	A	0.95	*	+9
CG15	F/47	+/-	+	A	0.96	5.6	
CG16	F/57	-/-	+	A	0.96	12.8	
CG17	F/34	+/+	+	A	*	*	+7
CG18	M/54	+/+	+	A	*	*	+3, +7, +17
CG19	F/58	-/-	+	A	0.96	0.8	-7
Atrophic gastritis							
CAG03	M/80	+/-	–	C	0.90	2.2	
CAG05	F/84	-/-	+	A	*	*	+8*
CAG07	M/65	+/+	+	A	*	*	+7, +8
CAG08	M/57	-/+	+	A	*	*	+7 / +7+7
CAG09	M/52	+/+	+	A	0.93	3.6	
CAG13	M/77	+/-	+	A	*	*	+9
Gastric ulcer							
GU01	M/79	-/+	–	A	0.94	0	
GU02	M/73	+/+	–	A	*	0.8	+17
GU03	M/52	+/+	–	A	*	47.2	+9 / +9+9
GU04	M/78	+/+	–	A	*	9.6	+7, +8*
GU05	M/64	+/+	–	A	*	0.8	-7*
GU06	M/43	+/-	+	A	*	0	+7 / +7+7, +8 –9, +17 / +17+17
GU07	F/51	+/+	+	A	*	1.2	+3 / +3+3
GU08	M/71	+/+	+	A	*	0	
GU09	F/72	-/-	+	A	0.97	14.6	
GU10	M/28	+/+	+	A	*	6.0	
GU11	M/68	+/+	+	A	0.95	0.8	
GU12	M/28	+/+	+	A	*	3.2	-7, -9, -17
GU13	M/48	+/+	+	A	*	0	
GU14	F/83	-/-	+	A	*	1.2	-9
GU15	M/43	+/+	+	A	*	6.4	-7, -8
GU16	F/82	-/-	+	A	*	0	-8
GU17	M/63	+/+	+	A	*	0	
GU18	M/58	+/+	+	A	*	*	+7 / +7+7
GU19	F/62	+/-	+	A	*	*	+7 / +7+7, +8, +17 / +17+17
GU20	M/63	+/+	+	A	*	*	+9 / +9+9*

M= male; F= female; L=location; – = negative; + = positive; A=antrum; C=corpus; * = not evaluated; #= chromosome 17 not analyzed.



Table 3 – Association between aneuploidy, p53 overexpression and *H. pylori* infection in benign gastric lesions.

Diagnosis	Samples (N)	*H. pylori* positive	Aneuploidy Hp-	Hp+	p53 overexpression Hp-	Hp+
Chronic gastritis	38	19/38 (50%)	2/8(25%) 6/8(75%) p=0.0660		2/5(40%) p=0.6855	3/5(60%)
Atrophic gastritis	13	9/13 (69%)	0 4/4(100%) p=0.0143*		not have overexpression	
Gastric ulcer	21	16/21 (76%)	4/13(31%) 9/13(69%) p=0.0498*		1/2(50%) p=0.5147	1/2(50%)

*= significant difference ($p < 0.05$)

12. *GSTT1*, *GSTM1* AND *CYP2E1* GENETIC POLYMORPHISMS IN GASTRIC CANCER AND CHRONIC GASTRITIS IN A BRAZILIAN POPULATION

PO Box 2345, Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
E-mail: wjg@wjgnet.com www.wjgnet.com

World J Gastroenterol 2004;10(9):1240-1245
World Journal of Gastroenterology
Copyright ©2004 by The WJG Press ISSN 1007-9327

• GASTRIC CANCER •

GSTT1, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population

Jucimara Colombo, Andréa Regina Baptista Rossit, Alaor Caetano, Aldenis Albaneze Borim, Durval Wornrath, Ana Elizabete Silva

Jucimara Colombo, Ana Elizabete Silva, Departamento de Biologia, UNESP-Campus de São José do Rio Preto-SP, Brazil
Andréa Regina Baptista Rossit, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil
Alaor Caetano, Aldenis Albaneze Borim, Hospital de Base, Faculdade de Medicina, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil
Durval Wohnrath, Fundação Pio XII, Barretos, Brazil
Supported by the Brazilian Agency CAPES
Correspondence to: Ana Elizabete Silva, Departamento de Biologia, UNESP - Campus de São José do Rio Preto, Rua Cristovão Colombo, 2265, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP-Brazil. anabete@bio.ibilce.unesp.br
Telephone: +55-17-2212384 **Fax:** +55-17-2212390
Received: 2003-09-23 **Accepted:** 2003-12-30

Abstract

AIM: To test the hypothesis that, in the Southeastern Brazilian population, the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms and putative risk factors are associated with an increased risk for gastric cancer.

METHODS: We conducted a study on 100 cases of gastric cancer (GC), 100 cases of chronic gastritis (CG), and 150 controls (C). Deletion of the *GSTT1* and *GSTM1* genes was assessed by multiplex PCR. *CYP2E1/PstI* genotyping was performed using a PCR-RFLP assay.

RESULTS: No relationship between *GSTT1/GSTM1* deletion and the *c1/c2* genotype of *CYP2E1* was observed among the three groups. However, a significant difference between CG and C was observed, due to a greater number of *GSTT1/GSTM1* positive genotypes in the CG group. The *GSTT1* null genotype occurred more frequently in Negroid subjects, and the *GSTM1* null genotype in Caucasians, while the *GSTM1* positive genotype was observed mainly in individuals with chronic gastritis infected with *H pylori*.

CONCLUSION: Our findings indicate that there is no obvious relationship between the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms and gastric cancer.

Colombo J, Rossit ARB, Caetano A, Borim AA, Wornrath D, Silva AE. *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1240-1245
http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1240.asp

INTRODUCTION

In Brazil, gastric cancer occupies the fifth position, with an estimates of 20 640 new cases and 11 145 deaths in 2003, as a consequence of late diagnosis, and also of its high recurrence rate[1]. Gastric carcinogenesis is a multi-step process, involving both genetic and environmental factors[2]. Among the latter, the most outstanding are dietary factors[3], smoking[4]; drinking[5]; *Helicobacter pylori* infection[6], and the occurrence of previous gastric injuries[7]. Correa[8] and Stemmermann[9] suggested, in separate studies, a general hypothesis of pre-cancerous sequences for gastric carcinogenesis, especially for the intestinal types, namely superficial gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer.

Over the last decades, several studies have revealed the participation of polymorphisms in metabolic and DNA repair enzymes, that might confer different degrees of susceptibility to cancer. Among these metabolic enzyme polymorphisms, the most outstanding are those of cytochrome P-450 (CYPs), glutathione-S-transferases (GSTs), and N-acetyltransferases (NATs)[10-12].

Concerning the superfamily of metabolic enzymes, both *CYP2E1* gene, a member of the cytochrome P-450 superfamily, and the *GSTT1* and *GSTM1* genes, that catalyze the conjugation reaction of glutathione with electrophilic compounds, exhibit polymorphisms which have been considered as potentially important modifiers of the individual risk for environmentally induced cancers, including cancer of stomach[13-17]. Subjects with null *GSTT1* and *GSTM1* have a decreased capability of detoxifying some carcinogens, among wich N-nitrous compounds are involved in stomach carcinogenesis[14].

Previous studies have shown inconclusive or controversial findings on associations between polymorphism of these genes and cancer susceptibility, due to the different types of cancer investigated and the diverse ethnic origin of the populations studied. Increased risk for oral[18], nasopharyngeal[19], and pulmonary[20] cancer was observed in carriers of the rare allele *CYP2E1*, while an increased risk for esophageal cancer was observed in carriers of the common allele[21]. On the other hand, *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes have been linked to an increased risk for cancer of the lung, bladder and colon, and other specific sites[11,17].

The relationship between *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* gene polymorphisms and the risk for gastric cancer is not obvious. Many investigations were conducted on Asian populations[22-36]. The Brazilian population is characterized by heterogeneous ethnic groups, emphasizing the need to investigate the frequency of these metabolizing genes and their association with gastric cancer.

We performed a case-control study to evaluate the association between the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms in patients from the Brazilian Southeast with gastric cancer or chronic gastritis, a lesion that increases the risk for gastric cancer by 10%[37]. We also explored the potential interactions between the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms and demographic risk factors.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

We conducted a simultaneous case-control study for gastric cancer and chronic gastritis. The case groups comprised 100 patients with histopathologically confirmed diagnosis of gastric



adenocarcinoma (73 men and 27 women) with a mean age of 60 years (ranging from 28 to 93 years), and 100 patients with histopathologically confirmed diagnosis of chronic gastritis (54 men and 46 women) with a mean age of 53 years (ranging from 19 to 86 years), respectively. These subjects were recruited from the "Hospital de Base", São José do Rio Preto, SP, and from the Pio XII Foundation, Barretos, SP, Brazil. The pathological diagnoses of gastric cancer and chronic gastritis were made according to criteria proposed by Lauren[38] and the Sidney classification[39], respectively. *H pylori* infection was histologically established by Giemsa staining. The control group consisted of 150 healthy volunteers (90 men and 60 women), with a mean age of 54 years (ranging from 20 to 93 years), with no previous history of gastric disease, matched to the patients with respect to age, gender and ethnicity. Most controls were blood donors. Epidemiological data on the study population were collected through a standard interviewer-administered questionnaire, which included questions about current and past occupation, ethnicity, life-long smoking habits and alcohol consumption, and family history of cancer.

The human subject protocol was approved by the Research Ethics Committee of the IBILCE-UNESP, and written informed consent was obtained from all subjects.

Blood sampling and DNA extraction

Whole blood was collected and put into EDTA-coated tubes. Lymphocytes were isolated, transferred to tubes, and assigned a unique identifier code. DNA was then extracted using a non-organic extraction procedure, and stored at -20 ℃ until use for genotyping[40].

Genotype analysis

The *GSTT1* and *GSTM1* genes were determined simultaneously in a single assay, using a PCR multiplex protocol, where part of exon 7 of the constitutional gene *CYP1A1* was co-amplified as an internal control.

PCR was performed in 25 μL reaction buffer containing 0.5 mmol/L of dNTPs, 2.0 mmol/L of $MgCl_2$, 12.5 pmol of each primer, about 150 ng DNA, and 1.25 U of thermostable Taq DNA polymerase, using a programmable thermocycler. The primers used for *GSTM1* were 5'- GAACTCCCTGAAAAGCTA AGC and 5'-GTTGGGGCTCAAATATACGGTGG. The primers used for *GSTT1* were 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC and 5'TCACCGGATCAGGCCAGCA. The primers used for *CYP1A1* were 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT and 5'CAGCTGCATT TGGAAGTGCTC.

PCR conditions were 94 ℃ for 5 min, followed by 40 denaturation cycles of 2 min at 94 ℃, 1 min annealing at 59 ℃, and 1 min extension at 72 ℃. The PCR products were then analyzed by electrophoresis on ethidium bromide-stained 20 g/L agarose gel.

The presence or absence of *GSTT1* and *GSTM1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp and at 215 bp, respectively. A band at 312 bp (CYP1A1) was documented successful amplification[41].

This technique could not distinguish between heterozygote and homozygote positive genotypes, but it could conclusively identify the null genotypes.

PCR-RFLP was performed to investigate the *CYP2E1*c2* allele. PCR was used to amplify the transcription regulation region of *CYP2E1* that includes the *Pst*I enzyme recognition site. PCR was performed in 25 μL reaction buffer containing 0.28 mmol/L of dNTPs, 1.5 mmol/L of $MgCl_2$, 10 pmol of each primer, about 200 ng DNA, and 1.5 units of thermostable Taq DNA polymerase, using a programmable thermocycler. The *CYP2E1* primers were 5'CCAGTCGACTCTACATTGTCA and 5'TTCATTCTGTCTTCTAACTGG. After 5 min of pretreatment at 94 ℃, 35 denaturation cycles of 1 min at 94 ℃, 30 s annealing at 60 ℃, and 1 min extension at 72 ℃ were performed. After amplification, the PCR products were subjected to restriction digestion by enzyme *Pst*I for 16 h at 37 ℃. The PCR-RFLP fragments were then analyzed by electrophoresis on ethidium bromide-stained 20 g/L agarose gel[42].

All the experiments included positive and negative controls for each studied polymorphism.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statidisk, Statistica, Minitab Release 10.1 computer software programs. The probability level (P) of 0.05 was used as significance criterion. Student's t-test and ANOVA F-test tests were used to compare continuous variables between the groups. Chi-square test or Fisher's exact test was utilized as appropriate to compare the groups with regard to genotype frequencies and putative risk factors such as gender, ethnicity, smoking, drinking, *H pylori* infection, occupational pesticide exposure, and histological type of adenocarcinoma. In order to investigate gene-environment interactions, we also calculated the odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (95% CI), according to combinations of the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms with putative risk factors.

RESULTS

Table 1 shows the frequency distributions of the *GSTT1* and *GSTM1* genotypes among the groups. With respect to the genotype frequencies, considering the combinations between the *GSTT1/GSTM1* genes, no statistically significant differences were observed between the gastric cancer and chronic gastritis patients (P=0.189), nor between gastric cancer patients and controls (P=0.448). However, a significant difference (P=0.048) was observed between chronic gastritis patients and controls, due to a higher frequency of combination *GSTT1/GSTM1* positive genotypes in the chronic gastritis patients.

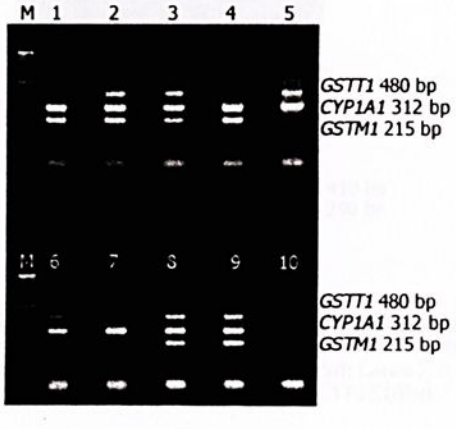


Figure 1 Polymerase chain reaction of the *GSTT1* and *GSTM1* genes. Lanes M: molecular weight maker; Lanes 1 and 4 : patients homozygously null for *GSTT1*; Lanes 2, 3, 8 and 9: patients with positive *GSTT1* and *GSTM1* genotypes; Lanes 5 and 6: patients homozygously null for *GSTM1*; Lane 7: patient homozygously null for *GSTT1*and *GSTM1*; Lane 10 negative control.

The associations of the different genotypes with demographic risk factors (gender, ethnicity, smoking, drinking, pesticide-exposure, *H pylori* infection and histological type of gastric cancer) in each group evidenced that the *GSTT1* null genotype occurred more frequently in Negroid controls (P=0.003), and

1242 ISSN 1007-9327 CN 14-1219/ R World J Gastroenterol May 1, 2004 Volume 10 Number 9

Table 1 *GSTT1* and *GSTM1* genotype frequencies among gastric cancer (GC) and chronic gastritis (CG) patients and controls (C)

Groups	*n*	*GSTT1* Null (%)	*GSTM1* Null (%)	*GSTT1/GSTM1*			
				+/+ (%)	+/0 (%)	0/+ (%)	0/0 (%)
GC	100	17 (17.0)	47 (47.0)	43 (43.0)	40 (40.0)	10 (10.0)	7 (7.0)
CG	100	12 (12.0)	38 (38.0)	57 (57.0)	31 (31.0)	5 (5.0)	7 (7.0)
C	150	28 (18.6)	62 (41.3)	64 (42.7)	58 (38.7)	24 (16.0)	4 (2.6)

+/+=presence of *GSTT1* and *GSTM1*, +/0=presence of *GSTT1* and absence of *GSTM1*, 0/+=absence of *GSTT1* and presence of *GSTM1*, 0/0=absence of *GSTT1* and *GSTM1*.

Table 2 Associations of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes with demographic risk factors in gastric cancer (GC) and chronic gastritis (CG) cases and controls (C)

Groups	Categories	Genotype			
		GSTM1 positive (%)	*GSTM1* null (%)	*GSTT1* positive (%)	*GSTT1* null (%)
C	Ethnicity				
	Caucasian	75 (55.6)	60 (44.4)	114 (84.4)	21 (15.6)
	Negroid	13 (86.7)	2 (13.3)	8 (53.3)	7 (46.7)
		P=0.020		P=0.003	
GC	Ethnicity				
	Caucasian	42 (46.3)	45 (51.7)	73 (83.9)	14 (16.1)
	Negroid	11 (84.6)	2 (15.4)	10 (76.9)	3 (23.1)
		P=0.017		P=0.690	
CG	*H pylori* Infection				
	No	43 (71.7%)	17 (28.3%)	54 (90.0%)	6 (10.0%)
	Yes	19 (48.7%)	20 (51.3%)	34 (87.2%)	5 (12.8%)
		P=0.032		P=0.748	

the *GSTM1* null genotype in Caucasian controls (P=0.020) and gastric cancer patients (P=0.017). The *GSTM1* positive genotype was observed mainly in chronic gastritis cases with *H pylori* infection (P=0.032) (Table 2).

The frequencies of the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were compared among the groups by χ^2 tests and estimated OR (data not shown), according to the pattern of the gastric cancer risk factors represented by gender, ethnicity, smoking, drinking, pesticide-exposure, and *H pylori* infection. Thus, comparing the GC and CG groups, multivariate analysis revealed that smoking was not associated with increased OR's for stomach cancer in the *GSTM1* positive subjects (1.54, 95% CI=0.71-3.33), whereas it was associated with elevated OR's in the *GSTM1* null subjects (2.7, 95% CI=1.04-7.14).

Table 3 shows the frequency distributions of *CYP2E1* genotypes among the groups. The frequencies of *CYP2E1* (*c1/c2*) variant genotypes in the gastric cancer, chronic gastritis and control groups were 11.0%, 9.0% and 10.7%, respectively. The rare homozygous genotype (*c2/c2*) was not found. The results showed no statistical difference (P=0.878) between the groups, nor was there any relationship with the investigated etiological factors, according to the χ^2 test and estimated OR's (data not shown).

Table 3 *CYP2E1* genotype frequencies among gastric cancer (GC) and chronic gastritis (CG) patients and controls (C)

Groups	Genotype	
	c1/c1 (%)	*c1/c2* (%)
GC	89 (89.0)	11 (11.0)
CG	91 (91.0)	9 (9.0)
C	134 (89.3)	16 (10.7)

c1/c1=homozygote for the common allele, *c1/c2*=heterozygote.



Figure 2 PCR-RFLP of *CYP2E1*/PstI. Lanes M: molecular weight maker; Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 ,12, 14, 15 and 16 patients homozygote for the common allele of *CYP2E1*/PstI; Lanes 7, 8, 9, 11 and 13 heterozygote for the rare allele of *CYP2E1*/PstI.

DISCUSSION

Interindividual differences in the cellular mechanisms of activation and detoxification of carcinogenic chemicals could confer different degrees of susceptibility to cancer[43]. However, the results have not always been consistent, due to a number of possible reasons for anomalous findings, such as interaction between environmental and genetic factors, which is a complicating factor that needs to be taken into account[32].

GSTT1, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms have shown pronounced interethnic variations[10]. Brazil is a large country with a very heterogeneous population, resulting from the cross-mating of the native population with immigrants from

Europe, Africa and Asia. Therefore, descriptive studies of the frequencies of genetic polymorphisms in the Brazilian population could be useful in verifing genetic variability in relation to xenobiotic metabolism, since this variability may influence cancer susceptibility. This is the first study that simultaneously evaluated the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms in Brazilian patients with gastric cancer and chronic gastritis.

The *GSTM1* genotype was absent in 35-65% of individuals[44], while *GSTT1* was deleted in 10-65% of the human population[17]. The prevalence of the *CYP2E1 c2* allele was shown to be 2-8% in both Caucasians and African Americans[13], but higher in Asian populations, ranging from 17 to 26%[45].

The frequencies of *GSTT1* (18.6%) and *GSTM1* (41.3%) null genotypes and the CYP2E21/*Pst*I (10.7%) polymorphism observed in the control group were not different from other studies in Brazilian populations[46-49]. We showed that the frequency of the *GSTT1* null genotype was higher in Negroid subjects, and that the *GSTM1* null genotype was higher in Caucasians. Other studies described similar results in Brazilian[46,50] and also in American populations[51].

