

JULIANA GARCIA CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
CLÍNICA DE PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER DE
PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS**

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE

MINAS GERAIS

Fevereiro de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA GARCIA CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CLÍNICA
DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-
PEQUENAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Farmacologia Bioquímica e Molecular da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção de título de Doutor

Orientador: Prof. Luiz Armando de Marco

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro de 2010

Dedico este trabalho ao meu tio Ademilson e a todas as pessoas que, como ele,
enfrentam ou enfrentaram o câncer.

“Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, irmão e família, por todo o amor, carinho, paciência e incentivo. Amo vocês, muito obrigada por tudo!

Ao Azuma, pelo amor, carinho, incentivo e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu orientador, Luiz Armando, pela oportunidade, confiança, e por fazer desses anos de convivência um constante aprendizado.

À Wolf, por me ensinar, passo a passo, todos os “segredos” do laboratório e por toda a amizade e carinho.

À Fran e Rachel, por toda a ajuda e, principalmente, pela amizade. Vocês foram essenciais durante esse período.

À Lu pela enorme ajuda, amizade e companheirismo.

Aos pacientes portadores de câncer do HJK que, apesar do sofrimento, se dispuseram a fornecer todos os dados que nos eram necessários.

À Débora e Cidinha pela ajuda no laboratório e com os pacientes, no hospital.

À equipe médica da cirurgia torácica do HJK, em especial à Alyne, pela ajuda na coleta das amostras e de dados clínicos dos pacientes.

Aos amigos de laboratório, em especial Bete, Helena, Joana, Dani, Bruno, Karen, pelo apoio.

À Maria Jimena, Eveline, Ibrahim e membros da patota, pela amizade verdadeira e por todo o apoio e incentivo.

À Deus, por me guiar em todos os caminhos da minha vida.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Classificação Histológica do Câncer de Pulmão	2
1.2. Estadiamento	4
1.3. Manifestações Clínicas	6
1.4. Fatores de Risco.....	7
1.5. Tratamento.....	15
1.6. Distribuição Populacional.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Seleção de Pacientes	19
3.2. Coleta dos Dados Clínicos.....	19
3.3. Coleta das Amostras.....	20
3.4. Análises Moleculares	21
3.5. Imunohistoquímica de Wwox.....	25
3.6. Análises Estatísticas.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Achados Clínicos.....	27
4.2. Genotipagem do gene <i>OGG1</i>.....	29
4.3. Genotipagem do gene <i>EGFR</i>	31
4.4. Análises de Ancestralidade	31
4.5. Imunohistoquímica de Wwox.....	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8. ANEXOS	51

Lista de Figuras

Figura 1: Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres no Estado de Minas Gerais e capital	2
Quadro 1 - Critério TNM para Estadiamento de Câncer de Pulmão	5
Figura 2: Formação da 8-oxoguanina pela ação de ROS.....	10
Figura 3: Esquema representativo da via de reparo BER.....	11
Figura 4: Vias de sinalização de EGFR.....	13
Figura 5: Representação esquemática do receptor EGFR, com as mutações mais frequentes encontradas no domínio TK	14
Gráfico 1: Dispersão idade x prognóstico	29
Gráfico 2: Distribuição do polimorfismo Ser326Cys nas amostras de NSCLC.....	30
Gráfico 3: Análises da ancestralidade entre casos e controles	32
Figura 6: Diferentes padrões de expressão de WWOX em células tumorais de pulmão	34

Lista de Tabelas

Tabela 1: Primers utilizados na genotipagem de <i>OGG1</i> e <i>EGFR</i>	23
Tabela 2: Porcentagem entre indivíduos do sexo masculino e feminino nas amostras estudadas	27
Tabela 3: Frequência de indivíduos tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas nas amostras estudadas.....	28
Tabela 4: Distribuição do polimorfismo Ser326Cys nas amostras de NSCLC	30
Tabela 5: Distribuição do polimorfismo entre indivíduos saudáveis.....	30
Tabela 6: Imunohistoquímica para detecção de Wwox em NSCLC.....	36

Lista de Abreviaturas

8-oxo-Gua, 8-OH-Gua.....	7,8-dihydro-8-oxoguanine
ADC	Adenocarcinoma
AP site	Sítio abásico (<i>Abasic site</i> - <i>Apurinic/apyrimidinic site</i>)
ATP	Adenosina tri-fosfato
BER	<i>Base-Excision Repair</i>
Cdc42.....	<i>Cell division control protein 42 homolog</i> envolvida na regulação do ciclo celular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate; termo genérico que define os quatro deoxiribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
EDTA	Ácido etileno di-amino tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR/Her1.....	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i> <i>Receptor</i>)
HE.....	Hematoxilina-eosina
Indels	<i>short insertion/deletion polymorphisms</i>
LREA.....	motivo Leucina-Arginina-Glutamato- Alanina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MUTYH	<i>mutY Homolog (E. coli)</i>
M	molar
mer.....	medida de subunidades; no caso de DNA, representa o número de nucleotídeos
mg.....	miligramas
ml.....	mililitros
mM	milimolar

μl.....	microlitro
μm.....	micrômetro
μM.....	micromolar
NSCLC	Câncer de Pulmão de Células Não- Pequenas (<i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>)
OGG1	8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (8- <i>oxoguanineDNA glycosylase 1</i>)
PAH.....	Hidrocarbonetos poli-aromáticos (<i>poly aromatic hidrocarbons</i>)
PBS.....	tampão salino fosfatado (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pmol.....	picomol
ROS	Espécies reativas do oxigênio (<i>Oxygen reactive species</i>)
SCLC	Câncer de Pulmão de Células Pequenas (<i>Small-Cell Lung Cancer</i>)
SDS.....	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNP.....	Polimorfismo de base única (<i>singe base polymorphism</i>)
SQC	Carcinoma Escamo-Celular (<i>Squamous- Cell Carcinoma</i>)
Taq polimerase	Enzima termoestável isolada da bactéria termofílica <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Base EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TK.....	Tirosina quinase
TKIs.....	Inibidores de tirosina quinase (<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>)
Tris-HCl.....	Hidróclorido de Tris-amino metano (<i>trisaminomethane hydrochloride</i>)
U	Unidade
UV	Ultra-violeta

Resumo

O câncer de pulmão é apontado como a principal causa de morte por câncer em todo o mundo. Dentre os fatores ambientais, o cigarro é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença. A maioria dos pacientes com câncer de pulmão fuma, e estudos relataram um risco de câncer de pulmão até 16 vezes maior em tabagistas ativos. Entretanto, nem todas as pessoas que fumam desenvolvem câncer e, por este motivo, acredita-se que possa haver uma predisposição genética para a doença. Genes relacionados ao sistema de reparo de DNA são considerados fortes candidatos, assim como os genes relacionados ao crescimento e proliferação celular e genes supressores de tumor. O presente estudo analisou 42 indivíduos diagnosticados com NSCLC e encontrou uma frequência de 40,5% do polimorfismo Ser326Cys no gene *OGG1*, associado à via BER de reparo de DNA. O domínio TK do gene *EGFR* apresenta uma alta frequência de mutações em câncer de pulmão. Nosso estudo detectou a deleção 746_750del, no exon 19, em 7,1% das amostras estudadas. Além disso, estudos de expressão da proteína Wwox indicaram uma expressão reduzida em 79% das amostras analisadas. Não foram detectadas associações significativas entre os achados moleculares e os dados clínicos dos pacientes, porém o estudo sugere uma possível relação entre a baixa expressividade de Wwox e um pior prognóstico do paciente. Estudos de ancestralidade indicaram um componente africano mais prevalente nos pacientes que em controles. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram avaliar as características moleculares e clínicas dos pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas analisados .

Abstract

Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths worldwide. Smoking is considered the most important environmental risk factor for lung cancer development. A great number of lung cancer patients smoke, and studies report a 16-fold cancer risk among smoking people. However, since not every person who smoke develops lung cancer, a genetic predisposition may also be involved. Genes related to DNA repair system are reported as strong candidate genes, as well as genes related to cell growth and proliferation and tumor suppressor genes. Our study analyzed 42 NSCLC individuals and found a 40.5% frequency of Ser326Cys polymorphism in the BER repair pathway *OGG1* gene. *EGFR* TK domain has a high frequency of mutations in lung cancer. We detected only one mutation, 746_750del, on exon 19, in 7.1% of our samples. Also, *Wwox* expression was reduced or absent in 79% of samples analyzed. There was no significant association between molecular findings and clinical features, although the study suggests a possible relationship between lower expression of *Wwox* protein and bad prognosis. Ancestry analysis showed a higher African component among patients than controls. The small number of samples does not allow us to give any definite conclusions, but the results obtained suggest the possible genetic and clinical behavioral pattern in the population studied.

1. Introdução

Câncer é definido como um crescimento desordenado de células que dividem-se rapidamente e invadem tecidos e órgãos. A Organização Mundial de Saúde aponta o câncer como a principal causa de morte em todo o mundo; em 2004, 13% dos óbitos, aproximadamente 7.4 milhões de casos, foram decorrentes de câncer. Dentre eles, o câncer de pulmão lidera a lista de mortalidade com uma estimativa de 1.3 milhões de mortes por ano e um aumento de 2% por ano em sua incidência mundial. A sobrevida média de um paciente com câncer de pulmão é de 5 anos, variando entre 13% e 21% dos casos nos países desenvolvidos e 7% e 10% nos países em desenvolvimento.

Dados da Organização Mundial de Saúde de 2005 apontam a neoplasia de pulmão como primeira causa de morte entre homens e a segunda entre mulheres, ficando atrás apenas do câncer de mama, no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata 18.715 mortes no país em 2006, e a estimativa aponta para 27.630 novos casos em 2010. O câncer de pulmão ocupa o segundo lugar no número de novos casos entre homens e o quarto lugar entre mulheres no estado de Minas Gerais (Figura 1). A preocupação em entender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer de pulmão é crescente. Neste contexto, estudos científicos que visam identificar associação de genes com o risco de câncer são de grande importância para, juntamente com fatores exógenos, como tabagismo, exposição UV, entre outros, determinar métodos mais eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Homens				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	5.350	52,95	880	73,14
Traquéia, Brônquio e Pulmão	1.460	14,47	240	20,28
Estômago	1.290	12,75	160	13,61
Cólon e Reto	1.040	10,33	220	18,68
Cavidade Oral	870	8,63	140	11,93
Esôfago	1.040	10,27	110	9,32
Leucemias	530	5,23	80	6,78
Pele Melanoma	220	2,15	40	3,14
Outras Localizações	7.520	74,44	1.200	99,45
Subtotal	19.320	191,24	3.070	254,42
Pele não Melanoma	3.520	34,81	470	38,69
Todas as Neoplasias	22.840	226,07	3.540	293,51

Mulheres				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	4.250	41,21	950	70,19
Colo do Útero	1.330	12,93	210	15,21
Cólon e Reto	1.210	11,70	300	22,27
Traquéia, Brônquio e Pulmão	850	8,26	140	10,20
Estômago	710	6,90	140	10,09
Leucemias	410	4,00	70	5,26
Cavidade Oral	310	2,93	50	3,61
Pele Melanoma	240	2,38	50	3,41
Esôfago	380	3,71	40	3,37
Outras Localizações	9.350	90,62	1.770	131,29
Subtotal	19.040	184,54	3.720	275,93
Pele não Melanoma	4.750	46,07	610	45,48
Todas as Neoplasias	23.790	230,59	4.330	321,30

Figura 1: Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres no Estado de Minas Gerais e capital (fonte: INCA)

1.1. Classificação histológica do câncer de pulmão

A Organização Mundial de Saúde classifica o câncer de pulmão em dois grandes grupos, de acordo com seu tipo histológico, padrão de comportamento e resposta a agentes terapêuticos: câncer de células pequenas (SCLC) e câncer de células não-pequenas (NSCLC).

1.1.1. Câncer de Células Pequenas (*Small-Cell Lung Cancer –SCLC*):

O carcinoma de pequenas células é caracterizado por células de forma ovalada (*oat cells*) e de tamanho reduzido. Grandes áreas de necrose são encontradas com frequência. Este tipo histológico é encontrado em aproximadamente 25% dos casos de câncer de pulmão (Collins *et al*, 2007), que é conhecido por sua alta associação com cigarro. Por ser menos frequente que os carcinomas de células não-pequenas (NSCLC), um número menor de estudos sobre SCLC é encontrado; porém este tipo histológico possui grande importância clínica. Sua natureza é extremamente agressiva, com rápido crescimento tumoral e metástases precoces. Possui boa resposta inicial a quimioterapia, porém com grande número de recorrências e a sobrevida até 2 anos ocorre em menos de 15% dos casos.

1.1.2. Câncer de Células Não-Pequenas (*Non-Small-Cell Lung Cancer – NSCLC*):

É o tipo histológico mais prevalente. Os NSCLC são classificados em diversos subtipos, porém os mais comuns são adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células.

Adenocarcinoma (ADC): o adenocarcinoma é frequentemente observado na periferia dos pulmões e em vias aéreas mais estreitas. Por este motivo, não são facilmente detectáveis, nos seus estágios iniciais, por análises citológicas, como a do escarro (Collins *et al*, 2007). A lesão precursora do adenocarcinoma é denominada hiperplasia atípica alveolar (AAH). Estas lesões possuem menos de 5 milímetros de

diâmetro e são constituídas por pneumócitos tipo II atípicos que se proliferam na parede alveolar. São reconhecidos 14 subtipos de adenocarcinomas de pulmão, mas apenas alguns tipos representam a maioria encontrada nos casos.

Carcinoma Escamo-Celular (SQC): possui localização mais central e apresenta-se como pequenos nódulos sub-pleurais de aparência bizarra. São compostos de camadas de células epiteliais com queratinização celular individual, pontes intercelulares ou formação de pérolas. Seu prognóstico assemelha-se ao do adenocarcinoma periférico; entretanto, carcinomas de células escamosas originam-se normalmente nos segmentos proximais dos brônquios. SQCs geralmente possuem crescimento lento estimando-se que a progressão do carcinoma primário até a formação de um tumor clinicamente aparente dure de três a quatro anos. Juntamente com o adenocarcinoma, é o tipo histológico mais encontrado em NSCLC (Collins *et al*, 2007).

Carcinoma de Grandes Células: este tipo de carcinoma é responsável por aproximadamente 15% de todos os casos de câncer de pulmão. É composto por células grandes e que não possuem diferenciação citoplasmática. Análises mais detalhadas e técnicas de microscopia eletrônica podem, mais apropriadamente, classificar carcinomas de grandes células indiferenciados como adenocarcinomas pouco diferenciados ou até mesmo carcinomas escamo-celulares.

1.2. Estadiamento

O câncer de pulmão é estadiado de acordo com o critério TNM (*tumor, node, metastasis*), que considera o tamanho e localização do tumor primário, acometimento de linfonodos e presença de metástases. O Comitê de Estadiamento (ISC) da

Associação Internacional de Estudos sobre o Câncer de Pulmão (IASLC) apresentou, em 2009, uma atualização da última classificação, estabelecida em 2002. O estudo feito a partir de registros clínicos de 68.463 pacientes com NSCLC e 13.032 pacientes com SCLC e mudanças nos critérios T, N e M foram propostas considerando-se diferenças na sobrevida dos pacientes (Rami-Porta *et al*, 2009). As classificações propostas dos componentes T, N e M encontram-se listadas abaixo no Quadro 1.

Quadro 1 - Critério TNM para Estadiamento de Câncer de Pulmão	
TUMOR PRIMÁRIO	
T1 - < 3cm de diâmetro	T1a - ≤ 2cm de diâmetro T1b - > 2 - ≤ 3cm de diâmetro
T2 - > 3 - ≤ 7cm de diâmetro	T2a - > 3 - ≤ 5cm de diâmetro T2b - > 5cm - ≤ 7cm de diâmetro
T3 - tumores > 7cm de diâmetro, com extensão para pleura, diafragma ou pericárdio	
T4 - Invasão de órgãos do mediastino	
ACOMETIMENTO DE LINFONODOS	
N0 - nenhum acometimento	
N1 - linfonodos hilares ou broncopulmonares ipsolaterais	
N2 - linfonodos mediastinais ipsolaterais ou subcarinais linfonodos ipsolaterais supraclaviculares	
N3 - linfonodos mediastinais hilares contralaterais ou supraclaviculares	
PRESENÇA DE METÁSTASES	
M0 - sem metástases	
M1 - presença de metástases	M1a - nódulos tumorais separados na região contralateral tumor com nódulos pleurais ou efusão pleural maligna M1b - metástases distantes
ESTADIAMENTO	TNM
IA	T1,N0,M0
IB	T2,N0,M0
IIA	T1,N1,M0
IIB	T2,N1,M0; T3,N0-N1,M0
IIIA	T1-T3,N2,M0
IIIB	qualquer T4, qualquer N3, M0
IV	qualquer M1

(Fonte: Rami-Porta et al, 2009)

1.3. Manifestações clínicas

Os sinais e sintomas apresentados pelas pessoas com câncer de pulmão podem variar dependendo do tipo histológico, localização e tamanho do tumor, e também da presença ou ausência de metástases.

Muitos pacientes são assintomáticos e a lesão é descoberta acidentalmente. A grande maioria (80%) dos pacientes sintomáticos apresentam fadiga. Perda de peso, falta de apetite, tosse persistente, dispnéia e hemoptise são também observados na maioria dos casos. Tumores com um grau maior de invasão podem causar dor ou sensação de queimação no peito (Collins *et al*, 2007). Os sintomas observados em casos de metástases variam de acordo com os órgãos que estão sendo acometidos.

Paralelamente, aproximadamente 10% dos pacientes também podem desenvolver síndromes paraneoplásicas, com sinais não associados a efeitos do tumor e de metástases (Collins *et al*, 2007). Estas síndromes possuem diversas origens (endócrina, neurológica, esquelética, hematológica, cutânea), podendo ser o sinal inicial de uma manifestação maligna, e seu diagnóstico preciso é muito importante para a identificação do tumor. Exemplos de síndromes paraneoplásicas associadas a câncer de pulmão são Síndrome de Cushing, hipercalcemia, encefalopatias, trombocitopenia, anorexia, dentre outras (Collins *et al*, 2007).

1.4. Fatores de risco

1.4.1. Exposição ambiental/ocupacional

Muitos estudos já foram feitos sobre a contribuição de fatores ambientais no desenvolvimento do câncer de pulmão. Dentre eles, se destacam o asbesto e fibras de

sílica, compostos orgânicos, metais pesados como cromo e níquel, arsênico, radiação ionizante e poluição (Alberg *et al*, 2003; Whitrow *et al*, 2003). Há relatos também sobre a influência de alimentos antioxidantes e nutrientes como retinóis, carotenóides, vitamina C e folato na prevenção do câncer de pulmão (Roswall *et al*, 2010; Roswall *et al*, 2009). Entretanto, a correlação desses fatores com o risco real de câncer é complexa pois não é possível mensurar com precisão o grau e tempo de exposição do paciente a determinado fator e, além disso, o tabagismo entre esses indivíduos torna-se um fator complicador, já que pode acentuar o risco de câncer (Alberg *et al*, 2003; Whitrow *et al*, 2003).

1.4.2. Cigarro

Há mais de um bilhão de fumantes no mundo. Estudos realizados pelo INCA em quinze capitais brasileiras e Distrito Federal mostram que, no período de 2002 e 2003, a prevalência de tabagismo variou entre 12,9% e 25,2% nas cidades estudadas. Dos 177.543 óbitos ocorridos nas capitais estudadas no ano de 2003, 83.593 estavam ligados ao cigarro (Correa *et al*, 2009).

O cigarro contém mais de trezentas substâncias químicas, quarenta das quais são consideradas potenciais agentes carcinogênicos, como a nicotina, alcatrão e hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAH), como benzo-A-pireno. Além disso, o cigarro também contém uma grande quantidade de substâncias formadoras de radicais de oxigênio, como catecol e hidroquinona, que podem desempenhar um papel no aumento do risco de câncer de pulmão (Asami *et al*, 1997).

A maioria dos cigarros produzidos industrialmente contém filtros que reduzem a inalação de alcatrão, mas permitem a entrada de partículas carcinogênicas que se

acumulam mais profundamente nos pulmões. Além disso, pessoas que fumam cigarros com baixo teor de nicotina e alcatrão tendem a fumar mais cigarros e inalar mais profundamente. Esses fatores podem explicar o aumento no número de adenocarcinomas em relação ao número de carcinomas escamo-celulares nos últimos anos (Djordjevic *et al*, 2000).