Although studies of the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were performed previously, their association with gastric cancer susceptibility has not been established. Most of them showed no association between the *GSTT1* null genotype and risk for gastric cancer[25,32,36,52,53]. However, two others suggested that the *GSTT1* null genotype might confer an increased risk for gastric cancer[39,54].

The correlation between the *GSTM1* null genotype and gastric cancer appeared to be more consistent[22,25,27,28,30,53]. On the other hand, other authors failed to demonstrate any statistically significant difference in the *GSTM1* polymorphism distribution of gastric cancer patients and controls[24,26,32,36,52,55,56].

Several case-control studies also failed to find a significant association between the *CYP2E1*/*Pst*I polymorphism and gastric cancer[23,24,26,34]. However, while Nishimoto *et al.*[51] observed that the rare variant *c2/c2* was associated with a reduced risk for gastric cancer in non-Japanese Brazilians, Wu *et al.*[35] observed that the distribution of the *c2/c2* genotype, detected by *Pst*I or *Rsa*I digestion, differed significantly between gastric cancer cases and controls. These authors suggested that the *CYP2E1* genotype could be a determinant of gastric cancer. The reason for these inconsistent results is not clear, but one problem is the lack of sufficient investigation of the gene-environment interactions. Thus, Cai *et al.*[31] and Gao *et al.*[33] suggested that gene-environment interactions between the *CYP2E1* polymorphism and smoking might have the potential to alter the susceptibility for cancer development in the stomach.

Our current data corroborate the hypothesis of there being no association between *GSTT1* and *GSTM1* deletions and *CYP2E1*/*Pst*I polymorphism with gastric cancer and chronic gastritis. However, smoking raised the OR's for stomach cancer in *GSTM1* null subjects. Our findings suggest that *GSTM1* null carriers may be more susceptible to the action of tobacco with regard to stomach cancer. Polycyclic aromatic hydrocarbons and N-nitrosamines found in cigarette smoke are potential human carcinogens. Thus, a deficiency of the detoxifying enzymes may affect the metabolic fates of these chemicals and raise cancer risk in subjects with a *GSTM1* null genotype. Cai *et al.*[30] reported an increased frequency of the *GSTM1* null genotype in smokers with gastric cancer, that may modulate tobacco-related gastric carcinogenesis .

We also observed that a *GSTM1* positive genotype was more prevalent in chronic gastritis patients with *H pylori* infection. In the multi-step carcinogenesis of the stomach, chronic gastritis preceded the formation of gastric cancer, and a great proportion of the clinical tumors occurred in connection with advanced forms of this pathology[57]. *H pylori* has been reported to be a Class I human carcinogen[58], and chronic *H pylori* infection was shown to increase the risk for gastric carcinoma from 2.8 to 9 fold[59-61]. Ng *et al.*[27] observed that the absence of the *GSTM1* enzyme might increase the risk of developing gastric cancer in patients with *H pylori* infection. Thus, chronic gastritis patients with *H pylori* infection, but with a *GSTM1* positive genotype, might benefit from a protective effect and exhibit a smaller predisposition to developing gastric cancer.

In this study, no association between the *CYP2E1*/*Pst*I polymorphism and overall risk for gastric cancer was observed. Different from the study of Nishimoto *et al.*[51] in a Brazilian population, the rare variant *c2/c2* was not observed. Moreover, the risk for gastric cancer as related to demographic risk factors was also not affected by the *CYP2E1*/*Pst*I polymorphisms.

In conclusion, the present work does not show any obvious relationship between *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms and the development of gastric cancer in a Brazilian population. However, smoking and the *GSTM1* null genotype may be associated with an increased OR for stomach cancer. We emphasize that studies with negative findings also need to be reported, so as to avoid a publication bias leading to an overestimate of positive findings. We also suggest that the investigation of a greater number of biometabolism genes associated with DNA repair genes might bring a broader view of the process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. Adriana Barbosa Santos and Dr. Antônio José Manzato for their help in the statistical analysis.

REFERENCES

1 **INCA** - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2003. Disponí vel em http://www.inca.org.br.

2 **Stadtländer CT**, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 2195-2208

3 **Galanis DJ**, Kolonel LN., Lee J, Nomura A. Intakes of selected foods and beverages and the incidence of gastric cancer among the Japanese residents of Hawaii: a prospective study. *Int J Epidem* 1998; **27**: 173-180

4 **Brenner H**, Arndt V, Bode G, Stegmaier C, Ziegler H, Stümer T. Risk of gastric cancer among smokers infected with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 2002; **98**: 446-449

5 **Zaridze D**, Borisova E, Maximovitch D, Chkhikvadze V. Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes Control* 2000; **11**: 363-371

6 **Pakodi F**, Abdel-Salam OM, Debreceni A, Mózsik G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J Physiol Paris* 2000; **94**: 139-158

7 **Sipponen P**, Hyvärinen H, Seppaälä K, Blaser MJ. Review article: pathogenesis of transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 61-71

8 **Correa P**. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; **48**: 3554-3560

9 **Stemmermann GN**. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 1994; **74**: 556-564

10 **Wormhoudt LW**, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzimes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; **29**: 59-124

11 **Autrup H**. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; **464**: 65-76

12 **Rothman N**, Wacholder S, Caporaso NE, Garcia-Closas M,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

1244 ISSN 1007-9327 CN 14-1219/ R World J Gastroenterol May 1, 2004 Volume 10 Number 9

Buetow K, Fraumeni JF. The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1471**: 1-10

13 **Liu S**, Park JY, Schantz SP, Stern JC, Lazarus P. Elucidation of *CYP2E1* 5' regulatory *RsaI/PstI* allelic variants and their role in risk for oral cancer. *Oral Oncol* 2001; **37**: 437-445

14 **Pavanello S**, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res* 2000; **63**: 285-308

15 **AICR** - American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington: *Banta Book Group* 1997: 670p

16 **Sheweita SA**, Tilmisany AK. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2003; **4**: 45-58

17 **Landi S**. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000; **463**: 247-283

18 **Hung HC**, Chuang J, Chien YC, Chern HD, Chiang CP, Kuo YS, Hidessheim A, Chen CJ. Genetic polymorphisms of *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1*: environmental factors and risk of oral cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; **6**: 901-905

19 **Hildesheim A**, Chen CJ, Caporaso NE, Cheng YJ, Hoover RN, Hsu MM, Levine PH, Chen IH, Chen JY, Yang CS, Daly AK, Idle JR. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma, Results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 607-610

20 **Le Marchand LL**, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF. Association of *CYP1A1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 1998; **58**: 4858-4863

21 **Lin DX**, Tang YM, Peng Q, Lu SX, Ambrosone CB, Kadlubar FF. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in Glutathione S-Transferases T1, P1 and M1 and Cytochrome P4502E1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; **7**: 1013-1018

22 **Harada S**, Misawa S, Nakamura T, Tanaka N, Ueno E, Nozoe M. Detection of *GST1* gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. *Hum Genet* 1992; **90**: 62-64

23 **Kato S**, Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Tajiri T, Kim DY, Tsuruta H, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. *Pharmacogenetics* 1995; **5**: 141-144

24 **Kato S**, Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Genetic polymorphisms of the cancer related gene and *Helicobacter pylori* infection in Japonese gastric cancer patients: an age and gender matched case-control study. *Cancer* 1996; **77**(8 Suppl): 1654-1661

25 **Katoh T**, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N, Ookuma R, A' bell D. Glutathione S-transferase M1 (GSTT1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 1855-1859

26 **Kato S**, Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Matsuda N, Yamashita K, Shields GP. *Helicobacter pylori* infeccion and genetic polymorphisms to cancer related genes in gastric carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* 1997; **51**: 145-149

27 **Ng EK**, Sung JJ, Ling TK, Ip SM, Lau JY, Chan AC, Liew CT, Chung SC. *Helicobacter pylori* and the null genotype of glutathione-S-transferase-m in patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1998; **82**: 268-273

28 **Oda Y**, Kobayashi M, Ooi A, Muroishi Y, Nakanishi I. Genotypes of glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase 2 in Japanese patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999; **2**: 158-164

29 **Setiawan VW**, Zhang ZF, Yu GP, Li ML, Tsai CJ, Cordova D, Wang MR, Guo CR, Yu SZ, Kurtz RC. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 73-80

30 **Cai L**, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferase M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: A case-control study. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 506-509

31 **Cai L**, Yu SZ, Zhang ZF. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian Province. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 792-795

32 **Gao CM**, Takezaki T, Wu JZ, Li ZF, Liu YT, Li SP, Ding JH, Su P, Hu X, Xu TL, Sugimura H, Tajima K. Glutathione-S-transferases M1 (GSTM1) and GSTT1 genotype, smoking, consumption of alcohol and tea and risk of esophageal and stomach cancers: a case-control study of a high-incidence area in Jiangsu Province, China. *Cancer Lett* 2002; **188**: 95-102

33 **Gao CM**, Takezaki T, Wu JZ, Li ZY, Wang J, Ding J, Liu YT, Hu X, Tajima K, Sugimura H. Interation between Cytochrome P-450 2E1 polymorphisms and environmental factors with risk of esophageal and stomach cancers in chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; **11**: 29-34

34 **Tsukino H**, Kuroda Y, Qiu D, Nakao H, Imai H, Katoh T. Effects of cytochrome P450 (CYP) 2A6 gene deletion and CYP2E1 genotypes on gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2002; **100**: 425-428

35 **Wu MS**, Chen CJ, Lin MT, Wang HP, Shun CT, Shen JC, Liu JT. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 2E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int J Colorectal Dis* 2002; **17**: 338-343

36 **Choi SC**, Yun KJ, Kim TH, Kim HJ, Park SG, Oh GT, Chae SC, Oh GJ, Nah YH, Kim JJ, Chung HT. Prognostic potential of glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes for gastric cancer progression, *Cancer Lett* 2003; **195**: 169-175

37 **Genta RM**. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 17-23

38 **Lauren J**. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: na attemp at a histo clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; **64**: 31-49

39 **Price AB**. The Sydney system: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; **6**: 209-222

40 **Abdel-Rahman SZ**, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of [2,3-14C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J Biochem Toxicol* 1994; **9**: 191-198

41 **Abdel-Rahaman SZ**, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the *GSTM1* and *GSTT1* genes in human. *Cancer Lett* 1996; **107**: 229-233

42 **Kato S**, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 1992; **52**: 6712-6715

43 **van Iersel ML**, Verhagen H, van Bladeren PJ. The role of biotransformation in dietary (anti) carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; **443**: 259-270

44 **Mizoue T**, Tokui N, Nishisaka K, Nishisaka S, Ogimoto I, Ikeda M, Yoshimura T. Prospective study on the relation of cigarette smoking with cancer of the liver and stomach in an endemic region. *Int J Epidemiol* 2000; **29**: 232-237

45 **De Stefani E**, Boffetta P, Carzoglio J, Mendilaharsu S, Deneo-Pellegrini H. Tobacco smoking and alcohol drinking as risk factors for stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Causes Control* 1998; **9**: 321-329

46 **Ekström AM**, Eriksson M, Hansson LE, Lindgren A, Signorello LB, Nyrén O, Hardell L. Occupational exposures and risk of gastric cancer in a population-base case-control study. *Cancer Res* 1999; **59**: 5932-5937

47 **Mikelsaar AV**, Tasa G, Parlist P, Uuskula M. Human glutathione S-transferase GSTM1 genetic polymorphism in Estonia. *Hum Hered* 1994; **44**: 248-251

48 **Persson I**, Johansson I, Lou YC, Yue QY, Duan LS, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int J Cancer* 1999; **81**: 325-329

49 **Gattas GJ**, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med* 2000; **50**: 508-511

50 **Hatagima A**, Klautau-Guimarães MN, Silva FP. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genet Mol Biol* 2000; **23**: 709-713

51 **Nishimoto IN**, Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Arai T, Hamada GS, Kowalski LP, Tsugane S. Cyto-

chrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brasilians and non-Japanese Brasilians. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2000; **9**: 675-580

52 **Losi-Guembarovski R**, D' Arce LPG, Cólus IMS. Glutathione S-transferase Mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population. *Genet Mol Biol* 2002; **25**: 357-360

53 **Arruda VR**, Grignolli CE, Gonçalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethinic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clini Genet* 1998; **54**: 210-214

54 **Chen CL**, Liu Q, Relling WV. Simultaneons characterization of glutathioneS-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reation in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; **6**: 187-191

55 **Deakin M**, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Alldersea J, Fryer A, Strange ARC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and suscetibility to cancer: studies of interations with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 881-884

56 **Saadat I**, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. *Cancer Lett* 2001; **169**: 21-26

57 **Lan Q**, Chow WH, Lissowska J, Hein DW, Buetow K, Engel LS, Ji B, Zatonski W, Rothman N. Glutathione S-transferase genotypes and stomach cancer in a population-based case-control study in Warsaw, Poland. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 655-661

58 **Martins G**, Alves M, Dias J, Santos R, Costa-Neves J, Mafra M, Marins AP, Ramos S, Ramos M, Mexia J, Quina M, Rueff J, Montero C. Glutathione S-transferase mu polymorphism and gastric cancer in the portuguese population. *Biomarkers* 1998; **3**: 441-447

59 **Conde AR**, Martins G, Saraiva C, Rueff J, Monteiro C. Association of p53 genomic instability with the glutathione S-transferase null genotype in gastric cancer in the portuguese population. *Mol Pathol* 1999; **52**: 131-134

60 **Sipponen P**, Hyvärinen H, Seppalä K, Blaser MJ. Review article: pathogenesis of transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 61-71

61 International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. The evaluation of carcinogenic risks to humans, Monograph N° 61. Lyon, France, 1994

62 **Kuipers EJ**. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; **13**: 3-11

63 **El-Omar EM**, Oien K, Murray LS, El-Nujumi A, Wirz A, Gillen D, Williams G, Fullarton G, Mccoll KEL. Incresased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H pylori*. *Gastoenterology* 2000; **118**: 22-30

64 **Uemura N**, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; **345**: 784-789

Edited by Wang X L **Proofread by** Xu FM

13. APOPTOSE: IMPLICAÇÕES NA CARCINOGÊNESE GÁSTRICA

APOPTOSE: IMPLICAÇÕES NA CARCINOGÊNESE GÁSTRICA

Aline Cristina Targa - Mestre em Genética - Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP Campus de São José do Rio Preto, SP.

Ana Elizabete Silva, Professor Assistente Doutor - Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP Campus de São José do Rio Preto, SP.

Endereço para correspondência:

Ana Elizabete Silva

Departamento de Biologia

UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Rua Cristóvão Colombo, 2265

15054-000 - São José do Rio Preto, SP-Brasil

E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br

Phone: 55 (17) 221-2384

FAX: 55 (17) 221-2390

Archives of Gastroenterology, 2004 *(submitted)*

RESUMO

Racional – A apoptose, um processo geneticamente regulado de morte celular programada, desempenha um papel importante na homeostase do tecido, com a eliminação de células excedentes ou danificadas. Na última década, tornaram-se disponíveis algumas metodologias mais sensíveis e específicas, para a detecção de células apoptóticas. Esses métodos são baseados na fragmentação do DNA e utilização de anticorpos para detecção de proteínas expressadas e ativadas seletivamente, como as caspases, ou fragmentos de proteínas gerados durante o processo apoptótico. Essas metodologias têm auxiliado na identificação de células apoptóticas, em fases mais precoces, antes delas apresentarem as características morfológicas, permitindo uma análise menos subjetiva. A ocorrência de apoptose tem sido investigada em diversas doenças, com a finalidade de compreender o envolvimento desse evento em patologias como a AIDS, doenças autoimunes e neurodegenerativas e o câncer. No processo multipasso do câncer gástrico há indicações de apoptose aumentada em gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, freqüentemente infectadas pela *H. pylori*, que pode ser reduzida após erradicação da bactéria. Apesar da eliminação de células epiteliais na mucosa gástrica, por apoptose, ser um processo fisiológico normal, a apoptose aumentada em gastrite induzida pela *H. pylori*, poderia levar a uma hiperproliferação compensatória, aumentando a chance de danos no DNA e a carcinogênese gástrica.

Conclusão – A regulação da apoptose é, portanto, considerada um alvo para intervenção terapêutica em diversas doenças.

DESCRITORES – **Apoptose, lesões gástricas, câncer gástrico, *H. pylori*.**

ABSTRACT

Background – Apoptosis, a genetically regulated process of cell death, plays an essential role in tissue homeostasis, by eliminating unnecessary or damaged cells. Over the last decade, a number of more sensitive and specific techniques for the detection of apoptotic cells became available. These methods are based on DNA fragmentation and the use of antibodies for the detection of selectively expressed and activated proteins, such as caspases, or protein fragments generated during the apoptosis process. These methods have been helpful in detecting apoptotic cells in tissue sections, in earlier phases of cell death, even before they show morphological changes, thus allowing a less subjective analysis. The occurrence of apoptosis has been investigated in several pathologies, in order to better understand its involvement in diseases such as AIDS, autoimmune and neurodegenerative diseases, and cancer. In the multistep process of gastric cancer, there is evidence of increased apoptosis occurring in atrophic gastritis, gastric ulcer and intestinal metaplasia, frequently infected with *H. pylori*. This process decreases after the eradication of the bacterium. Although the elimination of epithelial cells of the gastric mucosa by apoptosis is a normal physiological process, excessive apoptosis in *H. pylori*-induced gastritis can lead to compensatory hyperproliferation, thus increasing the risk of DNA damage and gastric carcinogenesis.

Conclusion – Thus, the regulation of apoptosis is a promising target for therapeutic strategies in several diseases.

HEADINGS – Apoptosis, gastric lesions, gastric cancer, *H. pylori*.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

ASPECTOS GERAIS DA APOPTOSE

Os organismos multicelulares desenvolveram um processo para a eliminação de células excedentes ou potencialmente danificadas, por meio de um programa molecular tão importante quanto a divisão e a migração celular, denominado de morte celular programada. Este mecanismo permite aos organismos controlarem o número e o tamanho celulares, eliminando as células alteradas que ameaçam a homeostase[16].

A apoptose, proposta primeiramente por Kerr et al.[26] é uma forma de morte celular, geneticamente regulada, caracterizada por mudanças morfológicas, bioquímicas e alterações genética moleculares. Fisiologicamente ela pode ser evidenciada durante o desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoéticas. A apoptose constitui a principal defesa do organismo, pois é responsável pela destruição de células não funcionais. Alterações no balanço entre a apoptose e a proliferação celular resultam em distúrbio na homeostase do tecido e, a sua desregulação está relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, doenças autoimunes e neurodegenerativas e infecções virais[11, 48].

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela degeneração de células esparsas com condensação e fragmentação da cromatina, condensação citoplasmática e redução do volume celular, mantendo, porém, a integridade das organelas citoplasmáticas e da membrana celular. Em seqüência, procede a formação de corpos apoptóticos e fagocitose pelas células vizinhas normais e macrófagos. Bioquimicamente, a degradação do DNA não é casual, ocorrendo pela ação de nucleases nos espaços internucleossomais, originando fragmentos de 180 a 200 pares de bases[26, 27, 72].

A necrose, contrariamente, ocorre por um estímulo patológico resultante de uma lesão maciça no tecido, caracterizada pela diminuição de adenosina trifosfato (ATP), pelo

inchaço celular e perda da integridade da membrana celular, seguida pela lise das organelas e da célula. Devido à liberação dos constituintes celulares, a necrose é acompanhada, *in vivo*, por uma resposta inflamatória, sendo bioquimicamente caracterizada por degeneração casual do DNA nuclear[69]. As células apoptóticas podem sofrer necrose secundária, como em placas ateroescleróticas, pela ativação de genes pró-inflamatórios[25, 51].

A apoptose é um processo rápido e não sincronizado no órgão, com tempo de duração variável de uma a três horas, coexistindo diferentes estágios de apoptose em diversas regiões dos tecidos[15]. Ela pode ser induzida por diferentes agentes etiológicos, como infecção viral, radiação, várias toxinas e drogas, isquemia, perturbação metabólica, fatores hormonais e depleção de fatores de crescimento[4]. Por outro lado, alguns outros fatores previnem a apoptose (anti-apoptóticos), como os fatores de sobrevivência tecido-específicos ou gerais, por exemplo, hormônios, citocinas e fatores de crescimento[22].