A maioria dos pacientes com câncer de pulmão (80% a 90%) fumam (Paz-Elizur *et al*, 2003), e estudos sugerem que o risco de câncer está mais atribuído à frequência que à intensidade de fumo. Peto *et al*. (Peto *et al*, 2000) relatou um risco 16 vezes maior em fumantes ativos; este risco é ainda maior nas pessoas que começaram a fumar antes dos quinze anos. Entretanto, estudos apontam para um decréscimo desse risco em pessoas que deixam de fumar; nos primeiros 5 anos o risco permanece equivalente ao de um fumante ativo, porém cai para 8 vezes em 10 anos e, gradualmente, para 2 vezes após 30 anos de abstinência (Alberg *et al*, 2003). Estudos também relatam um aumento no risco de câncer de pulmão em pessoas expostas ambientalmente ao tabaco (fumantes passivos); estes casos representam cerca de 25% dos cânceres de pulmão em pacientes não-fumantes (Gorlova *et al*, 2006; Dhala *et al*, 2006).

1.4.3. Fatores Genéticos

O fato de apenas uma parcela dos fumantes desenvolver câncer de pulmão sugere uma predisposição genética relacionada ao desencadeamento da doença. Atualmente são conhecidos mais de 230 genes ligados a câncer (Thomas *et al*, 2007) e, dentre eles, genes ligados ao reparo de DNA, à proliferação celular e genes supressores de tumor são os mais envolvidos (Thomas *et al*, 2007; Ettinger *et al*,

2006; Paz-Elizur *et al*, 2008; Saviozzi *et al*, 2009). Este estudo abordou genes representativos de cada classe (*OGG1*, envolvido no reparo de DNA; *EGFR*, envolvido no crescimento e proliferação celular e *WVOX*, gene supressor de tumor). Análises de polimorfismos genéticos são ferramentas utilizadas na elucidação do papel de determinados genes no câncer de pulmão (Paz-Elizur *et al*, 2007).

-8-oxoguanine DNA Glycosylase 1 (*OGG1*):

O metabolismo do oxigênio libera produtos (*reactive oxygen species* – ROS) que interagem de forma negativa com componentes celulares, causando danos em proteínas, lípides e ácidos nucleicos, através de ataque oxidativo direto (Paz-Elizur *et al*, 2008; Hirano, 2008; Jackson & Bartek, 2009). ROS são constantemente geradas *in vivo* através da respiração; entretanto agentes como o cigarro contém grandes quantidades de substâncias que podem causar danos oxidativos ao DNA e, dessa forma, aumentar o risco de câncer, como o de pulmão (Asami *et al*, 1997).

O contato com as ROS expõe as células a um estresse oxidativo e leva a formação de um grande número de bases oxidadas. 8-oxoguanina (7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-oxo-Gua, 8-OH-Gua) é uma lesão mutagênica formada de maneira espontânea e pela ação de fatores externos, tais como radiação ionizante, metais pesados e poluentes. ROS induzem mutações de ponto no DNA do tipo transversões GC>TA, comumente observadas em genes supressores de tumor, e acredita-se que exista uma relação entre essas lesões e câncer (Hirano, 2008) (Figura 2). Os organismos possuem mecanismos de defesa que visam manter a integridade do genoma removendo danos ao DNA, reduzindo número de mutações, erros de replicação e deleções (Hirano, 2008). A via de reparo que remove 8-oxoguanina com

maior eficiência do DNA é a BER (*Base-Excision Repair*), que possui habilidade de reparar bases com pequenas alterações, principalmente as causadas por dano oxidativo (Hirano, 2008). A via BER é iniciada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (OGG1), que reconhece a base modificada e remove a 8-oxo-Gua através da clivagem da ligação glicosídica que liga a base nitrogenada à desoxirribose, deixando na estrutura do DNA um sítio abásico que é posteriormente corrigido com a ação da AP endonuclease 1, seguida pela atividade da DNA polimerase β e DNA ligases I ou III (Paz-Elizur *et al*, 2008) (Figura 3).

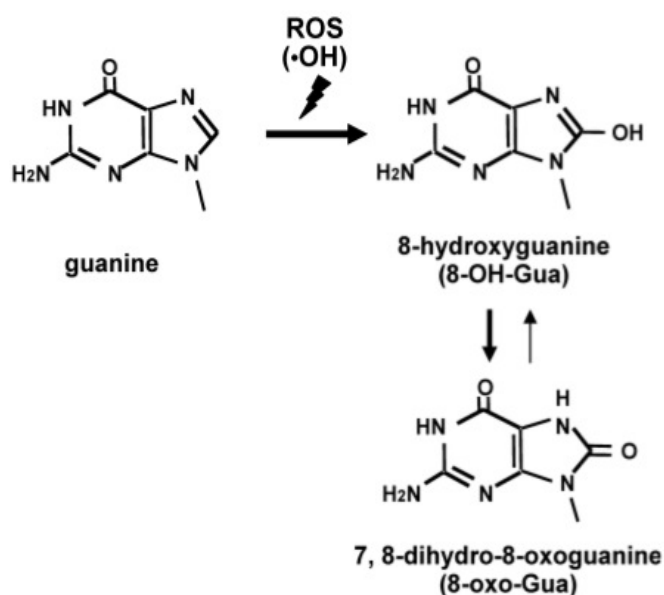


Figura 2: Formação da 8-oxoguanina pela ação de ROS. 8-oxo-Gua é formada pela hidroxilação da guanina na posição C-8. Fonte: Kasai *et al*, 1984 in Hirano, 2008

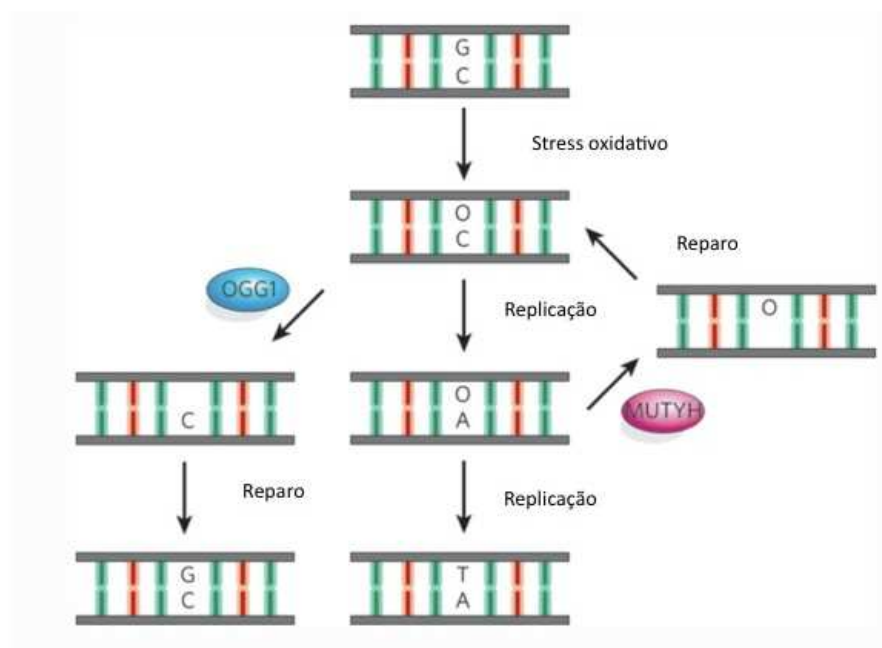


Figura 3: Esquema representativo da via de reparo BER. A presença de 8-oxoG (O) no DNA causa uma transição G/T, como mostra a via principal. OGG1 remove a 8-oxoG, deixando um sítio abásico no DNA, posteriormente reparado pela polimerase β . MUTYH também é uma DNA glicosilase da via BER, e remove a adenina do par 8-oxoGA. Fonte: David *et al.*, 2007

A 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 é codificada pelo gene *OGG1*, que possui oito exons e produz dois transcritos principais através de *splicing* alternativo. A primeira isoforma da proteína, α -OGG1 (OGG1 tipo a) é transcrita dos exons 1 a 7, possui 345 aminoácidos e localiza-se no núcleo. A isoforma β -OGG1 (OGG1 tipo b) é transcrita dos exons 1 a 6 e exon 8, possui 424 aminoácidos e é encontrada exclusivamente nas mitocôndrias. O exon 7 codifica o sinal de localização nuclear, perto da região C-terminal, enquanto o exon 8 codifica o sinal mitocondrial (Hirano, 2008).

Acredita-se que a deficiência nos sistemas de reparo possa levar a um acúmulo de mutações, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer. Estudos registraram uma menor atividade de OGG1 em pacientes com câncer de pulmão (Paz-Elizur *et al*, 2003; Paz-Elizur *et al*, 2007). Paz-Elizur *et al.* (Paz-Elizur *et al*, 2003) encontraram

uma diminuição significativa no reparo por OGG1 em pacientes (5,8 U/μg de proteína) em relação a indivíduos saudáveis (7,1 U/μg de proteína).

Pesquisas prévias revelaram a presença de diversos polimorfismos no gene *OGG1* (Jackson & Bartek, 2009; Anderson & Daggett, 2009). O SNP encontrado no exon 7 (C1245G, rs1052133), entretanto, é o mais estudado em associações com desenvolvimento do câncer de pulmão (Jackson & Bartek, 2009). Esse polimorfismo leva a uma troca do aminoácido Serina por uma Cisteína no códon 326 da proteína (Ser326Cys), e há relatos de que a variante OGG1-326Cys está relacionada a uma inabilidade de reparo e maior acúmulo de mutações produzidas pela 8-oxoguanina (Yamane *et al*, 2004; Bravard *et al*, 2009). Por este motivo, inúmeros trabalhos buscam estabelecer associações entre câncer de pulmão na presença da variante 326Cys em comparação à variante 326Ser (Jackson & Bartek, 2009; Yamane *et al*, 2004; Bravard *et al*, 2009; Kohno *et al*, 2006). Associações entre alterações em genes de reparo podem ser importantes para estimar uma predisposição genética em indivíduos ao câncer de pulmão e, no caso do OGG1, orientar as pessoas quanto a um possível aumento do risco na presença de fatores ambientais, como o cigarro.