Em geral, a apoptose procede em duas fases distintas, a fase de decisão em que ocorre o acúmulo de produtos gênicos necessários para desencadear o processo, e a fase de execução, pela ativação em cascata de enzimas específicas denominadas caspases. A partir dessa etapa o processo é irreversível[66].

As caspases, proteases específicas de aspartato contendo cisteína, clivam seus substratos protéicos especificamente após um resíduo de ácido aspártico[63]. Elas estão presentes no núcleo como pró-enzimas inativas, constituídas de uma subunidade grande (20 kDa) e uma pequena (10 kDa)[49]. A ativação das caspases iniciadoras, tais como as caspases 2, 8, 9 e 10, por sinais pró-apoptóticos leva à ativação proteolítica das caspases efetoras 3, 6 e 7. Essas caspases clivam um grupo de proteínas vitais (lâmininas e gelsolinas) e ativam proteoliticamente enzimas latentes, como as nucleases, iniciando e executando a fase de degradação celular e as mudanças morfológicas típicas da célula[51].

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Três vias celulares de sinalização distintas têm sido descritas como responsáveis pelo início da apoptose: via extrínseca ou de sinalização externa, via intrínseca ou mitocondrial e a terceira via, ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF)[24].

Na via extrínseca, o processo é ativado por estímulos externos por meio de ligantes a receptores de morte específicos na membrana celular, que recrutam proteínas adaptadoras, ativando assim, a cascata de caspases, culminando na morte celular[3, 54]. Esses receptores de morte pertencem à família de receptor do fator de necrose tumoral (TNF)[53], que compreende o receptor TNF-1 (TNF-R1), Fas (Apo-1 ou CD95), receptor de morte DR3, 4 (TRAIL R1) e DR5 (TRAIL R2)[9, 71]. A ligação desses ligantes a seus respectivos receptores de morte, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD com o Fas; TRADD com TNF-R1, RIP ou ambos), que juntamente com a forma inativa da caspase-8 forma um complexo de sinalização de indução de morte (DISC)[34, 71]. Esse complexo ativa a caspase-8, iniciando-se assim, a cascata de caspases, que por sua vez, ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando na execução da morte celular apoptótica.

A via intrínseca ou mitocondrial ocorre pela ativação por estresse de proteínas intracelulares específicas com a participação dos membros da família de proteínas Bcl-2, considerados os mediadores essenciais da sobrevivência e apoptose celular[3, 54]. Essa sinalização pode ocorrer através de proteínas G e quinases protéicas que são ativadas por mitógenos[25]. A família de proteínas Bcl-2 é composta por cerca de 15 membros com função pró-apoptótica (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bik, Blk e Hrk) e anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1 e BHRF)[11, 77]. Estas proteínas localizam-se na membrana mitocondrial externa, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células[29]. Os membros com função anti-apoptótica estabilizam a membrana da mitocôndria, enquanto que os pró-apoptóticos, permeabilizam e induzem a liberação do citocromo c, que na



presença de dATP forma um complexo de ativação com o fator 1 de ativação da proteína apoptótica (APAF-1) e caspase-9, ativando a cascata de caspases efetoras, como a caspase-3[25].

A terceira via de sinalização também dependente da mitocôndria, mas independe das caspases, ocorre pela liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c, o fator de indução da apoptose (AIF)[19], ATP, proteínas *heat shock* e DIABLO/Smac (direct IAP-binding protein with low pI/second mitochondria-derived activator of caspases), um inibidor de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), neutralizando sua atividade anti-apoptótica[12, 68, 74].

As células ainda podem sofrer apoptose em resposta a sinais internos, incluindo lesões no DNA, com a participação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, como o gene supressor de tumor *TP53*[55]. Este gene eleito como o "guardião do genoma", desempenha papel importante na manutenção da integridade do DNA e indução de apoptose, eliminando, de forma seletiva, as células danificadas, assim protegendo o organismo do desenvolvimento de neoplasias[18].

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE

A apoptose é quantificada pelo índice apoptótico (IA), que expressa a porcentagem entre a proporção de células apoptóticas sobre o total de células epiteliais examinadas[32, 45].

A detecção de células apoptóticas tem sido baseada na morfologia, representando as características mais tardias das células apoptóticas, e observação do DNA fragmentado por técnicas bioquímicas e histoquímicas. Recentemente, métodos mais específicos estão disponíveis para detecção de apoptose, como TUNEL, eletroforese de DNA em gel de agarose, métodos de coloração com fluorocromos, citometria de fluxo e detecção de

proteínas expressadas e ativadas seletivamente ou fragmentos de proteínas gerados durante o processo apoptótico[41, 54, 58].

Ensaios baseados na detecção da fragmentação do DNA têm sido amplamente utilizados, por meio de técnicas enzimáticas, como TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-biotin nick-end labelling)[14], ISEL (*in situ* end labelling)[76] e ISNT (*in situ* nick translation). O princípio dessas técnicas consiste no reparo do DNA fragmentado, utilizando enzimas de reparo, que inserem nucleotídeos marcados nas extremidades 3'-OH que se ligam em DNA de fita simples ou dupla quebrados. Posteriormente, a detecção das células apoptóticas pode ser realizada empregando-se nucleotídeos conjugados a uma variedade de moléculas, como biotina, digoxigenina, fluoresceína e radioisótopos[33].

O DNA fragmentado pode ser detectado também por imuno-histoquímica, empregando-se anticorpos monoclonais, como Mab F7-26[13] ou anticorpos policlonais[75] para detecção de quebras de DNA de fita simples, evidenciando os estágios iniciais da apoptose.

Outras abordagens têm se concentrado na descoberta de marcadores apoptóticos altamente específicos, com a utilização de anticorpos contra produtos clivados pelas caspases (citoqueratina 18, actina, proteína precursora amilóide, PARP, α-fodrina), componentes do citoesqueleto modificados (proteína específica da apoptose) e caspases ativadas[33].

A caspase-3, também conhecida como CPP32, YAMA, é considerada a enzima efetora central apoptótica. Ela atua no citosol e está ativada apenas nas células em apoptose. Essa enzima é responsável por muitas características morfológicas e bioquímicas da

apoptose, devido a sua capacidade de clivar substratos celulares (actina, gelsolina, PARP e quinases de adesão celular), que promovem a degeneração da célula[57].

A caspase-3 ativada é reconhecida por anticorpos específicos, sendo portanto, considerados marcadores sensíveis para células apoptóticas[58], uma vez que identificam mais precocemente essas células mesmo antes delas apresentarem todas as características morfológicas. Um fator importante é que a ativação da cascata de caspases não tem sido encontrada na morte celular necrótica[2].

De modo geral, os diferentes métodos utilizados para a detecção de células apoptóticas possuem significantes limitações. A medida em que são ampliados os conhecimentos sobre as bases moleculares e bioquímicas da apoptose, marcadores mais específicos para os diferentes estágios poderão ser desenvolvidos. A baixa especificidade de alguns dos métodos atuais justificam o uso de mais de um deles, combinando-se uma ou mais técnicas bioquímicas com as características morfológicas, tornando a detecção das células apoptóticas mais fácil e menos dependente da interpretação subjetiva.

APOPTOSE EM LESÕES GÁSTRICAS

A apoptose desempenha função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrintestinal e sua desregulação está associada com a ocorrência de lesões como a gastrite atrófica, a úlcera péptica e tumorigênese do estômago[47].

A carcinogênese gástrica é um processo de múltiplas etapas, associada com uma série de mudanças histológicas pré-malignas, iniciando-se a partir de uma gastrite ativa crônica freqüentemente infectada pela bactéria *Helicobacter pylori* e progredindo por meio de uma seqüência patogênica para gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma[7, 62].

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

As doenças gástricas inflamatórias estão freqüentemente associadas com o aumento da proliferação epitelial, possivelmente em resposta aos danos celulares ou morte celular induzidos pela *H. pylori*[30, 35]. Contudo, na gastrite crônica não é observado espessamento da mucosa, indicando que a hiperproliferação epitelial, aparentemente, está balanceada com a perda celular pela apoptose[69].

A associação entre infecção pela *H. pylori* e a taxa de proliferação em lesões da mucosa gástrica é um assunto ainda em discussão. Apesar da atividade de urease da *H. pylori* e a infiltração de leucócitos terem um efeito mitogênico, a hiperproliferação celular gástrica também ocorre independentemente da infecção por essa bactéria. Nardone et al.[36] observaram taxa proliferativa aumentada no epitélio gástrico em pacientes com gastrite crônica e câncer gástrico independente da infecção pela *H. pylori*, enquanto, outros estudos têm enfatizado que esta bactéria induz elevação da taxa proliferativa[10, 31]. Em nível molecular, é postulado que a indução de resposta mitogênica pela *H. pylori* ocorre pela ativação de receptores de fatores de crescimento tirosina-quinase e modificação de transdução de sinal na célula utilizando translocação de proteínas bacterianas[38].

Em gastrite *H. pylori* positiva, com proliferação epitelial aumentada e pouca ou nenhuma morte celular necrótica, Moss et al.[35] sugeriram que a hiperproliferação celular deveria ser acompanhada pela apoptose epitelial aumentada, que, por sua vez, atuaria como um estímulo para uma resposta hiperproliferativa compensatória e potencialmente pré-neoplásica.

A natureza assincrônica da apoptose nas populações celulares, assim como o período variável de sua duração *in vivo*, entre seis e 24 horas[14, 26], acarreta na detecção de apenas algumas células apoptóticas em um determinado local do tecido, podendo levar à diferenças quantitativas significantemente subestimadas. Os corpos apoptóticos não são

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

distribuídos casualmente, sendo encontrados principalmente na direção das extremidades superior e inferior das glândulas gástricas[69]. Com a utilização da técnica TUNEL tem-se observado que cerca de 1-3% das células epiteliais gástricas no antro ou corpo/fundo são apoptóticas[60, 69].

Um aumento moderado a acentuado de células apoptóticas (variação de 3 a 16%) tem sido relatado em gastrite crônica freqüentemente associada com atrofia glandular e infecção pela *H. pylori*[7, 17, 20, 31, 35, 36, 60, 69], ocorrendo principalmente nos epitélios foveolar e glandular[20, 23, 60, 64, 65], regiões em que há uma maior colonização pela bactéria e inflamação epitelial[60]. A variação do índice apoptótico pode ser devido à contagem de diferentes tipos celulares (epitélios foveolar, glandular, ou ambos) e diferentes fatores de virulência das cepas *H. pylori*[69]. Além disso, tem sido relatada uma correlação positiva entre o índice apoptótico e o grau de atrofia glandular, indicando que o aumento de apoptose pode ter uma função importante no desenvolvimento de atrofia glandular[78]. No entanto, os resultados não são concordantes, pois Anti et al.[1] observaram índices apoptóticos similares em gastrite crônica infectada ou não pela *H. pylori* e não encontraram correlação dos índices apoptóticos com o grau de inflamação, enquanto Wagner et al.[70] detectaram uma atividade apoptótica reduzida seguida por proliferação celular aumentada na presença da *H. pylori* .

O mecanismo pelo qual a infecção pela *H. pylori* poderia promover a apoptose ainda não está completamente esclarecido. Todavia, algumas hipóteses têm sido sugeridas. Moss et al.[35] propuseram que seria devido a um efeito direto da bactéria, pela liberação de citocinas e produtos endógenos citotóxicos. Outros fatores são a amônia gerada durante a quebra da uréia pela urease produzida pela *H. pylori* e a redução do ascorbato, um antioxidante gástrico[28, 61]. Ainda deve ser considerada a hipergastrinemia associada à *H.*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

pylori e até mesmo uma resposta inflamatória induzida pela bactéria, alterando a cinética celular epitelial[69]. É também conhecido que a bactéria é responsável pela formação intracelular de intermediários de nitrogênio reativo[42, 30], espécies de oxigênio reativo associado com adutos de DNA[5, 30, 56] e nível aumentado de óxido nítrico sintase, responsável pela formação endógena de nitrito e compostos nitrosos. A óxido nítrico sintase também pode provocar a desaminação do DNA[37]. Esses fatores podem contribuir para o aumento de danos no DNA, à apoptose e conseqüente aumento da proliferação celular.

Há também indicações de que a *H. pylori* induz apoptose no epitélio gástrico pela repressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, liberação do citocromo-c no citosol e ativação da caspase-9[46] e que promove o aumento da expressão das proteínas c-myc e pró-apoptóticas em lesões gástricas pré-cancerosas[79]. Conforme ASHKTORAB et al.[6], durante a apoptose induzida pela *H. pylori,* a proteína Bax transloca para a mitocôndria, que sofre despolarização e fragmentação, desencadeando todo o processo apoptótico.

Alguns produtos bacterianos, incluindo as proteínas CagA (*Cytotoxin-associated gene*) e VacA (gene que codifica *vacuolating cytotoxin*), citotoxinas que determinam a patogenicidade da bactéria, podem ser diretamente responsáveis pela indução de apoptose[8, 30]. A infecção pela linhagem de *H. pylori* CagA+ aumenta o risco de atrofia e metaplasia intestinal, possivelmente devido ao potencial inflamatório aumentado demonstrado por essa linhagem[30, 36]. Contudo, alguns estudos não relataram uma associação entre a linhagem CagA e apoptose. Por exemplo, Peek et al.[44] e Von Herbay; Rudi[69] verificaram que a apoptose não estava aumentada em relação a proliferação celular, em pacientes infectados pelas linhagens CagA+ VacA s1a da *H. pylori*.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Vários estudos constataram uma diminuição da apoptose após erradicação da *H. pylori*[28, 35, 36, 40, 69], evidenciando que o aumento da apoptose em infecção *H. pylori* ativa é um fenômeno reversível. A erradicação da *H. pylori* em pacientes com gastrite crônica foi acompanhada pela redução da proliferação celular[36, 39, 40], redução da atividade da gastrite, regressão ou desaparecimento da atrofia e metaplasia completa e desaparecimento de marcadores de instabilidade genômica, antes presentes[36]. Esses últimos autores sugeriram que pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positiva com atrofia que não responderem a tratamento com antibióticos devem ser examinados para marcadores de instabilidade genômica e acompanhados rigorosamente.

Em outras lesões como úlcera, metaplasia e no adenocarcinoma gástrico infectadas pela *H. pylori* também têm sido descrito o aumento de apoptose[17, 28, 35, 67, 73].

Em úlcera gástrica[52] e duodenal *H. pylori* positivas, há indicações de índice apoptótico aumentado[28, 35]. Neste tipo de lesão, a infecção pela bactéria bloquearia o mecanismo fisiológico inibitório normal do antro gástrico para as células que liberam ácido e gastrina, resultando na liberação aumentada de gastrina e inibição prejudicada da secreção de ácido gástrico[28]. A erradicação completa da bactéria pode levar a uma redução significante do índice apoptótico em úlcera duodenal[28, 35] e úlcera gástrica[52], apesar de ter-se constatado índices apoptóticos significantemente elevados em pacientes com úlcera gástrica após a erradicação da *H. pylori*[17].

Em metaplasia intestinal, a cinética epitelial gástrica encontra-se levemente aumentada, com a zona proliferativa localizada na região basal. Neste grupo de lesão, a apoptose ocorre mais freqüentemente na zona basal das glândulas do tipo incompleta do que completa, presumivelmente devido a eliminação de células com danos no DNA[20, 69]. Em metaplasia intestinal completa, a proteína Bcl-2, inibidora da apoptose, encontra-se



expressa na maioria dos casos (91%)[50], assim, provavelmente reduzindo o índice de células apoptóticas. Após erradicação da bactéria, WAMBURA et al.[73] relataram diminuição nos índices de proliferação celular e apoptose, podendo desempenhar um papel importante na prevenção de tranformação na mucosa metaplásica.

No câncer gástrico é observado um aumento gradual da atividade proliferativa e ocorrência constante de apoptose, que conseqüentemente exerce uma função importante no desenvolvimento de atrofia glandular presente nesses tumores[78]. Neste tipo de neoplasia há relatos de índices apoptóticos aumentados[23, 78], que parecem ocorrer mais freqüentemente em adenocarcinoma bem diferenciado (tipo intestinal) do que naqueles pobremente diferenciados (tipo difuso)[20].

CONSIDERAÇÃO FINAL

A regulação da apoptose é um dos alvos atrativos para a intervenção terapêutica em algumas doenças consideradas previamente incuráveis, como a AIDS e o câncer. Neste último caso, a indução da apoptose pode atuar no controle da progressão tumoral e de metástases, dado que consiste no mecanismo principal de regressão tumoral induzida pela quimioterapia[43]. A terapia é baseada na utilização de drogas que atuem na ativação das caspases[21, 34], ou na regulação da família de genes *Bcl-2* com a tecnologia anti-sense, inibindo a expressão de seus membros, ou neutralizando sua atividade anti-apoptótica pela ocorrência natural de proteínas antagonistas, como Bax, ou ainda, por compostos farmacêuticos que se ligam nos sítios ativos dessas proteínas[22]. Uma das tentativas para o tratamento do câncer com a terapia anti-sense, consiste no bloqueio dos membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP), que constitui um grupo de supressores

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

apoptóticos ligado ao cromossomo X (cIAP1, cIAP2, NAIP e survivinas), conferindo proteção às células contra agentes anti-câncer e a outros estímulos apoptóticos (59).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anti M, Armuzzi A, Gasbarrini A. Importance of changes in epithelial cell turnover during *Helicobacter pylory* infection in gastric carcinogenesis. Gut 1998;43:S27-S32.

2. Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai,, X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. J Neurosci 1997;17:553-62.

3. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. Prog Neuro-Psycho-Pharmacol Biol Psychiatry 2003;27:199-214.

4. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998;281: 1305-8.

5. Ashktorab H, Ahmed A, Littleton G, Wang XW, Allen CR, Thackey R, Walters C, Smoot DT. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to H. pylori-induced apoptosis. Dig Dis Sci 2003;48:1284-91.

6. Ashktorab H, Frank S, Khaled AR, Durum SK, Kifle B, Smoot DT. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori.* Gut 2004;53:805-13.

7. Attallah A M, Abdel-Wahab M, Elshal M F, Zalata R K, Ibrahim NM, Ezzat F. Apoptosis in Chronic Gastritis: Evaluation of the gastric mucosa by DNA flow cytometry and the expression of the high molecular weight cytokeratin. Hepato-Gastroenterology 1996;43: 1305-12.

8. Boquet P, Ricci V, Galmiche A, Gauthier NC. Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of *VacA* finally been identified? Trends Microbiol 2003;11:410-13.

9. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002;296:1634-5.

10. de Freitas D, Urbano M, Gaulao MH, Donato MM, Baldaia C, Martins MI, Souto P, Gregório C, Figueiredo P, Gouveia H, Romaozinho JM. The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. Hepatogastroenterology 2004;51:876-82.

11. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacol Therapeutics 2004;101:1-15.

12. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000;102:33-42.

13. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. J Histochem Cytochem 2001; 49:369-78.

14. Gavrieli Y, Sherman Y, Bem-Sasson AS. Identification of programmed cell death via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.

15. Hall P.A. Assessing apoptosis: a critical survey. Endocr Relat Cancer 1999;6:3-8.

16. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000;407:770-6.

17. Hirasawa R, Tatsuta M, Iishi H, Yano H, Baba M, Uedo N, Sakai N. Increase in apoptosis and decrease in ornithine decarboxylase activity of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer after successful eradication of *Helicobacter pylori*. The Am J Gastroenterol 1999;94:2398-402.

18. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. Trends Pharmacol Sci 2004;25:177-81.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

19. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: *PARP-1* and *AIF* signaling. Trends Pharmacol Sci 2004;25:259-64.

20. Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl tranferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. Virchows Arch 1996;428:229-35.

21. Itoh M, Chiba H, Noutomi T, Takada E, Mizuguchi J. Cleavage of Bax-alpha and Bcl-x (L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. Oral Oncol 2000;36:277-85.

22. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. Exp Cell Res 1999;248:30-43.

23. Jang TJ, Kim JR. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol 2000;35:265-71.

24. Joza N, Susin AS, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnam L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature 2001;410:549-54.

25. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure. A critical review of the literature. Circ Res 2000;86:1107-13.

26. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-56.

27. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and therapy. Cancer 1994;73:2013-26.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

28. Kohda K, Tanaka K, Aiba Y, Yasuda M, Miwa T, Koga Y. Role of apoptosis induced by Helicobacter pylori infection in the development of duodenal ulcer. Gut 1999;44:456-62.

29. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. Trends Genet 1995;11:101-5.

30. Lamarque D, Tran Van Nhieu J, Breban M. What are the gastric modifications induced by acute and chronic *Helicobacter pylori* infection?. Gastroenterol Clin Biol 2003;27:391-400.

31. Lee KM, Lee DS, Yang, JM, Ahn BM, Lee EH, Yoo JY, Kim YJ, Chung IS, Sun HS, Park DH. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis. Korean J Gastroenterol 2003;42:12-9.

32. Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. Endocr Relat Cancer 1999;6:13-6.

33. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. J Oral Pathol Med 2003; 32:125-38.

34. Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Cisplatin inhibits the expresion of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in an oral carcinoma cell line. Oral Oncol 2001;37:296-300.

35. Moss S F, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. Gut 1996;38:498-501.

36. Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'Armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori*

infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999;44:789-99.

37. Nardone G. Molecular basis of gastric carcinogenesis. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:75-81.

38. Naumann M, Crabtree JE. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. Trends Microbiol 2004;12:29-36.

39. Noguchi K, Kato K, Moriya T, Suzuki T, Saito M, Kikuchi T, Yang J, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Toyota T, Shimosegawa T, Sasano H. Analysis of cell damage in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. Pathol Int 2002;52:110-8.

40. Ohkura Y, Furihata T, Kawamata H, Tabuchi M, Kubota K, Terano A, Sakai T, Fujimori, T. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using image analysis processor. Gastric Cancer 2003;6:49-54.

41. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods-from morphology to gene. Prog Histochem Cytochem 2003;38:275-339.

42. Pakodi F, Abdel-Salam OM, Debreceni A, Mozsik G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease. An overview. J Physiol Paris 2000;94:139-52.

43. Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, Ahern R, Reed J, Dowsett M. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. Clin Cancer Res 2002;8:2100-8.

44. Peek RM, Kerr LD, Miller GG. H. pylori induces apoptosis in gastric epithelial cells by an NFk-B-independent mechanism. Gut 1997;41: A45.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

45. Potten CS. What is an apoptotic index measuring? A commentary. Br J Cancer 1996;74: 1743-8.

46. Potthoff AS, Ledig S, Martin J, Jandl O, Cornberg M, Obst B, Beil W, Manns MP, Wagner S. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. Helicobacter 2002;7:367-77.

47. Que FG, Gores GJ. Cell death apoptosis: Basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. Gastroenterology 1996;110:1238-43.

48. Reed JC. Apoptotic-based therapies. Nat Rev Drug Disc 2002;I:111-21.

49. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Nuclear events in apoptosis. J Struct Biol 2000; 129:346-58.

50. Saegusa M, Takano Y, Okayasu I. Bcl-2 expression and its association with cell kinetics in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. J Cancer Res Clin Oncol 1995;121:357-63.

51. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 2000;45:528-37.

52. Satoh K, Kawata H, Tokumaru K, Kumakura Y, Ishino Y, Kawakami S, Inoue K, Kojima T, Satoh Y, Mutoh H, Kihira K, Sugano K. Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of Helicobacter pylori. Dig Dis Sci 2003;35:78-84.

53. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. Pharm Acta Helv 2000;74: 281-6.

54. Schultz DR, Harrington Jr WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. Semin Arthritis Rheumatism 2003;32:345-69.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

55. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? Oncogene 2004;23:2809-18.

56. Smoot DT, Elliott TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon RG, Bremner T, Kidd LC, Kim KS, Groupman JD, Ashktorab H. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. Carcinogenesis 2000;21:2091-5.

57. Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Brück W, Jellinger K, Lassmann H. Activation of caspase-3 in single neurons and authophagic granules of granulovacuoler degeneration in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1999;155:1459-66.

58. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Res 2000; 301:19-31.

59. Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy – an overview. Lung Cancer 2003;41:S81-8.

60. Steininger H, Faller G, Dewald E, Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. Virchows Arch 1998;433:13-8.

61. Suzuki H, Masaoka T, Nomura S, Hoshino Y, Kurabayashi K, Minegishi Y, Suzuki M, Ishii H. Current consensus on the diagnosis and treatment of *H. pylori*-associated gastroduodenal disease. Trends Microbiol 2003;52:163-73.

62. Tahara E. Genetic pathway of two types of gastric cancer. IARC Sci Publi 2004;157:327-49.

63. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998;281:1312-6.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

64. Unger Z, Molnar B, Szaleczky E, Torgyekes E, Muller F, Zagoni T, Tulassay Z, Pronai L. Effect of *Helicobacter pylori* infection and eradication on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis. J Physiol 2001;95:355-60.

65. Unger Z, Molnar B, Pronai L, Szaleczky E, Zagoni T, Tulassay Z. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15:389-93.

66. Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. Ann Thorac Surg 2003;75:656-60.

67. van Grieken NC, Meijer GA, zur Hausen A, Meuwissen SG, Baak JP, Kuipers EJ. Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. J Clin Pathol 2003;56:358-61.

68. Verhagen A, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connoly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell 2000;102:43-53.

69. von Herbay A, Rudi J. Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. Microscopy Research Technique 2000;48:303-11.

70. Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan R, Bock CT, Trautwein C. Regulation of gastric apithelial cell growth by Helicobacter pylori: evidence for a major role of apoptosis. Gastroenterology 1997;113:1836-47.

71. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 2002;296:1635-6.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

72. Waldmeier PC. Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. Prog Neuro-Psycho-Pharmacol Biol Psychiatry 2003;27:303-21.

73. Wambura C, Aoyama N, Shirasaka D, Kuroda K, Watanabe Y, Miki I, Tamura T, Kasuga M. Cell kinetic balance in gastric mucosa with intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication: 2-year follow-up study. Dig Liver Dis 2004;36:178-86.

74. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 2001;15:2922-33.

75. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, Kawasaki H, Sugiyama T, Kawarada Y, Tanigawa N. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labelling (TUNEL) methods. Jpn J Cancer Res 1999;90:188-93.

76. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labelling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem 1993;41:7-12.

77. Yin XM, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, Chen J. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. J Biol Chem 2002;277:42074-81.

78. Yoshimura T, Shimoyama T, Tanaka M, Sasaki Y, Fukuda S, Munakata A. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. J Clin Pathol 2000;53:532-6.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

79. Zhan N, Xiong YY, Lan J, Wang BC, Tian SF, YU SP. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expression of c-myc, Bcl-2, and bax protein in different gastric mucosa lesions. Ai Zheng 2003;22:1034-7.

14.APOPTOSIS IN DIFFERENT GASTRIC LESIONS AND ASSOCIATION WITH *HELICOBACTER pylori*, ANEUPLOIDY AND EXPRESSION OF P53

APOPTOSIS IN DIFFERENT GASTRIC LESION AND ASSOCIATION WITH *HELICOBACTER pylori*, ANEUPLOIDY AND EXPRESSION OF P53.

Aline Cristina Targa - Mestre em Genética - Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia, UNESP Campus de São José do Rio Preto-SP, Brazil

Ana Cristina Gobbo César, Doutora em Genética, Professor Adjunto, UNIP, Araçatuba-SP, Brazil

Patrícia Maluf Cury, Doutora em Patologia, Professor Assistente Doutor, FAMERP, São José do Rio Preto-SP, Brazil

Ana Elizabete Silva, Professor Assistente Doutor, UNESP Campus de São José do Rio Preto-SP, Brazil.

Endereço para correspondência:

Ana Elizabete Silva

Departamento de Biologia

UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Rua Cristóvão Colombo, 2265

15054-000 - São José do Rio Preto, SP-Brasil

E-mail address: anabete@bio.ibilce.unesp.br

Phone: 55 (17) 221-2384

FAX: 55 (17) 221-2390

Artigo em fase de preparação.

RESUMO

A apoptose, uma forma de morte celular geneticamente regulada, desempenha função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrintestinal. A apoptose elevada tem sido descrita em lesões como gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal, aumentando o risco de tumorigênese do estômago. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de apoptose pelas técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e expressão da caspase-3 ativada (anticorpo CPP32) em lesões benignas (34 biópsias de gastrite crônica-GC; 11 de gastrite atrófica crônica-GAC; 17 de úlcera gástrica-UC e 15 de metaplasia intestinal-MI), 12 amostras de adenocarcinoma gástrico (AG) e 8 biópsias de mucosa normal *H. pylori* negativa, e a associação com a infecção pela bactéria *H. pylori*, aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 detectadas pela técnica FISH e expressão aumentada da proteína p53. A técnica TUNEL evidenciou índice apoptótico (IA) significantemente aumentado na amostra de GAC (3,93; p= 0,0231) em relação à mucosa normal. Enquanto com o anticorpo CPP32, observou-se IA estatisticamente maior na amostra de GC (13,82; p= 0,0311). Nessas duas amostras também foram encontradas freqüências maiores de casos TUNEL positivos e CPP32 positivos em comparação com as demais amostras de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico. A investigação de associação entre apoptose aumentada e infecção pela *H. pylori*, aneuploidias e super expressão da proteína p53 não evidenciou qualquer associação entre esses fatores. Porém, as amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal *H. pylori* positivas apresentaram IA estatisticamente maiores que à mucosa normal, apenas com o anticorpo CPP32. Apesar de ambas as técnicas serem acuradas e sensíveis para a detecção de células apoptóticas, de modo geral não houve correlação entre os IA encontrados por ambas as técnicas, nas amostras de mucosa normal e lesões benignas, mas observou-se uma correlação positiva no

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

grupo AG (r=0,70). Portanto, este estudo evidencia um aumento de apoptose no epitélio de lesões benignas como gastrite crônica e gastrite atrófica crônica, não necessariamente relacionado com infecção pela *H. pylori*. Assim, reforçando a participação de lesões gástricas com potencial pré-canceroso na tumorigênese do estômago, e também enfatizando a importância do emprego de métodos diferentes para detecção de apoptose.

Palavras-chave: apoptose, TUNEL, caspase-3 ativada, *H. pylori,* lesões benignas, adenocarcinoma gástrico.

INTRODUÇÃO

A homeostase do tecido depende da proliferação celular que é contrabalanceada com a morte celular programada ou apoptose. O desequilíbrio desses dois processos levando a uma taxa de proliferação excessiva potencializa o efeito de carcinógenos que têm o DNA como alvo. Assim, a proliferação celular aumentada é um fator de risco para subseqüente desenvolvimento de neoplasias (Mc NAMARA et al., 2003; NAUMANN; CRABTREE, 2004). Enquanto, a apoptose, um mecanismo geneticamente regulado, tem como função eliminar as células não necessárias ou danificadas de um organismo (DLAMINI; MBITA, ZUNGU, 2004).

Na carcinogênese gástrica, a infecção pela bactéria *H. pylori* é considerada como o fator ativador do processo, iniciando-se com uma resposta inflamatória ativa crônica da mucosa, seguida por alterações do ciclo celular, com taxas aumentadas de proliferação celular e apoptose. Essas mudanças podem ser responsáveis pela atrofia gástrica que caracteriza o tipo de gastrite associada com o risco aumentado de câncer gástrico (CORREA, 2004). A *H. pylori* é o principal fator etiológico do câncer gástrico e tem sido classificada como um carcinógeno tipo I (NAUMANN; CRABTREE, 2004).

Alguns estudos têm revelado uma associação entre infecção pela *H. pylori* e apoptose aumentada em lesões gástricas como gastrite crônica geralmente correlacionada com atrofia glandular, úlcera gástrica e metaplasia intestinal (ATTALLAH et al., 1996; HIRASAWA et al., 1999; ISHIDA et al., 1996; MOSS et al., 1996; STEININGER et al., 1998; NARDONE et al., 1999; von HERBAY; RUDI, 2000; LEE et al., 2003; OHKURA et al., 2003; van GRIEKEN et al., 2003; ASHKTORAB et al., 2004; WAMBURA et al., 2004). Contudo, os resultados ainda são contraditórios, pois também há informações de que a infecção ou não pela *H. pylori,* não afeta os índices apoptóticos (ANTI et al., 1998; de

FREITAS et al., 2004), nem o grau de inflamação da mucosa gástrica (ANTI et al., 1998), ou ainda, que a presença da infecção pode promover uma redução da atividade apoptótica, seguida pelo aumento da proliferação celular (WAGNER et al., 1997).

A apoptose é um processo assincrônico, envolvendo células esparsas em um determinado local do tecido examinado, que podem encontrar-se em diferentes fases do processo (GRAVIELI et al., 1992; von HERBAY; RUDI, 2000). Portanto, é importante empregar mais de um método capaz de evidenciar apoptose em diferentes estágios (SCHULTZ; HARRINGTON Jr, 2003).

Este estudo foi elaborado para avaliar os índices apoptóticos em diferentes lesões da mucosa gástrica como gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera gástrica e metaplasia intestinal e o adenocarcinoma gástrico, empregando duas técnicas que detectam células apoptóticas em fases distintas, como a expressão da caspase-3 ativada, que precede a fragmentação do DNA, detectada pela técnica TUNEL. Os resultados foram associados com a infecção pela *H. pylori,* ocorrência de aneuploidias e expressão da proteína p53, para auxiliar na elucidação da participação do aumento da apoptose e associação com esses fatores na carcinogênese gástrica

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Analisou-se 97 amostras (8 mucosas gástricas normais, 34 gastrites crônicas, 11 gastrites atróficas crônicas, 17 úlceras gástricas, 15 metaplasias intestinais e 12 adenocarcinomas gástricos) emblocadas em parafina a partir de biópsias, após avaliação endoscópica. Os tumores foram histologicamente classificados de acordo com Lauren (Lauren, 1965) como intestinal ou difuso. As gastrites e metaplasias foram histopatologicamente diagnosticadas e classificadas de acordo com o Sistema de Sydney (Dixon et al., 1996). A infecção pela *H. pylori*, de todas as amostras, foi inicialmente rastreada pela avaliação histológica (coloração de Giemsa) e confirmada molecularmente, por PCR, utilizando-se os *primers* H3H4 e H5H6 (CESAR et al., *submitted*-a). A investigação das freqüências de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 pela técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) e a expressão da proteína p53, por método imuno-histoquímico, foi realizada anteriormente por César et al. (2004 *in press; submitted*-b). Como controle, foram analisadas oito biópsias de mucosa gástrica histologicamente normal e *H. pylori* negativas (MN) de seis mulheres e dois homens, com idade média de 37 anos (variação de 20 a 66 anos), com queixa de dispepsia gástrica. As amostras de gastrites (34 gastrites crônicas não-atróficas – GC e 11 gastrites atróficas crônicas-GAC) foram obtidas de 26 mulheres e 19 homens, com idade média de 44 anos (variação de 2 a 89 anos). As biópsias de úlcera gástrica (UG) foram obtidas de cinco mulheres e 12 homens, com idade média de 60 anos (variação de 28 a 83 anos). No grupo de metaplasia intestinal (MI) foram avaliadas 15 amostras, sendo 9 mulheres e 6 homens, com idade média de 68 anos (variação de 22 a 91 anos). As 12 amostras de adenocarcinoma gástrico (AG) foram obtidas de uma mulher e 11 homens, com idade média de 65 anos (variação de 38 a 93

anos). Todas as amostras foram coletadas no Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, Brasil. As biópsias de mucosa normal e da maioria das outras lesões foram coletadas da região do antro do estômago, entretanto aquelas de adenocarcinomas foram coletadas principalmente do antro e corpo. O estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa, e foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os indivíduos.

Análise Imuno-histoquímica

Para a detecção das células apoptóticas foram empregadas as técnicas TUNEL e anticorpo para a caspase-3 ativada (CPP32) em cortes histológicos de 4 μm e montagem em lâminas silanisadas.

Na técnica TUNEL foi utilizado o Kit FragEl (Oncogene), conforme instruções do fabricante. Após a desparafinização e incubação com proteinase K por 20 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se o bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em metanol, por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após o tratamento de pré-hibridização, o material foi exposto a transferase deoxynucleotidyl terminal com digoxigenina-11-dUTP e dATP, em câmara úmida, por 60 minutos a 37° C. Após, seguiu-se a lavagem do material em tampão salino e coloração do mesmo em solução de diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos, e contra-coloração em hematoxilina. Após desidratação em xilol, o material foi montado em lâmina histológica coberto com lamínula. Como controle positivo foi utilizado material de biópsia de tumor de mama.

A detecção das células apoptóticas pela expressão da caspase-3 ativada foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal CPP32 (Novocastra, Newcastle, UK), que apresenta

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

padrão de marcação citoplasmático, combinando-se com o anticorpo secundário anti-Ig e o Kit ABC (Novocastra). Após a desparafinização em xilol e re-hidratação dos cortes histológicos em álcoois graduados (etanol absoluto, 85% e 50%), realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e a inativação de peroxidases endógenas com metanol 3% e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário CPP32 diluído em soroalbumina bovina a 2% (diluição 1:150) em câmara úmida a 37° C, durante 16-18 horas. Após lavagem em tampão PBS, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário (Kit ABC – Novocastra), por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o complexo avidina-estreptoavidina durante 30 minutos, em câmara úmida. A revelação do material foi realizada com uma solução de diaminobenzidina (DAB) e o material contracorado com hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado material proveniente de mucosa intestinal, que expressa fortemente o anticorpo.

O índice apoptótico (IA) foi calculado como a proporção de células TUNEL positivas, com padrão de marcação nuclear em um total de 500 células dos epitélios glandular e faveolar, de cada caso. Para a caspase-3 ativada a classificação da imunorreatividade foi graduada como negativa (<10% das células imunomarcadas), fracamente marcadas (>10-25%), moderadamente marcadas (25-50% das células imunomarcadas) ou fortemente marcadas (>50% das células imunomarcadas). As amostras fracamente à fortemente imunomarcadas foram consideradas como positivas.

Análise estatística

Foram empregados os testes de χ^2 e de Fisher, repectivamente, para avaliação de associação entre duas variáveis e comparações das freqüências de casos TUNEL e CPP32

positivos entre os grupos. Diferenças entre as freqüências médias de apoptose entre os grupos foram avaliada pelo teste t-*Student*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

A amostra de mucosa histologicamente normal *H. pylori* negativa utilizada como controle, não apresentou aneuploidias nem expressão elevada da proteína p53. As freqüências médias de células imunomarcadas foram $\bar{x}$ ±EP=1,82±0,47 (variação de 0 a 3,6%) pela técnica TUNEL e $\overline{x}$ ±EP=3,20±1,31 (variação de 0 a 11,0%) com o anticorpo CPP32. A partir desses valores foram considerados como positivos os casos de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico que apresentaram mais de 3,6% das células imunomarcadas pela técnica TUNEL e 11% pelo anticorpo CPP32.

Na Tabela 1 encontram-se as freqüências médias dos índices apoptóticos (IA) e dos casos imunopositivos pelas técnicas TUNEL e anticorpo CPP32, nas amostras de mucosa normal, lesões benignas e adenocarcinoma gástrico.

Com a técnica TUNEL, a amostra de gastrite atrófica crônica apresentou IA médio ($\bar{x}$ ±EP=3,93±0,63) estatisticamente aumentado (p=0,0231) em relação à amostra de mucosa normal, assim como um número maior de casos TUNEL positivos (6/11; 54,5%). Em seguida, a amostra de gastrite crônica ($\bar{x}$ ±EP=2,60±0,32), mas sem diferença significante. Com o anticorpo CPP32 ocorreu o inverso, pois observou-se IA médio estatisticamente mais elevado (p=0,0311) na amostra de gastrite crônica ($\bar{x}$ ±EP=13,82±2,58) comparada com a mucosa normal, também apresentado um número maior de casos CPP32 positivos (15/34; 44,1%), seguida pela amostra de gastrite atrófica crônica ($\bar{x}$ ±EP=6,20±1,57), mas sem diferença estatística.