-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR):

O receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor* – EGFR/Her1) é um receptor de membrana de tirosina quinase (TK), membro da família ErbB, que é composta por quatro membros (EGFR/Her1, ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4). É constituído por um domínio de ligação extracelular conectado a um domínio transmembrana acoplado a um domínio

intracelular de tirosina quinase e favorece a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, angiogênese e migração (Murray *et al*, 2006; Irmer *et al*, 2007). O receptor de crescimento EGF pode se homodimerizar ou formar heterodímeros com os outros membros da família, alterando a estrutura dos receptores, conferindo, assim, uma diversidade nas respostas celulares estimuladas por EGF (Irmer *et al*, 2007; Ahmed *et al*, 2006). A ligação EGF-receptor leva à internalização deste complexo, induzindo a atividade da tirosina quinase, o estímulo ao crescimento e proliferação celular. Uma grande variedade de cascatas de sinalização são estimuladas através da atividade de EGFR, incluindo as vias de PI3 quinase-Akt-mTOR, PI3K-Rac-Rho-Cdc42, JAK-STAT e Ras-Raf-MAP quinase (Ahmed *et al*, 2006) (Figura 4).

O aumento na expressão de EGFR é vantajosa para tumores pois desencadeia maior crescimento, proliferação e sobrevivência celular, e à angiogênese, acarretando invasões e metástases (Irmer *et al*, 2007).

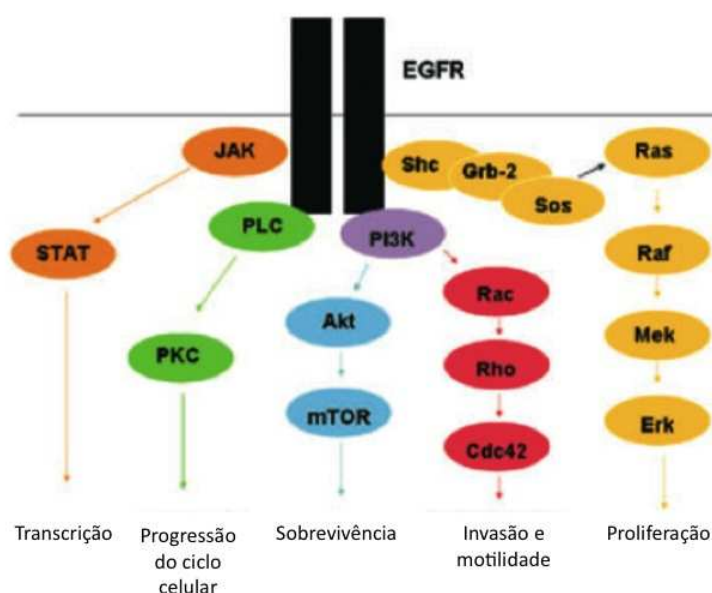


Figura 4: Vias de sinalização de EGFR. Ativadas, levam a uma ativação na transcrição, progressão do ciclo celular, sobrevivência, proliferação e motilidade nas células. Fonte: Ahmed *et al.*, 2006

O gene *EGFR* está mapeado no cromossomo 7. É composto por vinte e oito exons, sendo que os exons 18-24 codificam o receptor de tirosina quinase em EGFR. O fato de grande parte das mutações em *EGFR* estar localizada nos exons 18-21 (Irmer *et al*, 2007; Riely *et al*, 2006) torna o domínio TK o principal alvo de estudos que visam a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento e prognóstico do câncer de pulmão, bem como o desenvolvimento de terapias específicas e mais eficazes que auxiliem o tratamento da doença. Uma grande variedade de alterações já foi descrita. Deleções no exon 19 (746_750del) que afetam o domínio leucina-arginina-glutamato-alanina (LREA) representam aproximadamente 48% das mutações; mutações de ponto, como a troca de leucina para arginina no codon 858 (L858R) no exon 21, representam cerca de 38% dos casos; inserções-deleções no exon 20 aparecem em uma proporção de 6% (Irmer *et al*, 2007) (Figura 5).

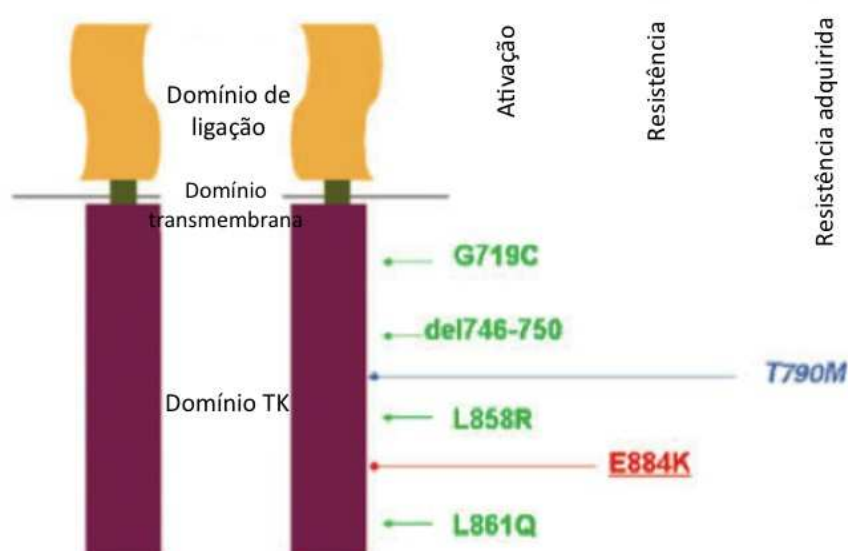


Figura 5: Representação esquemática do receptor EGFR, com as mutações mais frequentes encontradas no domínio TK. Fonte: Ahmed *et al.*, 2006

]

-WW Domain Containing Oxidoreductase (WWOX):

Os cromossomos de todos os indivíduos possuem regiões denominadas sítios de fragilidade, que correspondem a regiões cromossômicas mais susceptíveis a quebras, rearranjos e deleções (Richards *et al*, 2001). O gene *WWOX* inclui uma grande área de FRA16D, o segundo sitio de fragilidade mais comum do genoma (Bednarek *et al*, 2000). Estudos anteriores demonstraram que a expressão do gene *WWOX* está reduzida em diversas neoplasias (Guler *et al*, 2004; Pimenta *et al*, 2006). Apesar da importância das alterações em *WWOX* em câncer, ainda há poucos estudos a respeito da função e mecanismos de ação deste gene. Entretanto, sua participação no câncer de pulmão já foi descrita por alguns estudos. Yendamuri *et al* (Yendamuri *et al*, 2003) detectaram transcritos de *WWOX* com deleção de exons e expressão diminuída da proteína em linhagens celulares de câncer de pulmão. Outro estudo confirmou *WWOX* como um gene supressor de tumor, pois se mostrou eficaz na prevenção do crescimento do câncer de pulmão em modelos xenográficos (Fabbri *et al*, 2005). Por este motivo, torna-se interessante avaliar a expressão de *WWOX* em casos de neoplasia de pulmão.

1.5. Tratamento

O tratamento do câncer de pulmão varia de acordo com o tipo histológico, estadiamento e as características clínicas do paciente. A cirurgia de ressecção é o tratamento de escolha em pacientes com NSCLC e estadiamento I até IIIA. Quimioterapia e radioterapia são indicados nos casos não-ressectáveis e, em alguns casos, a quimioterapia é administrada na fase pré-cirúrgica ou utilizada como um

adjuvante pós-cirúrgico (Collins *et al*, 2007). Carcinoma de células pequenas são, em geral, inoperáveis, e o tratamento se dá pela administração de quimioterápicos (Collins *et al*, 2007).

Atualmente as pesquisas clínicas estão voltadas para terapias específicas, personalizadas e mais eficazes no tratamento do câncer. Agentes terapêuticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de direcionar o tratamento para cada tipo de câncer e aumentar sua eficácia. O domínio TK de EGFR tem sido o principal alvo de fármacos pelo grande número de alterações encontradas nos exons 18-21. Inibidores de tirosina quinase (TKIs) têm sido utilizados como adjuvantes nos tratamentos convencionais de câncer de pulmão (Ahmed *et al*, 2006; Cascone *et al*, 2006). TKIs competem com ATP na ligação ao domínio intracelular impedindo a fosforilação da tirosina e, conseqüentemente, a ativação da via. Os principais inibidores utilizados são Erlotinib (Tarceva®, OSI-774; Genentech, South San Francisco, CA, USA) e Gefitinib (Iressa®, ZD1839; Astra Zeneca, Macclesfield, United Kingdom); ambos possuem administração oral, são reversíveis e seletivos para o tipo de alteração (Cascone *et al*, 2006). Cada mutação está relacionada a um diferente comportamento da doença e a diferentes respostas a fármacos (Irmer *et al*, 2007; Ahmed *et al*, 2006). Mutações nos exons 18 (G719A/C), 21 (L858R e L861Q) e deleções no exon 19 no domínio LREA (del746-750) conferem uma maior susceptibilidade à resposta para Gefitinib e Erlotinib; a inserção D770_N771insNPG, no exon 20, confere resistência aos fármacos. As mutações D761Y, no exon 19, e T790M, no exon 20, também estão associadas à resistência e são adquiridas pelo indivíduo durante o tratamento (Riely *et al*, 2006; Matsuo *et al*, 2007; Bell *et al*, 2005).

1.6. Distribuição populacional

Aproximadamente 40% a 80% dos casos de NSCLC apresentam um aumento na expressão de EGFR. A maioria das mutações em *EGFR* são encontradas em adenocarcinomas e em indivíduos do sexo feminino. Não existem relatos de associações com tabagismo (Murray *et al*, 2006; Ahmed *et al*, 2006); além disso, a população Asiática possui uma maior prevalência de mutações (20-40%) que a Caucasiana (<10%) (Irmer *et al*, 2007). A variante OGG1-326Cys também é encontrada em maior frequência entre asiáticos (aproximadamente 42%). Caucasianos apresentam uma ocorrência do polimorfismo de 21% e populações mistas, 38% (Li *et al*, 2008). As diferentes frequências genótípicas podem levar a diferentes comportamentos de polimorfismos e mutações. Por este motivo, vários estudos buscam identificar associações entre as variáveis genéticas e câncer de pulmão dentro de cada população. A população brasileira é considerada mista (Pena *et al*, 2009) e faltam mais estudos avaliando a frequência de polimorfismos e mutações em *OGG1* e *EGFR* e sua associação com câncer de pulmão.

A incidência de câncer de pulmão vem aumentando gradativamente nos últimos anos em todo o mundo. Por esse motivo, mais estudos e pesquisas são necessários para proporcionar uma estimativa de predisposição, métodos de diagnóstico precoce mais eficazes e tratamentos cada vez mais específicos, baseados nas características moleculares, sociais e individuais de cada pessoa.

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo caracterizar pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de células não pequenas quanto às suas características clínicas (sexo, idade, tipo histológico e etnia), estimar a frequência da variante OGG1-326Cys, mutações no gene *EGFR* e expressão de WWOX nesses indivíduos, determinar o componente ancestral de cada indivíduo através de análise de indels (*short insertion/deletion polymorphisms*) e estabelecer uma relação entre os achados moleculares, as características clínicas e diferenças no prognóstico da doença.

3. Materiais e Métodos

3.1. Seleção de pacientes:

Todos os indivíduos que participaram do estudo eram pacientes do setor de Cirurgia Torácica do Hospital Júlia Kubitscheck (Minas Gerais, Brasil). Foram selecionados cinquenta pacientes que receberam o diagnóstico inicial de NSCLC primário, elegíveis para a cirurgia e que não apresentaram histórico prévio de quimioterapia ou radioterapia.

Trinta indivíduos hígidos foram selecionados como controles para que se pudesse comparar as frequências do polimorfismo Ser326Cys entre pacientes com e sem câncer de pulmão. Foram colhidas amostras de sangue e o DNA extraído foi genotipado juntamente com o DNA dos casos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC 473/05).

3.2. Coleta dos dados clínicos:

Os pacientes assinaram um termo de consentimento (Anexo 1) esclarecendo todos os detalhes do estudo. Foi realizada uma entrevista na qual foram coletados aspectos como idade e histórico de tabagismo. As informações sobre o tipo histológico e estadiamento foram obtidas através da análise dos prontuários. A evolução clínica foi acompanhada, durante todo o período de estudo, através dos

retornos dos pacientes agendados pelo hospital e, em caso de óbito, análise da ficha médica.

Os dados clínicos foram classificados da seguinte forma:

- Histórico de tabagismo: foram considerados tabagistas os indivíduos que relataram o uso contínuo do cigarro até o momento do diagnóstico da doença; os ex-tabagistas englobaram os pacientes que relataram o uso de cigarro em algum período de sua vida, porém cessaram o uso antes do momento do diagnóstico; pacientes que não relataram uso de cigarro foram considerados não-tabagistas. A porcentagem anos/maço foi calculada para discriminar os tabagistas pesados (mais de 25 anos/maço).

- Tipo Histológico e Estadiamento: as amostras foram classificadas de acordo com o resultado do exame anátomo-patológico.

- Prognóstico: a classificação “bom prognóstico” foi dada aos pacientes que apresentaram boas condições clínicas após a cirurgia e nos retornos agendados pelo hospital, sem presença de sintomas ou metástases. A classificação “prognóstico ruim” foi dada aos pacientes que apresentaram manifestações clínicas da doença nos retornos, presença de metástases e/ou óbito até um ano e meio após a cirurgia, com *causa mortis* relacionada à doença.

3.3. Coleta das amostras:

Cinquenta amostras de tecido de pulmão foram coletadas no momento da cirurgia, após prévio consentimento formal dos pacientes, e armazenadas em um tubo eppendorf a -80°C, até o momento da extração do DNA. As coletas foram realizadas no período de julho/2006 a julho/2009.

3.4. Análises Moleculares

3.4.1. Extração de DNA:

O DNA proveniente das amostras de tecido foi extraído de acordo com o protocolo descrito a seguir: as amostras foram maceradas e colocadas em um tubo de 1,5µl, juntamente a 200µl de Tampão de Lise (Tris HCl 50mM, pH 8,0; EDTA 10mM; pH 8,0; SDS 0,5%; q.s.p 200µl H₂O) e Proteinase K 20mg/ml. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 1 hora. Após esse período, mais 200µl de Tampão de Lise foi adicionado, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por mais 15 minutos e, depois, centrifugadas por 20 minutos a 11.000 x g. O sobrenadante foi coletado e, adicionados a ele, 2 volumes de etanol 100% e 10% do volume do sobrenadante de Acetato de Sódio 3M, pH 8,2. As amostras foram agitadas gentilmente até que a massa de DNA pudesse ser visualizada. O pellet foi, então, lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em 200µl de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7,0-8,0) e armazenados a 4°C.

O DNA proveniente das amostras de sangue foi extraído de acordo com o seguinte protocolo: as amostras foram colocadas em um tubo Falcon de 50ml juntamente com 1 volume de TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 2mM) e Triton X-100 (>20ml de sangue = 0,5ml de Triton X-100; 20ml de sangue = 0,4ml Triton X-100; <15ml de sangue = 0,3ml Triton X-100. As amostras foram, então, centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos. O *pellet* foi mantido e lavado com o mesmo volume de TKM1. As amostras foram misturadas e centrifugadas a 16000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi, mais uma vez,

dispensado e o *pellet*, ressuspensionado em TKM2 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4M; EDTA 2mM). O volume de TKM2 também depende do volume inicial de sangue (>20ml de sangue = 4ml de TKM2; 15ml de sangue = 2,4ml TKM2; 10ml de sangue = 1,6ml TKM2). SDS 10% foi adicionado (>20ml sangue = 250µl SDS; 15ml sangue = 150µl SDS; 10ml sangue = 100µl SDS), e as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 55°C por 10 a 20 minutos. Após o período de incubação, NaCl 6M foi adicionado (>20ml sangue = 1,5ml NaCl; <15ml sangue = 0,9ml NaCl) e os tubos foram centrifugados a 15500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo Falcon novo, contendo 4ml de Etanol 100%, e misturado gentilmente até a visualização da massa de DNA. O DNA foi lavado em Etanol 70% e, depois de seco, ressuspensionado em 500µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0), incubado a 55°C por 2 dias e armazenado a 4°C.

3.4.2. Amplificação e sequenciamento das amostras:

Um conjunto de *primers* que cobre os 7 exons do gene *OGG1* e os exons 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* foi desenhado utilizando o programa Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). As sequências de bases dos primers estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados na genotipagem de *OGG1* e *EGFR*

	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>OGG1</i>		
exon 1	5'CCTCGGATTGGCTACCTCTA3'	5'CGTGCTTGTTTCCTCTTTTG3'
exon 2	5'TTTGTAGAGGTGAGGTTTCG3'	5'TTTGGGTCTGTTTGTTC3'
exon 3	5'AATGAGAGGTCTGGTGTTCG3'	5'TTCTGGATAGGGGAAGTGTT3'
exon 4	5'AACTTGAAGATGCCTGATGC3'	5'CTCATTTCTGCTCTCCTCT3'
exon 5	5'CCAGAGTGAAGGAGAAAGCA3'	5'TGTGACCCATCAACAGAAGT3'
exon 6	5'GGTCACAGAAGGGGTCAGAT3'	5'GTGTAGGAGGGTGGAGTC3'
exon 7	5'CAGACTCCACCCTCCTACAG3'	5'CTTCCCTACCACTCCTCACT3'
<i>EGFR</i>		
exon18	5'GGCGTACATTTGTCCTCCC3'	5'TGCCTTTGGTCTGTGAA3'
exon19	5'CCCAGCAATATCAGCCTTA3'	5'GCCTCCATTTCTTCATCCAA3'
exon20	5'CTCTCCCCTGTCATCTGTCA3'	5'TATCTCCCCTCCCCGTATCT3'
exon21	5'TTCAAGCCCAGGTCTCAACT3'	5'CAGCTGTGACCTTTCCCAAT3'

O DNA foi quantificado e as reações de PCR foram realizadas com 125ng/μl de DNA adicionado a 2,5μl de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris HCl 10mM, pH 8,4; Triton X-100 0,1%; MgCl₂ 1,5mM); 2,5μl de dNTPs 0,2mM; 0,5μl de cada par de *primers* a uma concentração de 10pmol/μl e 0,25μl de Taq polimerase 0,625U. Os produtos foram amplificados em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* e o programa consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, e, depois, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55-60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados com o uso do kit de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo as instruções contidas no manual. A visualização das bandas foi feita em um gel de Poliacrilamida 6,5%, preparado com 1,079ml de Acrilamida 30%; 0,65ml de TBE 10X (30,25g de Tris Base; 25,4g de Ácido Bórico; 3,7g EDTA; q.s.p. 500ml ddH₂O). O protocolo de coloração envolveu

uma etapa de fixação em Ácido Acético Glacial 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos; etapa de impregnação em uma solução contendo 5ml de Nitrato de Prata (10,5g AgNO₃, q.s.p 100ml H₂O), 75µl de Formaldeído 100%, q.s.p 50ml de água destilada; lavagem em água destilada por 15 segundos e a etapa de revelação em uma solução contendo 50ml de Carbonato de Sódio (3g de NaCO₃, q.s.p 100ml H₂O), 75µl de Formaldeído 100% e 20µl de Tiosulfato de Sódio 10mg/ml.

3.4.3. Análise de Fragmentos

Foi feita análise de fragmentos para o exon 19, com o objetivo de detectar possíveis inserções/deleções através da observação do padrão dos picos. Uma cauda do nucleotídeo M13-40 17-mer foi adicionada ao primer forward (EGFR19M13 5'GTTTTCCCAGTCACGACcccagcaatcagcctta3'). A reação de PCR foi feita em um volume final de 10µl, contendo: Buffer 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,3 ou pH 9,2; KCl 75mM; MgCl₂ 3,5mM); 200µl dNTPs, 1,0 U Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen); 20ng de DNA genômico; 1,5µM do primer M13-*forward* marcado com FAM dye; 1,5µM do primer *reverse* não marcado e 0,1µM do primer *forward* não marcado. Dois microlitros de cada produto de PCR foram desnaturados em solução de formamida com Gene Scan 500 LYS Size Standard (Applied Biosystems) a 95°C por 5 minutos, e sujeitos à análise de fragmentos em um ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados usando o *software* GeneMapper Version 4.0 (Applied Biosystems). As amostras com padrões de picos alterados foram sequenciadas para a detecção das alterações.

As reações de sequenciamento foram feitas com o uso do BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit, seguindo as instruções do fabricante. As sequências foram obtidas em um sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Applied Biosystems) e analisadas utilizando o programa Sequencher v.4.9.

3.4.4. Análises de Ancestralidade:

Todas as amostras foram submetidas a uma análise de ancestralidade genômica biogeográfica. Cada amostra foi tipada de modo independente através de 40 indels bialélicos, já descritos anteriormente (Bastos-Rodrigues *et al*, 2006). Os amplicons foram obtidos em *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Applied Biosystems) e analisados usando o *software* GeneMapper Version 4.0 (Applied Biosystems).