As demais amostras de lesões benignas não apresentaram IA com diferenças significantes em comparação com à mucosa normal, em ambas as técnicas.



Os adenocarcinomas gástricos mostraram IA baixos, não observando-se diferença significante entre os subtipos intestinal e difuso, tanto quando empregou-se a técnica TUNEL (p=0,2810), como com o anticorpo CPP32 (p=0,3134).

A Figura 1 ilustra a imunomarcação nuclear TUNEL positiva e marcação citiplasmática positiva da caspase-3 ativada, principalmente nos epitélios glandular e faveolar das lesões benignas, e também no infiltrado nos adenocarcinomas.

O teste t-*Student* para comparação dos IA médios em cada grupo (Tabela 2), considerando-se os casos *H. pylori* positivos e os negativos, não mostrou qualquer diferença significante. Contudo, observou-se IA estatisticamente maiores nas amostras de úlcera gástrica (p=0,0233) e metaplasia intestinal (p=0,0253) *H. pylori* positivas em relação à mucosa normal, apenas com o anticorpo CPP32.

O teste exato de Fischer também não mostrou associação entre a infecção pela bactéria com os casos TUNEL positivos, nem com os casos CPP32 positivos em cada grupo de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico, com exceção do grupo de gastrite crônica, em que a infecção pela *H. pylori* foi mais freqüente nos casos negativos para a caspase-3 ativada (p=0,0297). Da mesma forma, não houve associação entre os casos TUNEL positivos e CPP32 positivos com a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 e expressão aumentada da proteína p53 (Tabela 3).

Não foi observada correlação entre os índices apoptóticos obtidos pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada nos grupos de mucosa normal e lesões benignas, exceto no grupo de câncer gástrico (r=0,70).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

DISCUSSÃO

A apoptose, uma forma de morte celular geneticamente programada é regulada por muitos genes, incluindo oncogenes, genes supressores de tumor, que podem estar mutados ou expressados anormalmente em neoplasmas, portanto alterando a suscetibilidade das células tumorais para apoptose (DLAMINI; MBITA; ZUNGU, 2004; HEAVEY; ROWLAND, 2004). A iniciação e regulação da apoptose envolve algumas vias, das quais, em duas delas (vias intrínseca e extrínseca), uma família de proteases, denominada caspases, são ativadas e clivam substratos celulares, resultando nas mudanças bioquímicas e morfológicas características desse processo (DLAMINI; MBITA; ZUNGU, 2004).

Diferentes métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares têm sido empregados para detecção de células apoptóticas, mas todos possuem significantes limitações (OTSUKI; SHIBATA, 2003), sendo interessante à utilização de métodos diferentes que detectem apoptose em fases distintas do processo.

Na carcinogênese gástrica, assim como em outras neoplasias, estão implicadas múltiplas alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes, genes supressores de tumor e de reparo do DNA, como também alterações no controle da apoptose (TAHARA, 2004). A infecção pela bactéria *H. pylori* está associada com significantes danos nas células epiteliais e taxas aumentadas de apoptose (HEAVEY; ROWLAND, 2004). Esta bactéria pode afetar o balanço normal entre proliferação celular e apoptose, interferindo com a manutenção da integridade da mucosa gástrica (de FREITAS et al., 2004).

Neste estudo, a avaliação de células apoptóticas em diferentes lesões gástricas e adenocarcinoma gástrico foi realizada empregando-se as técnicas imuno-histoquímicas TUNEL e anticorpo para a caspase-3 ativada (CPP32). A técnica TUNEL evidenciou índice apoptótico estatisticamente maior em gastrite atrófica crônica ($3,93 \pm 0,63$) em relação à

mucosa normal (1,82±0,47), enquanto a caspase-3 ativada mostrou índice apoptótico mais elevado na amostra de gastrite crônica (13,82±2,58). As demais lesões benignas como úlcera gástrica e metaplasia intestinal, e o adenocarcinoma gástrico, não apresentaram taxas elevadas de apoptose em relação à mucosa normal. Nas amostras de gastrite crônica e gastrite atrófica crônica também foram encontrados um número maior de casos TUNEL positivos e CPP32 positivos.

A gastrite crônica *H. pylori* positiva, freqüentemente progride para gastrite atrófica, que é um fator de risco reconhecido para o câncer gástrico. Tem-se observado a ocorrência de atrofia gástrica severa na mucosa de pacientes com câncer gástrico, com evidências de que o risco para neoplasia aumenta com o grau e a extensão da atrofia. Além disso, tem sido relatada uma correlação positiva entre o índice apoptótico e o grau de atrofia glandular, indicando que o aumento de apoptose tem uma função importante no desenvolvimento de atrofia glandular (YOSHIMURA et al., 2000).

No epitélio gástrico, o aumento da apoptose parece estar relacionado com alguns fatores, como infecção pela *H. pylori*, lesões no DNA e expressão de proteínas que regulam o ciclo celular e apoptose, como a proteína p53. No entanto, não observamos associação entre apoptose, ou seja, os casos TUNEL positivos e CPP32 positivos com infecção pela bactéria *H. pylori*, aneuploidias dos cromossomos 3, 7, 8, 9 e 17 investigada pela técnica FISH e super expressão da proteína p53.

A infecção pela bactéria *H. pylori* é considerada a causa principal de gastrite crônica e aguda, úlcera gástrica e duodenal (NIH, 1994) e está associada com um risco de 2,7 a 12 vezes de desenvolvimento de câncer gástrico (COVER et al., 1995). Por outro lado, o mecanismo de ação da *H. pylori* na carcinogênese gástrica não está totalmente esclarecido.

unesp

Uma das vias refere-se ao fato de que a carcinogênese gástrica está relacionada com o rompimento no balanço entre proliferação das células epiteliais e morte celular, ou apoptose. Também é conhecido que a bactéria é responsável pela formação intracelular de intermediários de nitrogênio reativo (PAKODI et al., 2000) e espécies de oxigênio reativo associado com adutos de DNA em células gástricas expostas a *H. pylori* (SMOOT et al., 2000; ASHKTORAB et al., 2003), assim contribuindo para o aumento de danos no DNA, apoptose e proliferação celular. Há relatos, ainda, de que a *H. pylori* induz apoptose no epitélio gástrico, pela repressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, da liberação do citocromo-c no citosol e da ativação da caspase-9 (PATTHOFF et al., 2002), ou devido alterações na secreção de fatores de crescimento e citocinas e o efeito de secreções gástricas diminuídas (HEAVEY, ROWLAND, 2004).

Neste estudo, não foram observadas diferenças significantes entre os índices apoptóticos em cada amostra de lesão benigna e adenocarcinoma gástrico com ou sem infecção pela *H. pylori*. Também não constatou-se diferenças significantes entre os índices apoptóticos da amostra de mucosa normal *H. pylori* negativas, com os casos *H. pylori* positivos de gastrite crônica, gastrite atrófica crônica e adenocarcinoma gástrico. Contudo, com o anticorpo CPP32, as amostras de úlcera gástrica e metaplasia intestinal *H. pylori* positivas apresentaram índices apoptóticos estatisticamente maiores em relação à mucosa normal. Da mesma forma, não foi possível associar os casos TUNEL positivos e CPP32 positivos, com a infecção pela bactéria, nas lesões benignas e adenocarcinoma gástrico, com exceção do grupo de gastrite crônica, em que observou-se um número maior de casos imunomarcados pela caspase-3 ativada sem a infecção pela *H. pylori*. Portanto, de modo geral, não foi constatada uma participação efetiva da infecção pela *H. pylori* no aumento

de apoptose nas amostras de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico analisadas. O efeito dos fatores de virulência da bactéria como *cag* PAI (gene associado à citotoxicidade-ilha de patogenicidade) e VacA (citotoxina vacuolizante) pode ser responsável pelas diferenças nas taxas de apoptose das dispepsias gástricas entre os indivíduos infectados (NAUMANN, CRABTREE, 2004).

Em úlcera gástrica e metaplasia intestinal os estudos sobre apoptose são escassos e não conclusivos. Nossos resultados mostraram, com o anticorpo CPP32, índices apoptóticos estatisticamente maiores nesses tipos de lesões quando infectadas pela *H. pylori*, em relação à mucosa normal. Em úlcera duodenal (MOSS et al., 1996) e gástrica (SATOH et al., 2003), por exemplo, há relatos, tanto de IA aumentados, que diminuíram significantemente após a erradicação da bactéria, assim como um aumento do IA em úlcera gástrica, após o tratamento da infecção (Hirasawa et al. 1999). Ainda, outros estudos, não observaram diferenças nos índices apoptóticos em úlcera gástrica e duodenal *H. pylori* positiva ou negativa (KOHDA et al., 1999; JANG; KIM, 2000).

Na metaplasia intestinal do tipo incompleta, Ishida et al. (1996) verificaram índice apoptótico maior (2,0%) que no tipo completa (1,0%), sugerindo que as células com danos no DNA ocorrem mais freqüentemente no tipo incompleto e, presumivelmente, são mais freqüentemente eliminadas por apoptose, para impedir a transformação celular. Esta observação vem corroborar a indicação, de que a metaplasia intestinal incompleta está mais associada com o câncer gástrico. Por outro lado, Leung et al. (2001) detectaram índice apoptótico mais baixo em metaplasia intestinal, que em região não-metaplásia infectadas pela *H. pylori*. Neste estudo, os autores também observaram uma taxa reduzida entre os

índices de apoptose e de proliferação celular, assim favorecendo o acúmulo celular e possivelmente, contribuindo para a carcinogênese gástrica.

Em adenocarcinoma gástrico, não foram observadas diferenças significantes quando considerou-se apenas os casos com infecção pela *H. pylori* e TUNEL positivos e CPP32 positivos, nem foi possível estabelecer diferenças entre os índices apoptóticos nos dois subtipos histológicos do tumor. van der Woude et al. (2003) também não encontraram diferenças nos índices de proliferação celular e apoptose, avaliados pela expressão de Ki-67 e da proteína caspase-3 ativada em adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal e difuso. Yoo et al. (2002), da mesma forma, observaram que as caspases 3, 8, 9 e 10 eram expressas em câncer de estômago, independentemente dos subtipos histológicos e da profundidade da invasão. Esses últimos autores sugeriram que a maioria das células de câncer gástrico precisam expressar as caspases para a ocorrência de apoptose *in vivo*, sendo, portanto, um bom marcador desse processo. No entanto, Yoshimura et al. (2000) relataram índices apoptóticos maiores em indivíduos com câncer gástrico infectados pela *H. pylori*, e também observaram diferenças significantes entre os dois subtipos histológicos do tumor: na região do antro, índice apoptótico aumentado foi detectado no tipo difuso, enquanto na região do corpo, índice apoptótico mais elevado ocorreu no tipo intestinal.

No presente estudo, também não foi observada uma associação entre a ocorrência de aneuploidias e expressão aumentada da proteína p53 e os casos positivos para apoptose pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada nos grupos de lesões benignas e adenocarcinoma gástrico. De modo contrário, Attallah et al. (1996) relataram a ocorrência de apoptose associada com conteúdo de DNA aneuplóide em gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal e displasia. Enquanto, Nardone et al. (1999) detectaram DNA aneuplóide em



20,7% das biópsias de gastrite crônica *H. pylori* positiva e em 11 amostras de câncer gástrico, em associação com a expressão das proteínas p53 e c-myc. Essas alterações foram revertidas após a erradicação da bactéria. Alguns estudos também relataram a ocorrência de associação entre infecção pela *H. pylori* e a expressão aumentada da p53 em metaplasia intestinal e câncer gástrico (NARDONE et al., 1999; ASHKTORAB et al., 2003; UNGER et al., 2003), assim como a associação entre aumento de apoptose e p53 na presença da infecção pela bactéria (ASHKTORAB et al., 2003; UNGER et al., 2003).

O aumento da p53 em lesões gástricas benignas induzida pela *H. pylori* está relacionada com a estabilização da p53 selvagem e ocorre provavelmente como um mecanismo protetor das células, que resulta no bloqueio do ciclo celular e indução da apoptose (ASHKTORAB et al., 2003). A ausência desse fator protetor pode aumentar o risco de câncer gástrico nos indivíduos infectados pela bactéria. Por outro lado, a super expressão da p53 relatada em adenocarcinoma gástrico (ISHIDA et al., 1996; ASHKTORAB et al., 2003) deve refletir a ocorrência de mutações no gene *TP53*, evidenciando a forma mutada da proteína e assim reduzindo a sensibilidade das células sofrerem apoptose.

Similarmente aos nossos resultados, Ikeda et al. (1998) também não observaram associação entre células gástricas cancerosas positivas para a proteína p53 e o índice apoptótico. Contudo, verificaram que o índice apoptótico e a expressão nuclear da p53 eram mais elevados em adenocarcinoma tipo intestinal (bem diferenciado) do que no tipo difuso (pobremente diferenciado).

Deve ser considerada a possibilidade de algumas formas de apoptose serem induzidas por outras vias não envolvendo a proteína p53 selvagem e também a ocorrência

de mutações em outros genes relacionados com a apoptose como o *Bcl-2*, *c-Myc* e *Ras*, que têm participação na carcinogênese gástrica (ISHIDA et al., 1996).

Apesar das técnicas TUNEL e caspase-3 ativada serem eficientes para detecção de apoptose, não foi observada correlação entre os índices apoptóticos avaliados por ambas as técnicas, nas amostras de mucosa normal e lesões gástricas, com exceção do grupo de câncer gástrico. Contudo, o emprego das duas técnicas foi vantajoso, pois propiciou resultados que se complementaram. Hoshi et al. (1998) também verificaram uma correlação positiva entre a expressão da caspase-3 com o índice apoptótico detectado pela técnica TUNEL em câncer gástrico, porém não observaram correlação com o índice de proliferação celular Ki-67.

A ausência de correlação entre os resultados obtidos pelas técnicas TUNEL e caspase-3 ativada do presente estudo, pode ser devido a diferentes fatores. Por exemplo, algumas células podem sofrer apoptose sem ativação da caspase-3, como evidenciado em tumor de mama (MAINWARING et al., 1998; HADJILOUCAS et al., 2001). Outros estudos têm indicado tanto a inexistência de correlação entre os índices apoptóticos detectados pelos dois métodos, em diferentes tipos de tumores (Giannopoulou et al., 2002; Parton et al., 2002), como a ocorrência de correlação (Vakkalla et al. 1999; Hadjiloucas et al., 2001). Estes métodos são marcadores de apoptose devido à detecção de determinadas características do processo apoptótico em fases distintas, sendo que a expressão da caspase-3 ativada precede a fragmentação do DNA, assim enfatizando a necessidade de utilização de métodos diferentes.

A imunomarcação positiva para a caspase-3 ativada também pode ser utilizada como um bom marcador prognóstico, pois há indicações de associação entre a

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

imunomarcação para essa proteína com prognóstico favorável, pelo menos em carcinomas primários de células escamosas do esôfago (Hsia et al., 2003). Foi observado que tanto a transferência retroviral da caspase-3 em células de glioma maligno *in vitro*, como em tumores de camundongos, inibiu significantemente o crescimento tumoral, através da indução da apoptose (Kondo et al., 1998).

Em conclusão, o presente estudo evidencia aumento da taxa de apoptose em gastrite crônica e gastrite atrófica crônica, independente da infecção pela *H. pylori*, aneuploidias e expressão aumentada da p53, reforçando a participação de lesões gástricas com potencial pré-canceroso na tumorigênese do estômago. Também indica a expressão da caspase-3 ativada como um método adequado e eficiente para avaliação de apoptose no epitélio gástrico.

Agradecimentos: Este trabalho teve o auxílio financeiro da FAPESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anti M., Armuzzi A., Gasbarrini A. Importance of changes in epithelial cell turnover during *Helicobacter pylory* infection in gastric carcinogenesis. *Gut,* v. 43, p. S27-S32, 1998.

Ashktorab, H. et al. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to *H. pylori*-induced apoptosis. *Dig Dis Sci*, v. 48, p. 1284-1291, 2003.

Ashktorab H. et al. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori. Gut*, v. 53, p. 805-813, 2004.

Attallah, A. M. et al. Apoptosis in Chronic Gastritis: Evaluation of the gastric mucosa by DNA flow cytometry and the expression of the high molecular weight cytokeratin. *Hepato-Gastroenterology*, v.43, p.1305-1312, 1996.

César, A.C.G. et al. Aneuploidies, deletion and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics,* 2004, *in press.*

César, A.C.G. et al. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, *submitted*-a.

César, A.C.G. et al. Genetics alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. *American Journal of Gastroenterology*, 2004, *submitted*-b.

Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. *IARC Sci Publ*, v.157, p. 301-310, 2004.

Cover, T.L.; Blaser, M.J. *Helicobacter pylori*: a baceterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *Am Soc Micro News*, v.61, p.21-26, 1995.

Cover, T.L., et al. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytoxin. *Cancer Res*, v. 63, p. 951-957, 2003.

de Freitas D. et al. The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology*, v. 51, p. 876-882, 2004.

Dixon, M.F. et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. *Am J Surg Pathol*, v. 20, p. 1161-1181, 1996.

Dlamini Z., Mbita Z., Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Therapeutics*, v. 101, p. 1-15, 2004.

Gavrieli Y., Sherman Y., Bem-Sasson A.S. Identification of programmed cell death via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, v. 119, p. 493-501, 1992.

Giannopoulou, I. et al. Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications. *Urol Res*, v. 30, p. 342-345, 2002.

Hadjiloucas, I. et al. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. *Br J Cancer*, v. 85, p. 1522-1526, 2001.

Heavey, P.M; Rowland, I.R. Gastrointestinal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,* v. 18, p. 323-336, 2004.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Hirasawa, R. et al. Increase in apoptosis and decrease in ornithine decarboxylase activity of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer after successful eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*, v.94, p.2398-2402, 1999.

Hoshi, T. et al. Immunohistochemistry of caspase2/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res*, v. 18, p. 4347-4353, 1998.

Hsia, J.Y. et al. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *EJSO*, v. 29, p. 44-48, 2003.

Ikeda, M. et al. Frequente ocurrence of apoptosis is an early event in the carcinogenesis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch*, v. 432, p. 43-47, 1998.

Ishida M. et al. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl tranferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch*, v.428, p.229-235, 1996.

Jang, T.J.; Kim, J.R. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol*, v. 35, p. 265-271, 2000.

Kohda, K. et al. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut*, v. 44, p. 456-462, 1999.

Kondo, S. et al. Retroviral transfer of CPP32 beta gene into malignant gliomas *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, v. 5, p. 962-967, 1998.

Lauren, P. The two histological main types of gastric cancer: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v. 64, p. 331-349, 1965.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Lee KM, Lee DS, Yang, JM, Ahn BM, Lee EH, Yoo JY, Kim YJ, Chung IS, Sun HS, Park DH. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis. *Korean J Gastroenterol*, v. 42, p. 12-19, 2003.

Leung, W.K. et al. Apoptosis and proliferation in *Helicobacter pylori*-associated gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 15, p. 1467-1472, 2001.

Mainwaring, P.N. et al. Comparison of in situ methods to assess DNA cleavage in apoptotic cells in patients with breast cancer. *J Clin Pathol*, v. 51, p. 34-37, 1998.

Moss, S. F. et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*, v.38, p.498-501, 1996.

Mc Namara, D. et al. Altered cardia epithelial cell kinetics induced by *Helicobacter pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease: possible malignant potential? *Eur J Gastroenterol Hepatol,* v. 15, p. 767-772, 2003.

Nardone, G. et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut*, v.44, p.789-799, 1999.

Naumann M., Crabtree J.E. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol*, v. 12, p. 29-36, 2004.

NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer diseases. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*, v. 272, p. 65-69, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Ohkura Y. et al. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using image analysis processor. *Gastric Cancer*, v. 6, p. 49-54, 2003.

Otsuki Y., Li Z., Shibata M.A. Apoptotic detection methods-from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem*, v. 38, p. 275-339, 2003.

Pakodi F. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease. An overview. *J Physiol Paris*, v. 94, p. 139-152, 2000.