3.5. Imunohistoquímica de WWOX:

Fragmentos dos tecidos coletados durante a cirurgia foram acondicionados em solução de RNAlater® e armazenados a -80°C. Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados e corados por Hematoxilia-Eosina (HE), para a visualização das áreas de tumor. Foram realizados corte de 5µm do tecido incluído em parafina. Os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados em água, após banho em álcool. Foi realizado o bloqueio da peroxidase em peróxido de hidrogênio a 1%, durante 15 minutos. Após este período, foram enxaguados em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada utilizando solução tampão de EDTA (pH 8.0),

em panela de vapor a 94°C por 30 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (diluição 1:100) por 30 minutos. Após enxágue com PBS, os cortes foram cobertos com o reagente amplificador de sinal (DAKO EnVision Visualization System) durante 30 minutos, novamente enxaguados em PBS e incubados em solução cromógeno-substrato (DAB-DAKO EnVision Visualization System) por 7 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, contra-corados com hematoxilina e montados com DPX.

A imuno-marcação foi avaliada utilizando-se microscopia de luz (aumento de 400x). A reatividade de Wwox foi feita qualitativamente e cada amostra foi classificada de acordo com a intensidade da marcação.

3.6. Análises Estatísticas

Os dados coletados foram submetidos a análises uni- e multivariadas, com o auxílio do *software SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Science)*, com o intuito de elaborar o tratamento estatístico para responder as questões levantadas pela pesquisa.

O programa Structure v. 2.1 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>) foi utilizado para calcular o algoritmo de *cluster* populacional, no qual os indivíduos são agrupados (probabilisticamente) com base em seus genótipos. As análises entre os componentes ancestrais de pacientes x controles foi feita com o auxílio do *software GraphPad Prism 5*.

4. Resultados

4.1. Características clínicas:

Cinquenta amostras de tecido de pulmão foram coletadas no Centro de Cirurgia Torácica do Hospital Júlia Kubitscheck, Minas Gerais, Brasil. Após o resultado do exame anatomo-patológico, três pacientes tiveram o diagnóstico inicial de câncer descartado e foram, portanto, excluídos das análises. Outras cinco amostras também foram excluídas: em duas não foi possível a obtenção de quantidade suficiente de DNA, provavelmente pelo grande número de regiões de necrose. Ainda, não foi possível coletar todos os dados clínicos de três outros pacientes, pois eles não compareceram aos retornos e não foi possível contactar a família. Dessa forma, o número total de amostras analisadas foi quarenta e duas. Dentre elas, 66,7% pertenciam ao sexo masculino e 33,3%, ao sexo feminino (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem entre indivíduos do sexo masculino e feminino nas amostras estudadas

	Frequência	Porcentagem
Homens	28	66,70%
Mulheres	14	33,30%
Total	42	100,00%

Tabela 2: Porcentagem entre indivíduos do sexo masculino e feminino nas amostras estudadas

Os pacientes tinham uma média de 59,40 anos, com idades variando entre 34 e 77 anos; 47,6% foram classificados como tabagistas, 23,8% como ex-tabagistas e 23,8% como não tabagistas (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência de indivíduos tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas nas amostras estudadas

	Frequência	Porcentagem
Tabagistas	22	52,40%
Não-tabagistas	10	23,80%
Ex-tabagistas	10	23,80%
Total	42	100,00%

Tabela 3: Frequência de indivíduos tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas nas amostras estudadas.

Os controles tinham uma média de idade de 71,8 anos e eram formados por 51,7% e indivíduos do sexo masculino e 48,3%, do sexo feminino. 41,4% foram classificados como tabagistas e 58,6%, como não tabagistas.

45,2% dos pacientes receberam o diagnóstico de carcinoma escamo-celular, sendo 95% dos casos tabagistas. 26,2% foram diagnosticados com adenocarcinoma; destes, 63,3% eram tabagistas. 28,5% foram diagnosticados com outros tipos histológicos. O estadiamento foi calculado para cada paciente. Quanto ao estadiamento, 45,2% foram enquadrados no estadiamento IB, 23,8% no estadiamento IIB, 14,3% no estadiamento IIIA, 9,5% no estadiamento IIIB e 2,4% no estadiamento IV. Dois indivíduos não possuíam registro de estadiamento em seus prontuários e foram classificados como não-referentes (NR).

A evolução clínica dos pacientes foi acompanhada pela equipe de cirurgia torácica do hospital. Dentre as amostras analisadas, 59,5% apresentaram um prognóstico ruim, com quadro de recorrência e metástases, e óbito constatado até um ano e meio após a cirurgia, enquanto 33,3% apresentaram um prognóstico bom, com boas condições clínicas no último retorno e ausência de metástases. Três pacientes faleceram por causas não relacionadas à doença e foram classificados como não-referentes.

A análise de regressão logística feita entre idade e prognóstico encontrou uma relação linear entre a idade e a probabilidade de prognóstico ruim, levando-se em conta um valor de significância de 10% ($p < 0,1$). Dessa forma, conclui-se que existe linearidade da *odds* para a variável contínua idade (Gráfico 1).

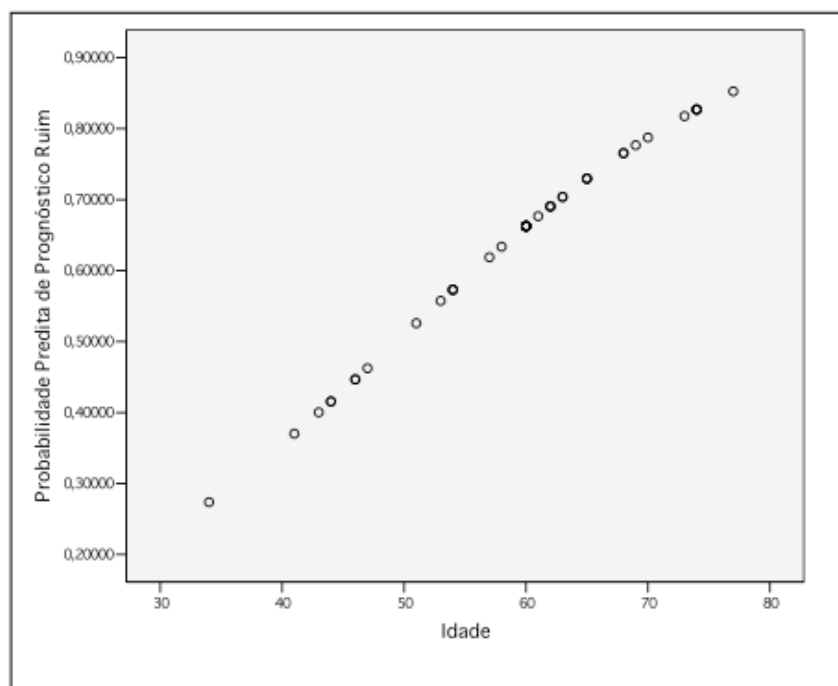


Gráfico 1: Dispersão idade x prognóstico. Assumindo um valor de $p < 0,1$ há uma relação significativa entre o aumento na idade e uma piora da evolução clínica

4.2. Genotipagem do gene *OGG1*:

O polimorfismo Ser326Cys é codificado pelo exon 7, mas todos os exons foram sequenciados para visualização de possíveis mutações em outras regiões do gene. Dezesete pacientes apresentaram a variante OGG1-326Cys (40,5%), dos quais 35,7% eram heterozigotos e 4,8% eram homozigotos. Vinte e cinco apresentaram apenas a variante Ser326 (59,5%) (Tabela 4 e Gráfico 2). Entre os controles, 69%

apresentaram apenas a variante OGG1-Ser326, enquanto 31% apresentaram a variante Cys326 (6,9% homozigotos e 24,1% heterozigotos) (Tabela 5).

Tabela 4: Distribuição do polimorfismo Ser326Cys nas amostras de NSCLC

Genótipo	Frequência	Porcentagem
OGG1-Ser326	25	59,50%
OGG1-Cys326	2	4,80%
Heterozigotos	15	35,70%
Total	42	100,00%

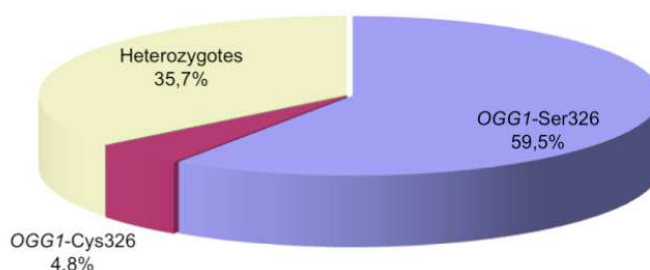


Tabela 4 e Gráfico 2: Distribuição do polimorfismo Ser326Cys nas amostras de NSCLC. A proporção de indivíduos carregando a variante 326Cys foi 40,5%.

Tabela 5: Distribuição do polimorfismo entre indivíduos sadios

Genótipo	Frequência	Porcentagem
OGG1-Ser326	21	69,00%
OGG1-Cys326	2	6,90%
Heterozigotos	7	24,10%
Total	30	100,00%

Tabela 5: Distribuição do polimorfismo entre indivíduos sadios

Uma observação interessante foi a presença de um polimorfismo intrônico, IVS4-15C>G (rs2072668), segregando juntamente ao SNP rs1052133, responsável pela variação Ser326Cys, em todas as amostras, tanto em casos quanto controles.

Não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo Ser326Cys com o câncer de pulmão. A interação deste polimorfismo com o tabagismo, levando a um pior prognóstico também não se mostrou significativa.

4.3. Genotipagem do gene *EGFR*:

A deleção nos codons 746-750 é uma mutação encontrada com bastante frequência em câncer de pulmão e, por este motivo, foi dada mais ênfase nas análises do exon 19. Os resultados da análise de fragmentos indicaram a mutação 746_750del em três pacientes (7,1%). Não foram detectadas outras alterações neste exon. Os exons 18 e 21 não apresentaram alterações nas amostras analisadas. O polimorfismo G2538A (rs1050171) foi encontrado no exon 20 em 73% das amostras sequenciadas. Este SNP está presente no codon 787, porém não leva à mudança de aminoácidos (Q787Q). Não foram encontradas alterações nos exons 18 e 21 nas amostras analisadas.

Não foram encontradas associações significativas entre os polimorfismos e mutações com histórico de tabagismo e prognóstico.