Parton, M. et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 2100-2108, 2002.

Potthoff, A.S. et al. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter*, v. 7, p. 367-377, 2002.

Satoh, K. et al. Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, v. 35, p. 78-84, 2003.

Schultz D.R., Harrington Jr W.J. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheumatism*, v. 32, p. 345-369, 2003.

Smoot, D.T. et al. Influence of Helicobacter pylori on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 2091-2095, 2000.

Steininger, H. et al. Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. *Virchows Arch*, v.433, p.13-18, 1998.

Tahara E. Genetic pathway of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publi*, v. 157, p. 327-349, 2004.

unesp

Unger, Z. et al. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in cirrelation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 15, p. 389-393, 2003.

Vakkala, M. et al. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*, v. 5, p. 319-324, 1999.

van der Woude, C.J. et al. Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol*, v. 56, p. 699-702, 2003.

van Grieken N.C. et al. Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*, v. 56, p. 358-61, 2003.

von Herbay A., Rudi J. Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microscopy Research Technique,* v. 48, p. 303-311, 2000.

Wagner S. et al. Regulation of gastric apithelial cell growth by Helicobacter pylori: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*, v. 113, p. 1836-1847, 1997.

Wambura C. et al. Cell kinetic balance in gastric mucosa with intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication: 2-year follow-up study. *Dig Liver Dis*, v. 36, p. 178-186, 2004.

Yoshimura, T. et al. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, v. 53, p. 532-536, 2000.

Yoo, N.J. et al. Stomach cancer highly expresses both initiator and effector caspases; an immunohistochemical study. *APMIS*, v. 110, p. 825-832, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela 1. Estatística descritiva dos índices apoptóticos nas amostras de mucosa gástrica normal, lesões benignas e adenocarcinoma gástrico.

Técnica	Amostras	N	Índice Apoptótico (IA) $\bar{x} \pm DP$	Mínimo	Mediana	Máximo	Casos
TUNEL							**TUNEL positivos**
	MN	08	1,82±0,47	0,0	2,0	3,6	0/8
	GC	34	2,60±0,32	0,0	2,3	7,4	3/34 (26,5%)
	GAC	11	3,93±0,63*	0,0	4,4	7,0	6/11 (54,5%)
	UG	17	2,03±0,39	0,0	2,0	7,0	2/17 (11,8%)
	MI	15	2,36±0,41	0,0	2,4	5,2	2/15 (13,3%)
	AG	12	1,97±0,42	0,4	1,6	6,0	1/12 (8,3%)
CPP32							**CPP32 positivos**
	MN	08	3,20±1,31	0,0	2,7	11,0	0/8
	GC	34	13,82±2,58*	0,0	8,4	52,0	15/34 (44,1%)
	GAC	11	6,20±1,57	0,0	5,0	13,4	3/11 (27,3%)
	UG	17	9,47±2,92	0,0	3,4	34,8	4/17 (23,5%)
	MI	15	6,72±1,47	0,8	6,8	24,4	1/15 (6,7%)
	AG	12	8,07±2,75	0,0	4,7	30,8	4/12 (33,3%)

*= $p<0,05$; N= número de casos; MN= mucosa normal; GC= gastrite crônica; GAC= gastrite atrófica crônica; UG= úlcera gástrica; MI= metaplasia intestinal; AG= adenocarcinoma gástrico.



Tabela 2. Resultados do teste t-*Student* para comparação das médias dos índices apoptóticos em cada grupo, considerando-se os casos *H. pylori* positivos (Hp+) e sem a infecção (Hp-), com as técnicas TUNEL e anticorpo CPP32.

Grupos	N	TUNEL		CPP32	
		$\bar{x}$ ±EP	Estatística	$\bar{x}$ ±EP	Estatística
GC Hp+	12	3,30±2,40	P=0,1852(NS)	9,52±4,49	P=0,2248(NS)
GC Hp-	22	2,23±0,30		16,16±3,11	
GAC Hp+	8	3,67±0,82	P=0,5403(NS)	5,27±1,90	P=0,3584(NS)
GAC Hp-	3	4,60±0,81		8,67±2,71	
UG Hp+	13	1,95±0,23	P=0,8449(NS)	12,09±3,52	P=0,0528(NS)
UG Hp-	4	2,3±1,63		1,27±0,82	
MI Hp+	10	2,06±0,57	P=0,3141(NS)	7,72±2,03	P=0,3534(NS)
MI Hp-	5	2,96±0,40		4,72±1,60	
AG Hp+	6	1,37±0,27	P=0,2083(NS)	4,93±1,98	P=0,2901(NS)
AG Hp-	6	2,53±0,75		11,03±5,09	

N= número de casos; (NS)= p>0,05.



Tabela 3. Frequências de casos conforme as variáveis imunomarcação TUNEL e CPP32, infecção pela *H. pylori*, aneuploidias e expressão da proteína p53, nas amostras de gastrite crônica (GC), gastrite atrófica crônica (GAC), úlcerea gástrica (UG), metaplasia intestinal (MI) e adenocarcinoma gástrico (AG).

Variáveis	GC (%)	GAC (%)	UG (%)	MI (%)	AG (%)
TUNEL					
positivo	3/34(8,8)	6/11(54,5)	2/17(11,8)	2/15(13,3)	1/12(8,3)
negativo	31/34(91,2)	5/11(45,4)	15/17(88,2)	13/15(86,7)	11/12(91,7)
CPP32					
positivo	15/34(44,1)	3/11(27,3)	4/17(23,3)	1/15(6,7)	4/12(33,3)
negativo	19/34(55,9)	8/11(72,7)	13/17(76,4)	14/15(93,3)	8/12(66,7)
H. pylori					
positivo	12/34(35,3)	8/11(72,7)	13/17(76,5)	10/15(66,7)	6/12(50)
negativo	22/34(64,7)	3/11(27,3)	4/17(23,5)	5/15(33,3)	6/12(50)
Aneuploidias					
presente	5/34(14,7)	4/11(36,4)	10/17(58,8)	9/15(60)	7/12(58,3)
ausente	29/34(85,3)	7/11(63,6)	7/17(41,2)	6/15(40)	5/12(41,7)
p53					
positivo	5/19(26,3)	1/8(12,5)	2/15(13,3)	2/11(18,2)	8/10(80)
negativo	14/19(73,7)	7/8(87,5)	13/15(86,7)	9/11(81,9)	2/10(20)

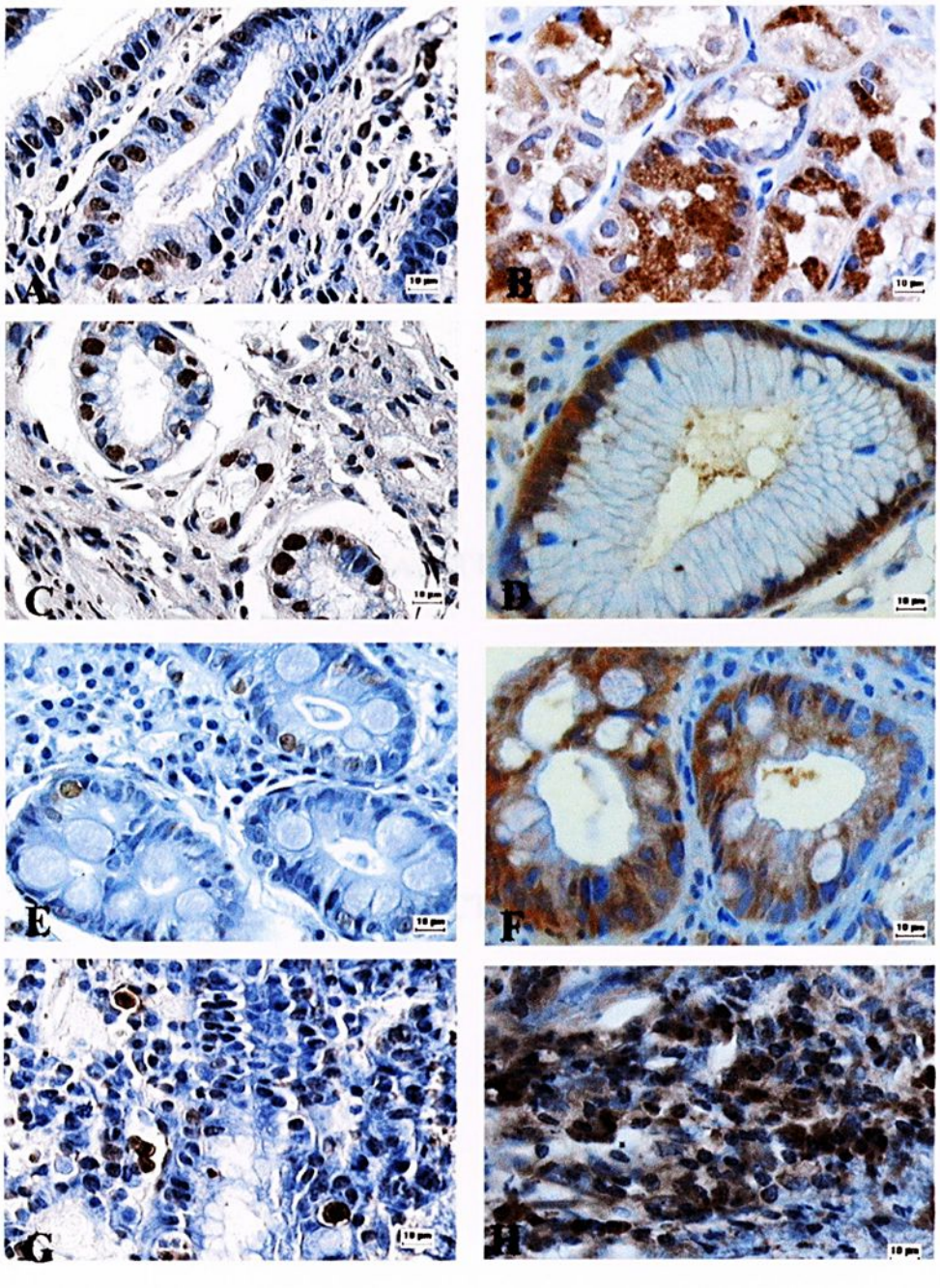


Figura 1- Células apoptóticas imunomarcadas respectivamente, pelas técnica TUNEL (núcleos corados em marrom) e anticorpo para CPP32 (citoplasma corado em marrom), em (A-B) gastrite crônica; (C-D) úlcera gástrica; (E-F) metaplasia intestinal e (G-H) adenocarcinoma gástrico. Aumento original de 400x.

CAPÍTULO III

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO, EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DOS ONCOGENES *CICLINA D1* E *C-ERBB2* NOS DOMÍNIOS INTERFÁSICOS CROMOSSÔMICOS EM TUMORES DE ESÔFAGO E ESTÔMAGO PELA TÉCNICA DE FISH

As neoplasias de estômago e esôfago são os tipos mais freqüentes que afetam o trato gastrintestinal, principalmente o sexo masculino e idosos (KARKERA et al., 1999; PACK et al., 1999). No Brasil, ocupam respectivamente, o 10° e 3° lugar em relação aos demais tipos de câncer (INCA, 2004).

Alguns fatores ambientais parecem estar relacionados com o desenvolvimento de ambos os tumores, como consumo de alimentos contaminados por fungos (*Aspergillus)* no câncer de esôfago, dietas ricas em nitritos e nitrosaminas, fumo, álcool, e no câncer gástrico também a infecção pela bactéria *H. pylori* e lesões gástricas benignas (DE VITA et al., 1997; COTRAN et al., 1999).

Nos tumores de esôfago os carcinomas de células escamosas são os mais importantes, correspondendo a 10% de todas as neoplasias do trato alimentar. Enquanto, entre as neoplasias malignas do estômago, o adenocarcinoma derivado da mucosa epitelial é o mais comum e importante, com freqüência de 90-95% dos casos (COTRAN et al., 1999).

As alterações genéticas observadas em carcinomas de esôfago parecem ser distintas das descritas em adenocarcinomas, possivelmente em conseqüência de diferentes fatores etiológicos. Em carcinomas de células escamosas (CCE), têm sido observado ganho de algumas regiões relacionadas com oncogenes, como 11q13 (*INT-2, HST-1, CCND1/PRAD1*), 7p11-15 (*EGFR*), 7q21.1 (*HGF*) e 7q31 (*HGFR*), e perdas de outras regiões contendo genes supressores de tumor, como 9p (*MTS1/CDKN2*), 11p (*WT1, KA11*), 13q (*RB1*) e 17p (*TP53*) (DU PLESSIS et al., 1999). As alterações moleculares mais importantes são as mutações em *TP53* (STEMMERMANN et al., 1994; ROBERT et al., 2000) e as amplificações dos oncogenes *CCND1, c-MYC, c-ERBB-2* e *MDM2,* constituindo fatores prognósticos significativos de sobrevida reduzida (KANDA et al., 1994; SHIMADA et al., 1997).

Em neoplasias gástricas, há dificuldades em estabelecer uma relação entre alterações genéticas específicas e o curso clínico da doença. Contudo, o ganho de diferentes regiões cromossômicas é mais observado do que as perdas, destacando-se a amplificação na região 17q21 (SAKAKURA et al., 1999; KOO et al., 2000). Estudos moleculares têm revelado amplificações dos oncogenes *c-ERBB-2, K-SAM* e *c-MYC* e do gene para o fator

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

de crescimento epidérmico (*EGF*), e mutações nos genes *K-RAS, TP53* e *APC* (KOO et al., 2000; WANG et al., 2001; KOZMA et al., 2001).

Como pode ser observado, as alterações genéticas comuns a tumores de esôfago e estômago incluem as amplificações dos oncogenes *c-ERBB-2* e *CCND1*. No caso do c-*ERBB-2 (HER-2/NEU)*, a expressão aumentada da proteína e amplificação também tem sido referida em câncer de mama (GUSTERSON et al., 1992; LEAR-KAUL et al., 2003), ovário, gástrico (TAKFHANA et al., 2002) e de pulmão (HIRSCH et al., 2003). Esse gene, mapeado em 17q12-21, codifica uma proteína transmembrânica de 185kd (p185 ou her-2/neu) com atividade tirosina quinase (BAST et al., 2000), estruturalmente semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que interage com outros membros da família EGFR, durante o ciclo celular (KRAUSE et al., 2000, OHTA et al., 2001, RABBANI et al., 2001). Vários estudos têm indicado que a expressão aumentada do c-*ERBB-2* é uma causa (e não somente conseqüência) de vários tipos de câncer humano (TAKFHANA et al., 2002; LEAR-KAUL et al., 2003) e, no caso do câncer de mama, tem sido associada à sobrevivência reduzida e risco aumentado de metástases (HUNG; LAU, 1999), conferindo uma resposta pior a certos tipos de terapia, como uso do anticorpo Herceptin (DI LEO et al., 2002; LEAR-KAUL et al., 2003).

Em adenocarcinoma de esôfago, a expressão elevada da proteína her-2/neu está relacionada com tumores avançados (estádio III e IV), indicando que a amplificação desse gene parece ser um evento tardio durante o desenvolvimento e a progressão tumoral (POLKOWSKI et al., 1999), podendo ser correlacionada com sobrevida reduzida, gravidade do tumor invasivo e metástases em linfonodos (BRIEN et al., 2000; SMITH et al., 2001). Em carcinoma de células escamosas de esôfago, de modo contrário, a expressão aumentada dessa proteína parece ocorrer em estágios precoces do desenvolvimento tumoral. Lam et al. (1998) mostraram que 10% dos casos de CCE bem diferenciados com mucosa inflamada manifestavam aumento da expressão da proteína her-2/neu.

Nos tumores gástricos a expressão elevada da proteína está associada com presença de metástases (NESSLING et al., 1998; VIDGREN et al., 1999; VARIS et al., 2002), mas no tipo intestinal, também pode indicar um prognóstico para evolução tumoral (BECKER et al., 2000; TAHARA, 2004).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Outro gene, cuja amplificação ou expressão aumentada tem sido associada com vários tipos de carcinomas incluindo mama, cabeça e pescoço, pulmão, fígado, pâncreas, estômago, pele, esôfago, bexiga e tumores hematopoéticos é o gene que codifica a proteína ciclina D1 (MYUNG et al., 2000; MANAL et al., 2001; NADAL et al., 2003; SOVERINI et al., 2003). Esse oncogene foi inicialmente denominado *PRADD-1* ou *CCND1* e mapeado na região 11q13, juntamente com os genes *INT-2* e *HST-1* (MOTOKURA et al., 1991; BOSCH et al., 2004). Seu produto foi classificado como uma ciclina de fase G1 e desempenha importante papel na regulação do ciclo celular (HUNTER et al., 1991; NAGASAWA et al., 2001; HUANG et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2003), acelerando a entrada da célula na fase S e ativando a fosforilação da pRB mediada pela cdk4 (TAM et al., 1994; BRANDAU et al., 2001; VIELBA et al., 2003). A expressão aumentada da proteína ciclina D1 também ocorre, mas pode estar ou não relacionada com a amplificação gênica (MIYAMOTO et al., 2003; MORENO-BUENO et al., 2003).

Embora alguns estudos tenham detectado expressão elevada da ciclina D1 em uma parcela dos casos de câncer gástrico, ainda não foi observada uma relação com o grau e o estadiamento do tumor ou um significado prognóstico (YASOGAWA et al., 1998; MULLER et al., 1999; TAKANO et al., 1999; AOYAGI et al., 2000; BLOK et al., 2000; MIEHLKE et al., 2002). A expressão aumentada da ciclina D1 tem sido associada mais freqüentemente com pacientes de idade avançada (ARBER et al., 1999) e nos casos de lesões hiperplásicas gástricas, com a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (MURAKAMI et al., 2001).

A participação do oncogene *CCND1* nos tumores de estômago, portanto ainda é controversa. Pois, alguns estudos têm associado a ativação desse oncogene com prognóstico ruim (RABBANI et al., 2000) e progressão da doença (OSMAN et al., 1997), enquanto outros relacionam a expressão aumentada da proteína com tumores de baixo grau e estadiamento (SUWA et al., 1998; NIEHANS et al., 1999; WAGNER et al., 1999; TAKABA et al., 2000), sugerindo uma ligação com diferenciação, mas não com progressão tumoral (SUWA et al., 1998).

Nos carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas de esôfago, e nos tumores de cabeça e pescoço e de laringe, a amplificação do oncogene *CCND1* também está relacionada com um prognóstico ruim, levando a uma invasão local, metástases em

linfonodos, estágio avançado da doença e aumento no risco de recorrência (NAGASAWA et al., 2001; ISHIZUKA et al., 2002; OZAWA et al., 2002; MADAL et al., 2003; MILLER et al., 2003; MIYAMOTO et al., 2003). Tanto a amplificação do oncogene como a expressão aumentada da proteína ciclina D1 parecem estar relacionadas com uma resistência do tumor ao tratamento quimioterápico em câncer de esôfago (NAGASAWA et al., 2001).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) vem sendo empregada em muitos estudos de arquitetura nuclear, empacotamento e organização da cromatina e para a determinação de territórios cromossômicos (HENG et al., 1997; CROFT et al., 1999; BARTOVÁ et al., 2000).

O território cromossômico é uma região discreta do volume nuclear ocupada pelo cromossomo durante o ciclo celular (VISSER; ATEN, 1999, 2000; MAHY et al., 2002; PARADA et al., 2002). Considerando-se que os mecanismos de regulação e expressão gênica estão relacionados não apenas com uma seqüência linear de DNA, mas com uma estrutura tridimensional que afeta a regulação gênica durante o ciclo celular (EDELMANN et al., 2001), o estudo do território cromossômico pode trazer dados importantes sobre tais mecanismos.

Zirbel et al. (1993) observaram, em diferentes células de mamíferos utilizando uma combinação de imunodetecção e FISH, que os transcritos de RNA e a maquinaria de *splicing* ocupavam geralmente a periferia dos territórios cromossômicos. Esses achados levaram estes autores a propor o modelo de Compartimentalização de Domínios Intercromossômicos (ICD), segundo o qual os genes ativos estão posicionados na periferia dos territórios cromossômicos interfásicos, onde ficam mais acessíveis à maquinaria transcricional, e os RNAs recém-sintetizados são depositados diretamente no espaço intercromatínico. Park; De Boni (1998) verificaram, em câncer de mama, que o gene *c-ERBB-2* está localizado preferencialmente na periferia do domínio do cromossomo 17, o que pode representar um mecanismo de controle fundamental na expressão gênica. Do mesmo modo, quando células leucêmicas foram estimuladas para a diferenciação em granulócitos por dimetilsulfoxido (DMSO) ou ácido retinóico, o gene c-*MYC*, localizado no cromossomo 8, foi visualizado pela técnica de FISH na periferia nuclear (BARTOVA et al., 2000). Volpi et al. (2000), utilizando sondas para toda extensão do cromossomo 6 e de

seqüência única para os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), mostraram que os genes desse complexo, quando ativos, localizavam-se preferencialmente na periferia do domínio do cromossomo 6. Esses dados sugerem, portanto, que o posicionamento de seqüências ativas na periferia dos territórios cromossômicos está relacionado com sua transcrição (VERSCHURE et al., 1999; CHEVRET et al., 2000). Por outro lado, Mahy et al. (2002) estudando algumas seqüências gênicas (*RCN, PAXNEB, WT1* e *PAX6*) ativas em tumor de Wilms (aniridia, anomalias genitourinárias) e síndromes de retardo mental pela técnica FISH, observaram que os genes transcricionalmente ativos não estavam localizados preferencialmente na periferia dos territórios cromossômicos. Desse modo propuseram que ocorre uma mobilidade das proteínas e enzimas relacionadas com a transcrição gênica dentro de compartimentos subcromossômicos, portanto não necessitando exclusivamente de uma posição periférica ou externa preferencial de tais genes.

Considerando-se que os diferentes estudos não evidenciaram uma associação direta entre amplificação dos genes *CCND1* e *c-ERBB-2* e aumento da expressão protéica, havendo relatos de amplificação sem expressão elevada da proteína, assim como o contrário, ainda são necessários estudos que avaliem esses aspectos. Conjuntamente, será investigada pela técnica FISH, se os genes *CCND1* e *c-ERBB-2* em situações de amplificação e super expressão da proteína, realmente posicionam-se em locais especiais nos núcleos interfásicos quando expressos. Portanto, pretende-se avaliar esses parâmetros em tumores de esôfago e estômago, e os resultados se relacionados com tipo histológico, grau e estadiamento da lesão, poderão contribuir para o entendimento da progressão tumoral e prognóstico dos pacientes.

2. AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES DE REPARO *XRCC1* E *XRCC3* E SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER GÁSTRICO

A tumorigênise gástrica, assim como a de outros órgãos, é considerada um processo de múltiplos passos que envolvem o acúmulo de alterações genéticas. Os fatores ambientais têm grande importância na etiologia dessa neoplasia, principalmente os fatores dietéticos como a dieta rica em sal, alimentos ricos em nitrato ou nitrito, defumados, enlatados, álcool, fumo, infecção pela bactéria *Heliobacter pylori* e história de lesões benignas como gastrite crônica. Esta última engloba uma série de lesões, desde a gastrite superficial até a atrofia gástrica, sendo acompanhada de metaplasia, displasia e atrofia do epitélio superficial com maior predisposição a neoplasia gástrica (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

Estudos de epidemiologia molecular com biomarcadores em diversas populações demonstraram forte interação entre exposição a fatores ambientais e fatores de suscetibilidade genética na determinação do risco de câncer (PERERA, 1997), evidenciando diferentes polimorfismos genéticos. Dentre esses, encontram-se aqueles que afetam os níveis de expressão ou atividade catalítica de enzimas que participam dos processos de ativação e destoxificação de drogas (RAUNIO et al, 1995) e das vias de reparo do DNA (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998).

Os sistemas de reparo do DNA atuam minimizando erros no processo de replicação, removendo danos causados à molécula de DNA e reduzindo os rearranjos deletérios surgidos por recombinação anômala (MOHRENWEISER; JONES, 1998). Estes danos são produzidos por radiação ionizante, luz U.V., álcool, tabaco e vários compostos químicos, assim como por fatores endógenos como hidrólise, oxigênio reativo e outros metabólitos intracelulares que modificam a estrutura das bases do DNA (SEEBERG; EIDE; BJϕRAS, 1995). Deste modo, podem interferir no metabolismo do DNA, incluindo a replicação, transcrição e recombinação, bem como em outras funções celulares importantes como a regulação do ciclo celular e a divisão celular (BENHAMOU; SARASIN, 2000). Portanto, o sistema de reparo do DNA é de fundamental importância na manutenção da integridade do genoma de células somáticas e germinativas (MOHRENWEISER; JONES, 1998).

Várias doenças humanas, como as síndromes de instabilidade cromossômica, caracterizadas pela deficiência em um dos vários mecanismos de reparo estão associadas à alta freqüência de neoplasias (BENHAMOU; SARASIN, 2000). A eficiência da reparação do DNA varia entre os indivíduos, assim a capacidade de reparo reduzida pode constituir um fator de risco para vários tipos de neoplasias. Isto pode se devido a alelos que são

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

encontrados em freqüências polimórficas na população geral e possuem penetrância incompleta (MOHRENWEISER; JONES, 1998).

Shen et al. (1998) identificaram vários polimorfismos em genes codificadores de proteínas envolvidas nas vias de reparo, cujas freqüências variaram de 0,04 a 0,38. Dentre os polimorfismos já detectados, encontram-se os dos genes *XPD, XPF, XRCC1* e *XRCC3*. As proteínas dos genes *XRCC1* e *XRCC3* foram identificadas por restabelecer a capacidade de reparo respectivamente, na linhagem mutante de células de ovário de hamster chinês (CHO) EM9 e irs1SF (AA8), que são sensíveis à radiação ionizante e outros agentes que lesam o DNA (LUNN et al, 1999). Esses genes fazem parte de um grupo de genes de reparo denominados pelo símbolo *XRCC*, uma abreviação de X-Ray Repair Cross Complementing, e representam componentes de diferentes vias de reparo do DNA (THACKER; ZDZIENICKA, 2003).

O gene *XRCC1* localiza-se no cromossomo 19 (19q13.2-q13.3) ((MOHRENWEISER; JONES, 1998) e é composto de 17 exons (THOMPSON; WEST, 2000). Este gene codifica a proteína XRCC1 de 70kDa (SHEN et al, 2000), que associa-se diretamente com outras três proteínas, a DNA polimerase β, a DNA ligase III e a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), em um complexo que facilita o processo de reparo de excisão de bases (BER) ou reparo de quebras em fita simples do DNA (CALDECOTT et al, 1996). A XRCC1 é imprescindível na formação do complexo com as demais proteínas, o que sugere seu papel como facilitador ou coordenador no sistema de reparo. (CALDECOTT et al, 1996). Shen et al (1998) identificaram três polimorfismos no gene *XRCC1* em regiões codificadoras dos códons 194 (C-T) no éxon 6, 280 (G-A) no éxon 9 e 399 (G-A) no éxon 10, com freqüências alélicas de 0,25, 0,08 e 0,25, respectivamente. Esses polimorfismos resultam na substituição não conservativa respectivamente, dos aminoácidos arginina por triptofano (Arg-Trp), arginina por histidina (Arg-His) e arginina por glutamina (Arg-Gln).

Alguns estudos que avaliaram as freqüências das variantes alélicas do gene *XRCC1* em diferentes lesões malignas e pré-malignas em populações humanas têm referido o códon 399 do gene *XRCC1* como o polimorfismo mais freqüente e possível marcador de suscetibilidade em diferentes neoplasias, como do esôfago (LEE et al, 2001; YU et al, 2004), mama (DUELL et al, 2001), pulmão (DIVINE et al, 2001; CASSE; HU;

AHRENDT, 2003), câncer gástrico (SHEN et al, 2000), carcinoma colorretal (ABDEL-RAHMAN et al, 2000), câncer de cabeça e pescoço (STURGIS et al, 1999) e cirrose alcoólica (ROSSIT et al, 2002).

O gene *XRCC3* mapeado em 14q32.3 (CUI et al, 1999), codifica uma proteína, a XRCC3, que está envolvida no reparo de quebras de cadeia dupla do DNA (DSB). O reparo por recombinação homóloga repara o DNA pela recombinação entre a cadeia danificada e a sequência homóloga presente na outra cópia normal do gene, contida em células diplóides. Este sistema de reparo é muito importante na prevenção de fragmentação cromossômica, translocações e deleções que podem levar a carcinogênese (WINSEY et al, 2000). Shen et al (1998) identificaram um polimorfismo na região codificadora do códon 241, no éxon 7, do gene *XRCC3*. Este polimorfismo resulta da substituição de citosina por timina, levando a mudança do aminoácido treonina (Thr) para metionina (Met), com a substituição de um aminoácido hidroxila para um sulfidrila, o que pode representar uma mudança substancial nas características da proteína (WINSEY et al, 2000).

Alguns estudos relacionaram o polimorfismo Thr241Met do gene *XRCC3* com a exposição ambiental a aminas aromáticas, que são capazes de gerar adutos e induzir lesões no DNA (MATULLO et al, 2001). Essa variante alélica do gene *XRCC3* tem sido identificada em indivíduos saudáveis com uma frequência de 0,23 a 0,38 (SHEN; JONES; MOHRENWEISE, 1998; WINSEY et al, 2000; MATULLO et al, 2001). A presença do polimorfismo Thr241Met foi associada com o aumento da suscetibilidade ao câncer de bexiga (MATULLO et al, 2001), melanoma (WINSEY et al, 2000) e mama (SMITHA et al, 2003).

Dada a complexidade da atuação das proteínas XRCC1 e XRCC3 no sistema de reparo do DNA, e considerando que ainda não há estudos sobre as freqüências desses polimorfismos na população brasileira e escassez de resultados sobre a associação desses genes com câncer gástrico, são necessários estudos adicionais. Portanto, propomos tal avaliação, cujos resultados podem auxiliar no entendimento do significado funcional dos polimorfismos moleculares destes genes e de suas conseqüências na suscetibilidade ao câncer gástrico, cuja etiologia está relacionada com a atuação de carcinógenos ambientais, como tabagismo, etilismo, infecção pela *H. pylori* e a gastrite crônica.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

3. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DOS GENES *TP53, FHIT* E *MTS-1* EM MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO E ASSOCIAÇÃO COM VARIABILIDADE GENÉTICA DO *TRYPANOSOMA cruzi*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana constitui uma das mais importantes endemias do Brasil e da América Latina, com estimativas de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e 120 milhões expostas ao risco de adquirí-la nesse continente (MONCAYO, 1999). Essa doença é uma infecção parasítica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que em condições naturais, é transmitido ao homem por insetos vetores, podendo ocorrer também pela exposição a sangue contaminado ou como resultados de acidentes laboratoriais (ANDRADE et al., 2002). Apesar da descoberta há quase 100 anos, estima-se, atualmente, que a doença de Chagas no Brasil atinja 4% da população rural, com maiores índices nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás, Sergipe e Bahia, o que corresponde a cinco milhões de afetados (SOUTO JUNIOR; RIBEIRO, 2003).

O curso clínico da doença é variável, com uma fase aguda sintomática ou assintomática e uma fase crônica que pode perdurar por 15 a 20 anos, ou por toda a vida, e são raríssimos os casos de cura espontânea (SOUTO JUNIOR; RIBEIRO, 2003).

No Brasil, 50 a 60% dos chagásicos encontram-se na fase crônica, sem manifestações clínicas, mas calcula-se que, a cada ano, 2 a 4% desses pacientes passem à forma crônica clinicamente definida, apresentando sintomas da doença no coração, esôfago ou intestino grosso. A doença é geralmente progressiva e mais comum no sexo masculino, a partir dos 30 ou 40 anos. Na fase crônica, a forma cardíaca é a mais grave (SOUTO JUNIOR; RIBEIRO, 2003). No tubo digestivo, somente nos casos mais graves, 10 a 20 anos após a infecção inicial, é que surge em 20 a 30% dos pacientes o megaesôfago e o megacólon (LANA; TAFURI, 2000).

O megaesôfago ou dilatação do esôfago, também conhecido como acalasia, é caracterizado pela destruição ou ausência dos plexos nervosos intramurais determinando a ausência de peristaltismo ao nível do corpo do órgão e a falta de abertura do esfíncter esofagiano inferior em resposta à deglutição, assim iniciando-se a retenção do bolo alimentar (estase esofágica) na luz do órgão (PINOTTI et al., 1996). O sintoma clínico clássico do megaesôfago é a dificuldade para engolir (disfagia) que ocorre de modo progressivo, podendo ocorrer também a regurgitação e a aspiração noturnas do alimento

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

não digerido (COTRAN et al., 1999). A estase de alimentos, conseqüentemente, provoca a inflamação da mucosa (esofagite), que pode determinar o aparecimento de acantose, paraceratose e leucoplasia, lesões possivelmente pré-cancerosas (PINOTTI et al., 1996).

Devido ao polimorfismo biológico das populações de *Trypanosoma cruzi*, diferentes clones de uma linhagem devem apresentar tropismo para diferentes tecidos, e assim, um importante fator determinante do curso clínico da doença deve ser a "constelação" específica de clones infectantes em abundância e seus tropismos específicos (MACEDO; PENA, 1998). Esse tropismo tecidual estaria baseado em interações moleculares complementares no nível de superfície celular entre clones invasores de *T. cruzi* e os tecidos dos hospedeiros (músculo cardíaco, plexos mioentéricos no esôfago e reto, etc). Este cenário constitui o centro do chamado "modelo histotrópico-clonal" da doença de Chagas (MACEDO; PENA, 1998).

Recentemente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas, pela abundância de seqüências de DNA repetidas principalmente do cinetoplasto, sendo utilizada como alternativa no diagnóstico da doença (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003, para revisão).

O primeiro avanço na resolução da variabilidade genética do *T. cruzi* foi a descoberta de polimorfismos no tamanho dos fragmentos de restrição do DNA do cinetoplasto (kDNA) (MOREL, 1980). A porção variável de 330pb da molécula do minicírculo do kDNA evolui rapidamente, o suficiente para produzir diferenças entre isolados ou ainda clones, mas não tão rapidamente para impedir uma identidade estável da linhagem (MACEDO; PENA, 1998). Recentemente foi desenvolvida a técnica de LSSP-PCR (*Low-stringency single specific primer-Polymerase chain reaction*), que permite a amplificação de um segmento de DNA usando um único *primer* específico do kDNA do parasita sob condições de estringência muito baixas (VAGO et al., 1996).

Uma das complicações tardias mais sérias do megaesôfago chagásico é o risco aumentado de cerca de 3% a 8% dos pacientes desenvolverem carcinoma de células escamosas do esôfago - CCE (BRÜCHER et al., 2001). Esse tipo de carcinoma desenvolve-

se em aproximadamente 5% dos pacientes com megaesôfago chagásico em uma idade muito mais jovem em relação àqueles sem essa doença (COTRAN et al., 1999). O desenvolvimento do tumor está relacionado ao contato prolongado de agentes carcinogênicos alimentares com a mucosa devido à estase esofágica, aumento do crescimento bacteriano e irritação química que culminam na esofagite crônica (SAFATLE-RIBEIRO et al., 2000). Assim, a maior incidência de câncer nos pacientes portadores de megaesôfago pode estar relacionada à ocorrência dessas alterações inflamatórias da mucosa (PINOTTI et al., 1996).

A detecção do carcinoma nesses pacientes é dificultada pelo fato dos sintomas serem encobertos pela disfagia severa provocada pela acalásia (CHINO et al., 2000). Nestes casos o diagnóstico é realizado freqüentemente em estágio avançado, provavelmente porque o tumor pode progredir assintomaticamente no esôfago dilatado (HAUBRICH et al., 1995), sendo o prognóstico considerado ruim (BRÜCHER et al., 2001).

O câncer de esôfago apresenta uma taxa de incidência elevada em países como a China, Japão, Cingapura e Porto Rico. No Brasil, está entre os dez mais prevalentes, com estimativas de 8.895 casos novos e 5.595 óbitos (INCA, 2004).

Além de fatores ambientais e patológicos descritos, vários fatores genéticos estão associados a carcinogênese esofágica, tais como aneuploidias, deleções alélicas, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (MONTESANO et al., 1996).

Dentre as alterações genéticas já descritas em câncer esofágico, podem-se destacar, tanto em carcinomas de células escamosas quanto em adenocarcinomas, ganho e perda de vários cromossomos, e também de algumas regiões que podem abrigar genes responsáveis pela predisposição a essa neoplasia, tais como *FHIT* (3p14.2), *EGF-R* (7p11-15), *HGF* (7q21.1), *HGF-R* (7q31), *MTS1/CDKN2* (9p21-22), *WT1, KA11* (11p), *INT-2, HST-1, CCND1/PRAD1* (11q13), *RB1* (13q) e *TP53* (17p13) (MORI et al., 2000; TADA et al., 2000; KITAMURA et al., 2001; ROTH et al., 2001; SMEDS et al., 2002; TOKUGAWA et al., 2002; NOGUCHI et al., 2003; HU et al., 2004).

Enquanto em CCE estão estabelecidas algumas alterações genéticas nos estágios iniciais e avançados da carcinogênese, em acalásia ou megaesôfago chagásico, uma de suas

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

lesões precursoras, são escassos estudos genéticos. Até o momento, são descritas apenas alterações na expressão das proteínas p53 e p16 em pacientes com acalásia idiopática associada ou não com carcinoma esofágico (CHINO et al., 2000; SAFATLE-RIBEIRO et al., 2000). Recentemente, observamos a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17 em 60% dos casos de pacientes com megaesôfago chagásico e deleção do gene *TP53* em 54,5% deles. Estes resultados podem indicar um risco elevado para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esôfago nesses pacientes, já que o megaesôfago é considerado uma lesão pré-neoplásica e a deleção do gene *TP53* ocorre nos estágios iniciais da carcinogênese esofágica (MANOEL-CAETANO et al., 2004).

Considerando-se a participação de mutações nos genes *TP53, FHIT* e *MTS1* relacionados com a iniciação da carcinogênese esofágica, pretendemos investigar a ocorrência de mutações pela técnica de PCR-SSCP nos éxons 5 e 7 dos genes *TP53* e *FHIT*, e nos éxons 1 e 2 do gene *MTS-1* em biópsias de pacientes com megaesôfago chagásico e em indivíduos chagásicos sem megaesôfago, em comparação com carcinomas de células escamosas do esôfago. Também será avaliado os polimorfismos do kDNA do parasita *Trypanosoma cruzi,* nos pacientes com megaesôfago chagásico e nos chagásicos sem megaesôfago, tanto no sangue periférico como no tecido infectado, e possível associação com as alterações genéticas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman, S.Z. et al. Inheritance of the 194*Trp* and the 399*Gln* variant aleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Letters,* v.159, p.79-86, 2000.

American Psichiatric Association. Task Force on DSM-IV. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR.* 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.

Andrade, L.O. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*, v.100, p.269-275, 2002.

Aoyagi, K. et al. Immunohistochemical study on the expression of cyclin D1 and E in gastric cancer. *Kurume Med.*, v. 47, p. 199-203, 2000.

Arber, N., et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. *Hum Pathol*, v.30, p.1087-1092, 1999.

Baak, J.P.A. et al. Genomics and proteomics in cancer. *European J Cancer,* v. 39, p. 1199-1215, 2003.

Bailey, A. et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med,* v. 25, p. 63-77, 1995.

Balmain, A; Gray, J; Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genet (supplement),* v. 33, p. 238-244, 2003.

Bartová, E.M., et al. Nuclear topography of the c-myc gene in human leukemic cells. *Gene*, v.244, p.1-11, 2000.

Bast, R.C., et al. *Cancer Medicine*. BC Decker Inc. 5th edition, Ontario, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Becker, K.F., Keller, G., Hoefler, H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol.*, v. 9, p. 5-11, 2000.

Benhamou, S.; Sarasin, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mut Res*, v.462, p.149-58, 2000.

Blok, P., et al. Lack of cyclin D1 overexpression in gastric carcinogenesis. *Histopathology*, v. 36, p.151-155, 2000.