4.4. Análise de Ancestralidade:

O componente ancestral de cada indivíduo foi calculado através da tipagem por indels e análise dos resultados no programa GeneMapper v.4.0 e Structure v.2.1. Cinqüenta amostras provenientes do HGPD-CEPH (*Human Genome Diversity Cell Line Panel* - <http://www.ceph.fr/HGPD-CEPH-panel/>; Cann *et al*, 2002), representativas da região sudeste do Brasil, foram selecionadas como controles, para

que pudesse ser feita uma comparação com a ancestralidade dos pacientes (Cann *et al*, 2002). A proporção dos componentes Europeu, Africano e Ameríndio nos pacientes foi, respectivamente, 0.8419 ± 0.02575 (mean $\pm$ SE), 0.1153 ± 0.02117 e 0.04273 ± 0.01053 . A proporção, no grupo controle foi, na mesma ordem, 0.9162 ± 0.01811 , 0.04508 ± 0.009953 e 0.03866 ± 0.01013 . Foi encontrada diferença estatística entre os casos e controles, nos componentes europeu ($p = 0,0426$; $p < 0,05$) e africano ($p = 0,0026$) (Gráfico 3). As análises entre os polimorfismos e os componentes ancestrais não detectaram associação significativa entre as variáveis.

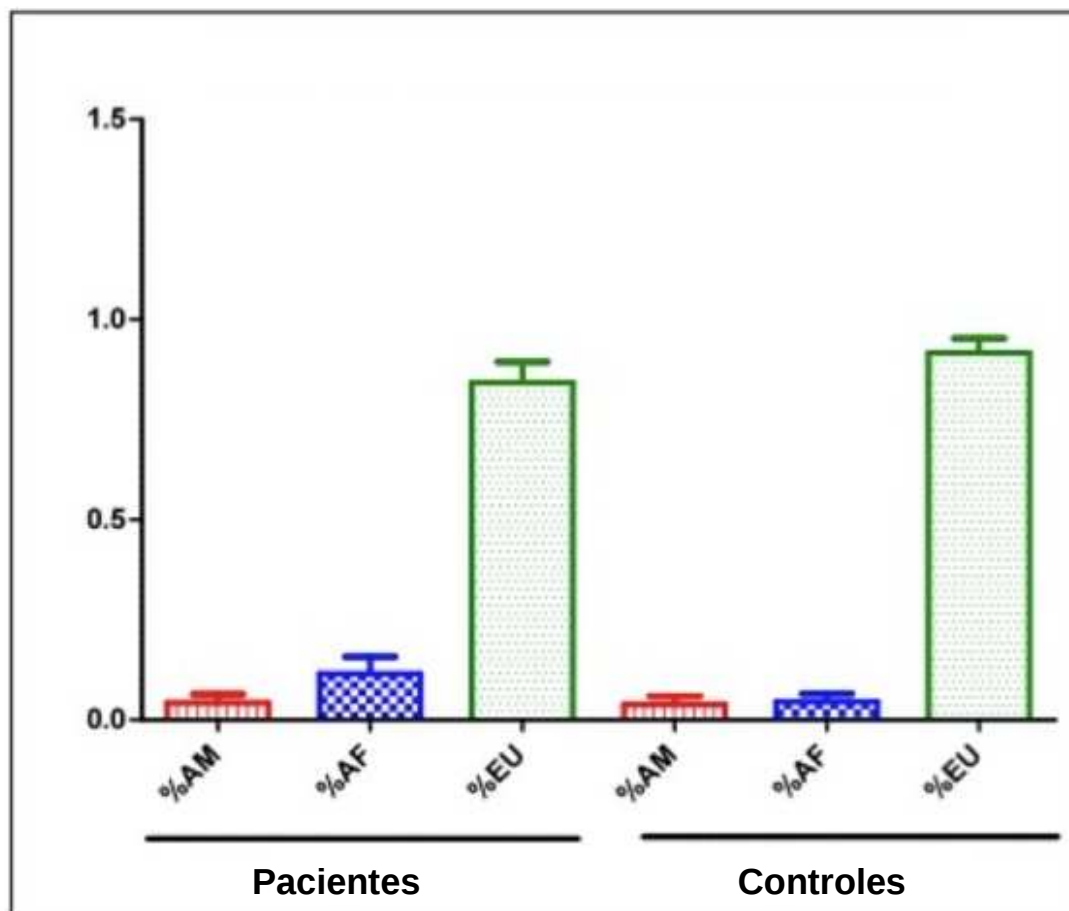


Gráfico 3: Análises da ancestralidade entre casos e controles. Foi verificada um maior componente Africano nas amostras de NSCLC que nos controles representativos da população do sudeste brasileiro ($p = 0,0026$; $p < 0,05$)

4.5. Imunohistoquímica de WWOX

A expressão da proteína Wwox foi investigada em 20 amostras. Não foi possível a análise de todos os fragmentos, pois alguns tecidos não se encontravam em um bom estado de conservação, mesmo acondicionados em RNAlater, e os cortes não foram satisfatórios.

O Wwox é uma proteína citoplasmática e a avaliação do resultado das reações imunohistoquímicas se baseou na intensidade da marcação. Das 19 amostras analisadas, 11 (58%) apresentaram pouca ou nenhuma expressão (0 a 25%). Em 4 amostras (21%) a expressão variou entre 25% a 50%; 2 amostras (10,5%) obtiveram uma expressão de 50% a 75% e em 2 amostras a expressão variou de 75% a 100% (Tabela 6 e Figura 6). Das amostras com pouca ou nenhuma expressão, 55% eram adenocarcinomas e 27%, carcinoma escamo-celulares. Dentre as amostras que variaram entre nenhuma e 50% de expressão, 84,6% apresentaram um prognóstico ruim da doença.

Tabela 6 - Imunohistoquímica para detecção de WWOX em NSCLC

Proteína WWOX	No. amostras
0 - 25%	11 (58%)
25% -50%	4 (21%)
50% - 75%	2 (10.5%)
75% - 100%	2 (10.5%)
Total	19 (100%)

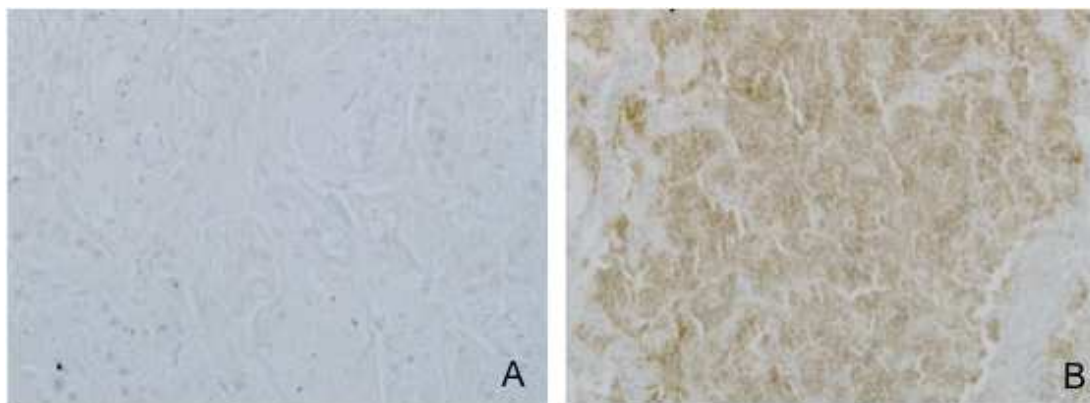


Figura 6 – Diferentes padrões de expressão de WWOX em células tumorais de pulmão. A: Adenocarcinoma bronquíolo-alveolar, sem expressão de WWOX. B: Carcinoma escamo-celular, alta expressão de WWOX

5. Discussão

O Hospital Júlia Kubitscheck é ligado à rede SUS de atendimento e atende a população classe média a baixa de várias regiões do Estado de Minas Gerais. O Centro de Cirurgia Torácica é considerado uma referência no estado, e recebe vários casos de câncer de pulmão todos os meses. O número de pacientes elegíveis para a cirurgia, no entanto, é muito pequeno, se comparado ao número de casos que o hospital recebe. Isso ocorre porque a maioria dos pacientes, por não possuírem o hábito de fazer exames de check-up regulares, muitas vezes dão entrada no hospital com um quadro avançado e inoperável de câncer, ou são diagnosticados com câncer de pequenas células que, na maioria das vezes, não possui indicação cirúrgica. O hospital realizou, durante o período de estudo, uma média de cem cirurgias de câncer de pulmão de células não pequenas. Destas, cinquenta foram coletadas para análise, mas o número de casos confirmados e aptos para o estudo foi quarenta e dois.

O estudo apresentou fatores complicadores. Algumas amostras não foram coletadas por problemas na comunicação com a equipe cirúrgica do hospital, ou não puderam ser utilizadas por terem sido armazenadas de maneira inadequada dentro do bloco. As cirurgias são feitas a partir de uma hipótese diagnóstica, através de análise de exames prévios, e o resultado anátomo-patológico é confirmado após a operação. Por este motivo, três pacientes tiveram o diagnóstico de câncer de pulmão descartado e foram excluídos do estudo. Após a extração das amostras, a qualidade do DNA de duas peças não foi satisfatória. A extração foi repetida várias vezes, sem sucesso. Provavelmente a quantidade de tecido necrosado na peça impossibilitou a recuperação de uma quantidade suficiente de DNA. A evolução dos pacientes foi monitorada pela pesquisa nos prontuários médicos e pela avaliação de cada um nos retornos

agendados. Os pacientes que não retornavam ao hospital eram contactados para obtenção de informações sobre seu estado de saúde. Três pacientes não puderam ser contactados e tiveram que ser excluídos das análises. Dessa forma, o número de amostras analisadas ficou abaixo do que era esperado (n=100) no início do projeto; em contrapartida, os casos foram selecionados rigorosamente e representam o perfil fidedigno dos pacientes portadores de NSCLC operáveis do Hospital Júlia Kubitscheck. Portanto, torna-se interessante caracterizar tanto o comportamento genotípico quanto os hábitos de vida destes indivíduos, principalmente por não haver estudos suficientes sobre esse assunto nesta população.

A porcentagem de pacientes do sexo masculino foi maior que a do sexo feminino nas amostras estudadas. Isso condiz com os dados do Instituto Nacional do Câncer, que aponta uma taxa maior de casos de câncer de pulmão em homens (14,47 casos em 100.000) que em mulheres (8,26 casos em 100.000) no estado de Minas Gerais.