Bosch, F. et al. PRAD-1/Cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood,* v.84, p.2726-2730, 1994.

Bradford, Y. et al. Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. *Am J Med Genet,* v. 105, p.539-547, 2001.

Brandau, S.; Bölhe, A. Bladder cancer. Molecular and Genetic Basis of carcinogenesis. *Eur Urol*, v. 39, p. 491-497, 2001.

Brien, T.P., et al. HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barret's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum Pathol*, v.31, p.35-39, 2000.

Brücher, B.L.D.M. et al. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence and prognosis. *World J Surg*, v.25, p.745-749, 2001.

Caldecott, K.W. et al. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*, v.24, p.4387-94, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Casse, C., Hu, Y.C., Ahrendt, S.A. The *XRCC1* codon 399 Gln allele is associated with adenine to guanine *p53* mutations in non-small cell lung cancer. *Mut Res*, v.528, p.19-27, 2003.

César, A.C.G., Silva, A.E.; Tajara, E.H. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol,* v. 39, p. 253-259, 2002.

César, A.C.G. et al. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. *Braz J Microbiol*, 2004a, *submitted.*

César, A.C.G. et al. Aneuploidies, deletion and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet,* 2004b, *in press.*

César, A.C.G. et al. Genetics alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004c, *submitted.*

Colombo, J.; Fett-Conte, A.C.; Silva, A.E. Polimorfismos cromossômicos das regiões organizadoras de heterocromatina constitutiva e organizadora de nucléolo em distúrbios autísticos e síndrome de Down. *HB Científica*, v. VII, p.15-27, 2000.

Colombo, J. et al. *GSTT1, GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a brazilian population. *World J Gastroenterol*, v. 10, p. 1240-1245, 2004.

Cook, E.H Jr et al. Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am J Hum Genet,* v. 62, p.1077-1083, 1998.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. *Pathologic Basis of Disease*. 6ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, 1425p.

Croft, J.A. et al. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol,* v. 145, p. 1119-1131, 1999.

Chakrabarti, S.; Fombonne, E. Pervarsive develpmental disorders in preschool children. *JAMA,* v. 285, p. 3093-3099, 2001.

Chevret, E.; Volpi, E.V.; Sheer, D. Mini-review: form and function in the human interphase chromosome. *Cytogenet Cell Genet*, v. 90, p.13-21, 2000.

Chino, O. et al. Clinicopathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analysis of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. *Anticancer Res*, v.20, p.3717-3722, 2000.

De-Vita, V.T. Jr.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. *Cancer-Principles e Practice of Oncology.* 5th ed. v.1: Philadelphia, New York:Lippincott-Raven, p.1154, 1997.

Di Cézar, L.B. et al. Chromosomal aneuploidies in bladder cancer, chronic cystitis and normal urothelium detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, p. 517-522, 2002.

Di Cézar, L.B.; Oliveira-Filho, A.B.; Silva, A.E. Carcinoma de Células Transicionais da Bexiga (CCT): Detecção precoce de alterações genéticas como fator diagnóstico e prognóstico da progressão tumoral. *J Bras Med, 2004, in press.*

Di-Leo, A. et al. Current status of HER-2 testing. *Oncology*, v. 63, p. 25-32, 2002. Divine, K.K. et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mut Res*, v.461, p.273-8, 2001.

Du Plessis, L. et al. Mapping of novel regions of DNA gain and loss by Comparative Genomic Hybridization in esophageal carcinoma in the black and colored populations of South Africa. *Cancer Res*, v.59, p.1877-1883, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Duell, E.J. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis,* v.21, p.965-71, 2001.

Edelman, P. et al. Morphology and dynamics of chromosome territories in living cells. *Biochimica Biophysica Acta*, v.1551, p. 29-40, 2001.

Estécio, M.R.H.; Fett-Conte, A.C.; Silva, A.E. Relevância da genética na etiologia do autismo. *J Bras Psiquiatr*, v.49, p.239-246, 2000.

Estécio, M.R.H. et al. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord,* v.32, p.35-41, 2002.

Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell,* v. 61, p. 759-767, 1990.

Filipek, P.A. et al. Practice parameter: screening and diagnosis of autism: repport of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology,* v. 55, p. 468-479, 2000.

Filipek, P.A. et al. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord,* v. 29, p. 87-89, 1999.

Fombonne, E. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry,* v. 7, p. S4-S6, 2002.

Fombonne, E. The prevalence of autism. *JAMA,* v. 289, p. 87-89, 2003.

Gadia, C.A.; Tuchman, R.; Rotta, N.T. Autismo e doenças invasivas do desenvolvimento. *Jornal de Pediatria,* v. 80, p. S83-S94, 2004.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Gillberg, C.; Coleman, M. Prevalence of autism and autisti-like conditions. The Biology of the Autistic Syndromes. New York: Mac Keith Press; 1992. p.85-95.

Giunco, C.T. et al. Investigação de malformações físicas menores em portadores de transtornos invasivos do desenvolvimento. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria,* 2004a, *submitted.*

Giunco, C.T. et al. Analyses of familial aggregation of the broad phenotypes in relatives of patients with Pervarsive Developmental Disorders. *Genet Mol Biol,* 2004b, *submitted.*

Giunco, C.T. et al. Syndrome of Cohen associated with autism. *Genetic Counseling,* 2004c, *submitted.*

Giunco, C.T. et al. MOMO syndrome associated with autism: a case report. *Genetic Counseling,* 2004d, *submitted.*

Gusterson, B.A. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, v.10, p. 1049-1056, 1992.

Haubrich, W.S; Schaffner, F; Berk, J.E. *Gastroenterology*. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, v.1. 1995. 881p.

Heng, H.Q.; Spyropoulos, B.; Moens, P. FISH technology in chromosome and genome research. *Bio Assays*, v. 19, p. 75-84, 1997.

Hirsch, F.R. et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: prespectives for target therapies. *Lung Cancer*, v. 41, p. 29-42, 2003.

Hirsch, F.R. et al. Evaluation of HER-2/ neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer*, v. 86, p. 1449-1456, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Hollander, E. et al. Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. *Psychiatry Res,* v. 117, p. 11-16, 2003.

Hu, N. et al. High frequency of CDKN2A alterations in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk Chinese population. *Genes Chromosomes Cancer*, v.39, p.205-216, 2004.

Huang, X. et al. High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells. *PNAS*, v. 99, n.17, p.11369-11374, 2002.

Hung, M-C.; Lau, Y-K. Basic Science of HER-2/neu: A Review. *Semin Oncol*, v.26, p. 51-59, 1999.

Hunter, T.; Pines, J. Cyclins and cancer. *Cell,* v. 66, p.1071-1074, 1991.

INCA (Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em www.inca.org.br

Jallepalli, P.V.; Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer, cutting through the mystery. *Nature Rev Cancer,* v. 1, p. 109-117, 2001.

Kanda, Y. et al. Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell-lines. *Int J Cancer*, v.58, p.291-297, 1994.

Karkera, J. et al. Systematic screening of chromosome 18 for loss of heterozygosity in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, v.111, p.81-86, 1999.

Kitamura, A. et al. Reduced Fhit expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis. *Oncology*, v.61, p.205-211, 2001.

Koo, S.H. et al. Genetic Alterations of Gastric Cancer: Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence In Situ Hybridization Studies. *Cancer Genet Cytogenet*, v.117, p.97-103, 2000.

Kozma, L. et al. C-myc amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*, v.21, p.707-710, 2001.

Krause, F.S. et al. Molecular genetic methods in the diagnosis of invasive bladder cancer. *Anticancer Res*, v. 20, p.5015-5022, 2000.

Lam, K.Y.; Tin, L.; Ma, L. C-erbB-2 protein expression in oesophageal squamous epithelium from oesophageal squamous cell carcinomas, with special reference to histological grade of carcinoma and pre-invasive lesions. *Eur J Sur Pathol*, v. 24, p. 431-435, 1998.

Lana, M.; Tafuri, W.L. In: Neves, DP. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, 10ª ed., cap.11, 2000. 428p.

Le Couteur, A. et al. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *J Child Psychol Psychiatry,* v. 37, p. 785-801, 1996.

Lear-Kaul, K.C. et al. Her-2/Neu Status in breast cancer metastases to the central nervous systems. *Arch Pathol Lab Med*, v. 127, p.1451-1457, 2003.

Lee, J.M. et al. Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of esophageal cancer. *Int J Cancer,* v. 95, p. 240-246, 2001.

Lengauer, C.; Kinzler, K.W; Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature,* v. 396, p. 643-649, 1998.

Lourenço, S.A.V.; Silva, A.E. *TP53* mutations in a recurrent unicameral bone cyst. *Cancer Genet Cytogenet,* v. 124, p. 175-176, 2001.

Lunn, R.M. et al. XRCC1 polymorphisms: Effects on Aflatoxin B1-DNA adducts and Glycophorin A variant frequency. *Cancer Res*, v.59, p.2557-2561, 1999.

Macedo, A.M.; Pena, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today*, v.14, p.119-124, 1998.

Mahy, N.L. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA wthin chromosome territories. *J Cell Biol*, v.157, p.579-589, 2002.

Manal, O.E. et al. Cyclin D1 by flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. *Leukemia Res*, v. 25, p. 115-123, 2001.

Manoel, F.S.; Tajara, E.H.; Silva, A.E. A acalasia e o câncer esofágico. *J Bras Med,* v. 83, p.29-30, 2002.

Manoel-Caetano, F.S. et al. Cytogenetic alterations in chagasic achalasia compared with esophageal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 149, p. 17-22, 2004.

Matullo, G. et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer*, v.92, p.562-7, 2001.

Miehlke, S. et al. Expression of G1 Phase Cyclins in human gastric cancer and gastric mucosa of first-degree relatives. *Dig Dis Sci,* v.47, p.1248-1256, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Miller, C.T. et al. Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res,* v. 9, p. 4819-4825, 2003.

Miyamoto, R. et al. Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, v. 39, p. 610-618, 2003.

Mohrenweiser, H.W.; Jones, I.M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the provises and perfils of individual and population risk estimation? *Mut Res*, v.400, p.15-24, 1998.

Moncayo, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.94, suppl 1, p.401-404, 1999.

Montesano, R.; Hollstein, M.; Hainaut, P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer*, v.69, p.225-253, 1996.

Moore, V.; Goodson, S. How well does early diagnosis of autism stand the test of time? Follow-up study of children assessed for autism at age 2 and development of an early diagnostic service. *Autism,* v. 7, p. 47-63, 2003.

Morel, C. et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v.77, p.6810-6814, 1980.

Moreno-Bueno, G. et al. Cyclin D1 gene (CCND1) mutation in endometrial cancer. *Oncogene,* v.22, p. 6115-6118, 2003.

Mori, M. et al. Altered expression of Fhit in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res*, v.60, p.1177-1182, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Motokura, T. et al. A novel cyclin encoded by bcl1-linked candidate oncogene. *Nature, v.350*, p.512-515, 1991.

Muhle, R. et al. The genetics of autism. *Pediatrics,* v. 113, p. e472-e486, 2004.

Muller, W. et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins cyclin D1, cyclin E, and their inhibitor p21 WAF1/CIP1 in gastric cancer. *J Pathol*, v.189, p. 186-193, 1999.

Murakami, K. et al. P53, but not c-Ki-ras, mutation and down-regulation of p21 WAF/CIP1 and cyclin D1 are associated with malignan transformation in gastric hyperplastic polyps. *Am J Clin Pathol*, v.115, p. 224-234, 2001.

Myung, N. et al. Loss of p16 and p27 is associated with progression of human gastric cancer. *Cancer Letters*, v. 153, p. 129-136, 2000.

Nadal, A.; Cardesa, A. Molecular biology of larybgeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch,* v. 442, p. 1-7, 2003.

Nagasawa, S. et al. Cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in patients with esophageal carcinoma. *J Surg Oncol,* v.78, p.208-214, 2001.

Nardone, G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol*, v.17, p.75-81, 2003.

Nessling, M. et al. Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes MYCN, MET, WNT2, and ERBB2. *Genes Chromosome Cancer*, v. 23, p.307-316, 1998.

Nienhans, G.A. et al. G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer*, v. 80, p. 1175-1184, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Noguchi, T. et al. FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*, v.11, p.441-447, 2003.

Norppa, H. Genetic susceptibility, biomarker respones, and cancer. *Mut Res*, v. 544, p. 339-348, 2003.

Ohta, J.I. et al. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 2463-2467, 2001.

Ozawa, S.; Kitagawa, Y.; Kitajima, M. Molecular alterations in esophageal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, v. 103, p. 457-462, 2002.

Pack, S.D. et al. Molecular cytogenetic fingerprinting of esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization reveals a consistent pattern of chromosomal alterations. *Genes Chromosome Cancer*, v.25, p.160-168, 1999.

Parada, L.A.; Misteli, T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol,* v.12, p.425-431, 2002.

Park, P.C.; De Boni, U. A specific confomation of the territory of chromosome 17 locates ERBB-2 sequences to a Dnase-hypersensitive domain at the nuclear periphery. *Chromosoma*, v. 107, p.87-95, 1998.

Perera, F.P. Enviroment and cancer: who are susceptible? *Science*, v.278, p.1068-73, 1997.

Pinotti, H.W. et al. Megaesôfago Chagásico. In: Coelho, JCU. *Aparelho Digestivo*. 2.ed. Rio de Janeiro: MDESI, 1996, v.1, p.61-67.

Piven, J. et al. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry,* v. 154, p. 185-190, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Polkowski, W. et al. Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Annals Surgical Oncology*, v.3, p. 290-297, 1999.

Portela-Lindoso, A.A.B; Shikanai-Yasuda, M.A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Saúde Pública*, v.37, p.107-115, 2003.

Rabbani, F.; Cordon-Cardo, C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am,* v.27, p.83-102, 2000.

Raunio, H. et al. Diagnosis of polymorfisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility – a review. *Gene*, v.159, p.113-21, 1995.

Risch, N. et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet,* v. 57, p. 717-726, 1999.

Robert, V. et al. High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis*, v. 21, p.563-565, 2000.

Rossit, A.R.B. et al. Polymorphisms in DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Letters,* v.180, p.173-182, 2002.

Roth, M.J. et al. Genetic progression and heterogeneity associated with the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, v.61, p.4098-4104, 2001.

Rowley, J.D. Chromosome translocations, dangerous liaisons revisited. *Nature Rev Cancer,* v. 1, p. 245-250, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Safatle-Ribeiro, A.V. et al. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev*, v.24, p.13-23, 2000.

Sakakura, C. et al. Gains, losses and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, v.24, p.299-305, 1999.

Sarasin, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mut Res*, v. 544, p. 99-106, 2003.

Schroer, R.I. et al. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *Am J Mol Genet*, v. 76, p. 327-336, 1998.

Seeberg, E.; Eide, L.; Bjφras, M. The base excision repair pathway. *TIBS*.v.20, p.204-10, 1995.

Shao, Y. et al. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorders. *Am J Med Genet*, v. 114, p. 99-105, 2002.

Shen, H. et al. Polymorphism of the DNA repair gene *XRCC1* and risk of gastric cancer in a chinese population. *Int J Cancer*, v.88, p.601-606, 2000.

Shen, M.R.; Jones, L.M.; Mohrenweiser, H. Nonconservative amino acid substituition variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*, v.58, p.604-608, 1998.

Shimada, Y. et al. Genetic alterations in patients with esophageal cancer with short and long term survival rates after curative esophagectomy. *Ann Surg*, v.266, p.152-168, 1997.

Shimada, Y. et al. Prognostic factors of esophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer*, v. 80, p.1281-1288, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Silva, A.E. et al. Tetrasomy 15q11-q13 identified by fluorescence *in situ* hibridization in a patient with autistic disorder. *Arq Neuro-Psiquiatr,* v. 60, p. 290-294, 2002.

Smeds, J. et al. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16 (INK4a) and p14 (ARF)) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis*, v.23, p.645-655, 2002.

Smith, K.J., Williams, J., Skelton, H. Metastatic adenocarcinoma of the esophagus to the skin: new patterns of tumor recurrence and alternate treatments for palliation. *J Cutan Pathol*, v.28, p.425-431, 2001.

Smitha, T.R. et al. Polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Letters*, v.190, p.183-190, 2003.

Souto, J.V Jr.; Ribeiro, M.A.A. Saúde e vida on line/Doença de Chagas. 2003. Disponível em: http://www.nib.unicamp.br/svol/chagas.htm.

.

Soverini, S. et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autohologous transplatation. *Carcinogenesis*, v. 20, p. 2195-2207, 1999.

Stemmermann, G. et al. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppresor genes, and growth factors. *Hum Pathol*, v.25, p.968-981, 1994.

Stokstad, E. Development. New hints into the biological basis of autism. *Science,* v. 294, p. 34-37, 2001.

Sturgis, E.M. et al. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, v.20, p.2125-2129, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Sutcliffe, J.S.; Nurmi, E.I.; Lombroso, P.J. Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosome 15q11-q13 genes in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry,* v. 42, p. 253-256, 2003.

Suwa, Y. et al. Cyclin D1 protein overexpression is related to tumor differentiation, but not to tumor progression or proliferative activity, in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, v. 160, p. 897-900, 1998.

Tada, K. et al. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer*, v.88, p.268-273, 2000.

Tahara, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ*, v. 157, p. 327-349, 2004.

Takaba, K. et al. Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine or sodium L-ascorbate. *Carcinogenesis,* v.21, p.691-700, 2000.

Takano, Y. et al. Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol*, v.189, p. 194-200, 1999.

Takfhana, T. et al. Status of c-ERBB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Int J Cancer,* v.9, p.833-837, 2002.

Tam, S.W. et al. Differential expression and regulation of cyclin D1protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene*, v.9, p. 2663-2674, 1994.

Targa, A.C.; Silva, A.E. Apoptose: implicações na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol,* 2004, *submitted.*

Targa, A.C. et al. Apoptosis in different gastric lesions and association with *Helicobacter pylori,* aneuploidy and expression of p53. 2004 (artigo em preparação).

Thacker, J.; Zdzienicka, M.Z. The mammalian *XRCC* genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair,* v. 2, p. 655-672, 2003.

Thompson, L.H.; West, M.G. *XRCC1* keeps DNA from getting stranded. *Mut Res,* v.459, p.1-18, 2000.

Tokugawa, T. et al. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, v.62, p.4938-4934, 2002.

Vago, R.A. et al. kDNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*, v.149, p.2153-2159, 1996.

Varis, A. et al. Targets of gene amplification and amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res*, v. 62, p. 2625-2629, 2002.

Vayego, S.A.; De Conti, O.J.; Silva, A.E. Aspectos genéticos-moleculares dos tumores ósseos. *Rev Bras Ortopedia*, v.33, p. 847-854, 1998.

Vayego, S.A.; De Conti, O.J.; Varella-Garcia, M. Complex cytogenetic rearrangement in a case of unicameral bone cyst. *Cancer Genet Cytogenet,* v. 86, p. 46-49, 1996.

Vidgren, V. et al. Concomitant fastrin and ERBB-2 gene amplification at 17q12-q21 in the intestinal type of gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, v.24, p.24-29, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Vielba, R. et al. P53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. Laryngoscope, v. 113, p. 167-172, 2003.

Visser, A.E.; Aten, J.A. Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci*, v. 112, p. 3353-3360, 1999.

Volpi, E.V. et al. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*. v.113, p.1565-1576, 2000.

Wagner, U. et al. Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. *J Pathol,* v.188, p.44-50, 1999.

Wang, J.Y. et al. Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res*, v.21, p.207-216, 2001.

Winsey, S.L. et al. A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*, v.60, p.5612-16, 2000.

World Health Organization. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disosrders. Clinical Descriptons and diagnostic Guidelines.* Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1992.

Yasogawa, Y. et al. The 5D4 antibody (anti-cyclinD1/D2) related antigen: cytoplasmic staining is correlated to the progression of gastric cancer. *Pathol Int,* v.48, p. 717-722, 1998.

Yu, H-P. et al. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detec Prev,* 2004, *in press.*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Zirbel, R.M. et al. Evidence for nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domains boundaries. *Chromosome Res*, v.1, p. 93-106, 1993.