O tabagismo foi observado em 71,4% dos casos, sendo 47,3% classificados como tabagistas ativos e 23,8%, como ex-tabagistas. Vários estudos apontam o tabagismo como o principal fator de risco ambiental para o aumento no número de danos oxidativos no DNA e desenvolvimento do câncer de pulmão (Asami *et al*, 1997; Paz-Elizur *et al*, 2003; Matsuo *et al*, 2007; Cornfield *et al*, 2009). Estudos apontam a frequência do uso do cigarro como um fator de risco maior que a quantidade de maços fumados durante a vida (Peto *et al*, 2000). A alta taxa de pacientes com histórico de tabagismo pode justificar a grande frequência de carcinoma escamo-celulares, mais associados ao cigarro (Kohno *et al*, 2006) que outros tipos de câncer. Adenocarcinomas não possuem forte associação com cigarro (Kohno *et al*, 2006), mas a frequência deste tipo histológico encontrada neste estudo

em pacientes fumantes pode ser justificada pelo fato de, atualmente, cigarros comerciais serem fabricados com filtros que permitem apenas a passagem de pequenas partículas que são inaladas mais profundamente e se acumulam em vias aéreas mais estreitas, contribuindo para o desenvolvimento de adenocarcinomas (Djordjevic *et al*, 2000).

A idade apresentou-se como uma variável associada ao prognóstico neste estudo. Os pacientes de idade avançada apresentaram uma pior evolução clínica que pacientes mais jovens. A idade avançada constitui, por si só, um fator de risco no desenvolvimento do câncer, e doenças associadas ao envelhecimento e uma menor resistência imunológica podem contribuir para um pior prognóstico em pacientes idosos com câncer.

As análises de WWOX demonstraram que, das 19 amostras analisadas, 79% possuíam uma expressão ausente ou reduzida (0 a 50%) da proteína. Estes resultados são similares aos obtidos por Donati *et al* (Donati *et al*, 2007), que encontrou uma expressão de WWOX reduzida em 80,5% dos pacientes. Entretanto, seu estudo encontrou uma redução mais expressiva em carcinoma escamo-celulares, enquanto que, em nosso estudo, 55% das amostras com pouca ou nenhuma expressão eram adenocarcinomas. Os carcinomas escamo-celulares compreenderam apenas 27% das amostras com expressão diminuída. Dentre as amostras que variaram entre nenhuma e 50% de expressão, 84,6% apresentaram um prognóstico ruim da doença. A alta frequência de alterações em WWOX e sua relação com um prognóstico ruim em nossas amostras sugerem que este gene possui um importante papel no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão.

A genotipagem dos exons 18-21 de *EGFR* foi feita apenas nos pacientes com câncer de pulmão. O objetivo deste estudo foi relacionar características clínicas com o

comportamento de *EGFR* entre os indivíduos com NSCLC. Além disso, o DNA dos controles foi extraído a partir de sangue periférico, e, diferentemente de *OGG1*, mutações em *EGFR* podem ser adquiridas e encontradas apenas no tecido afetado. Estudos anteriores que avaliaram os achados clínicos em pacientes com NSCLC com mutações em *EGFR* também não utilizaram controles em suas análises (Murray *et al*, 2006; Yoshida *et al*, 2009).

O estudo detectou uma frequência de 7,1% da deleção dos codons 756-750 (756_750del), no exon 19, nos indivíduos com NSCLC. A deleção encontrada no exon 19 codifica o motivo LREA (leucina-arginina-glutamato-alanina) no domínio TK de EGFR. Esta mutação está associada a uma melhor resposta nos tratamentos com inibidores TK, como Erlotinib e Gefitinib (Irmer *et al*, 2007; Riely *et al*, 2006; Han *et al*, 2006). Dessa forma, pode-se inferir que o tratamento com estes fármacos seria vantajoso para os pacientes que possuíam a mutação. Não foram observadas outras mutações nos exons que codificam o domínio tirosina quinase do receptor. Estes resultados contrariam estudos prévios, que identificaram uma alta frequência de mutações em *EGFR* em NSCLC (Irmer *et al*, 2007; Riely *et al*, 2006; Matsuo *et al*, 2007), mesmo naqueles em que foi analisado um pequeno número de amostras (Murray *et al*, 2006; Han *et al*, 2006; Kondo *et al*, 2005). Os indivíduos que possuíam a deleção não possuíam histórico de tabagismo, o que condiz com outros estudos prévios que relatam uma maior frequência de mutações em *EGFR* em pacientes não fumantes (Murray *et al*, 2006; Kondo *et al*, 2005). O aumento na expressão de EGFR é encontrado em 40% a 80% dos casos de câncer de pulmão (Ettinger, 2006; Kondo *et al*, 2005). Mutações em *EGFR* são mais associadas ao sexo feminino e ocorrem com maior frequência em adenocarcinomas (Murray *et al*, 2006; Ahmed *et al*, 2006; Matsuo *et al*, 2007; Kondo *et al*, 2005), o que pode explicar o pequeno número de

alterações encontradas em nosso estudo, já que a grande maioria dos casos pertenceu ao sexo masculino e o carcinoma escamo-celular foi o tipo histológico mais prevalente. Foi observada uma alta frequência (73%) do SNP rs1050171 (Q787Q), no exon 20, entre os pacientes. Trata-se de um SNP sinônimo, e não há estudos correlacionando esse polimorfismo a câncer de pulmão.

Não foi identificada uma associação significativa entre a mutação e as variáveis sexo, tabagismo, tipo histológico e prognóstico. Murray *et al* (Murray *et al*, 2006) realizaram um estudo similar, no qual observaram mutações em *EGFR* em 15% das 60 amostras analisadas e também não encontraram correlações significativas entre as alterações e os achados clínicos. Assim como foi discutido no trabalho de Murray, o pequeno número de amostras em nosso estudo não nos permitiu uma afirmação precisa, mas os resultados obtidos sugerem o padrão de comportamento do gene *EGFR* na população estudada. Além disso, o presente trabalho é importante por representar um ponto de partida em estudos de associação de *EGFR* e características clínicas nesta população.

Foi encontrada uma frequência de 40,5% da variante *OGG1*-326Cys nas amostras estudadas, enquanto os controles apresentaram uma frequência de 31% desta mesma variante. O polimorfismo intrônico IVS4-15C>G (rs2072668) segregou juntamente ao SNP rs1052133, responsável pela variação Ser326Cys, em todas as amostras, tanto em casos quanto controles. Este padrão de segregação não havia sido descrito em estudos anteriores, e não há relatos associando este polimorfismo intrônico à alterações na função de *OGG1* e ao risco de câncer de pulmão.

Análises entre casos e controles não detectaram uma associação significativa entre polimorfismo e câncer de pulmão. Não houve também, nos casos, associação entre a variante e o tabagismo influenciando uma piora do prognóstico. No entanto, da

mesma forma como foi discutido anteriormente, o número de amostras analisadas apenas sugere esta relação do gene *OGG1* com os achados clínicos dos indivíduos estudados.

Estudos prévios sobre *OGG1* associam a habilidade de reparo reduzida da proteína com um aumento no risco de câncer de pulmão (Paz-Elizur *et al*, 2003; Yamane *et al*, 2004). Vários estudos passaram, então, a discutir a influência do polimorfismo Ser326Cys no desenvolvimento do câncer de pulmão. Yamane *et al*. (Yamane *et al*, 2004) realizaram um ensaio experimental em células humanas de pulmão H1299 e verificaram uma menor supressão de mutações induzidas por 8OHG em células *OGG1*-Cys326 que em células *OGG1*-Ser326, concluindo que a variante Cys326 constitui um fator de risco para o câncer de pulmão. Outros estudos sobre a atividade de *OGG1* na presença das duas variantes concluíram que a diminuição do reparo é um fator de risco para o desenvolvimento da doença (Yamane *et al*, 2004; Bravard *et al*, 2009). Paz-Elizur *et al*. (Paz-Elizur *et al*, 2003) também sugerem que o uso do cigarro por indivíduos que possuem a variante 326Cys aumentaria o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Kohno *et al*. (Kohno *et al*, 2006) encontraram uma associação entre o polimorfismo Ser326Cys e a ocorrência de adenocarcinoma de pulmão na população japonesa. Zienolddiny *et al* (Zienolddiny *et al*, 2006) genotiparam 40 SNPs em genes relacionados às vias de reparo e encontraram uma forte associação do SNP Ser326Cys e NSCLC. Vários outros estudos associam a variante Cys326 a uma menor habilidade de reparo de *OGG1* e, consequentemente, a um aumento no risco de câncer de pulmão (De Ruyck *et al*, 2007; Sugimura *et al*, 1999; Hung *et al*, 2008).

Outros estudos, entretanto, descartam a associação do polimorfismo em *OGG1* com o câncer de pulmão. Vogel *et al*. (Vogel *et al*, 2004) observaram a ocorrência do

polimorfismo em pacientes com câncer de pulmão em um estudo populacional realizado na Dinamarca e não detectaram associação significativa entre o polimorfismo em *OGG1*, bem como em outros genes relacionados ao reparo do DNA. Hung *et al.* (Hung *et al*, 2005) avaliaram a frequência de polimorfismos em genes do sistema BER em indivíduos caucasianos com câncer de pulmão e concluíram que não há uma associação entre as variáveis, apesar de não descartarem a possibilidade do polimorfismo Ser326Cys possuir um pequeno papel no desenvolvimento da doença. Li *et al.* (Li *et al*, 2008), através de um estudo retrospectivo de outros trabalhos, chamam a atenção para o fato de que a etnia da população deve ser levada em consideração nos estudos de associação. Esta afirmativa pode explicar os inúmeros resultados controversos a respeito da influência do polimorfismo em *OGG1* como fator de risco para o câncer de pulmão, como os obtidos por Hung e colaboradores (Hung *et al*, 2008), que encontraram associação entre o SNP Ser326Cys e NSCLC em populações caucasianas, mas não em asiáticos. A frequência do polimorfismo em asiáticos (~42%) é maior que em Caucasianos (~21%) (Bravard *et al*, 2009; Kohno *et al*, 2006) e, por isso, a influência deste polimorfismo pode diferir entre as duas populações. A frequência do SNP encontrada em nosso estudo (40,5% em casos e 31% nos controles) assemelha-se à frequência encontrada em populações mistas (~38%) (Chang *et al*, 2009). As populações mistas, como a brasileira, possuem uma análise ainda mais complexa, pois são formadas por diversas etnias. Estudos de ancestralidade realizados no Brasil (Pena *et al*, 2009) identificaram uma grande contribuição européia, porém cada indivíduo possui sua própria proporção de ancestralidades Caucasiana, Ameríndia e Africana. Dessa forma, a população brasileira deve ser analisada individualmente, e não como grupo.

Não existem muitos estudos relatando a frequência do polimorfismo em *OGG1*, bem como as mutações em *EGFR* em populações mistas. A população brasileira possui uma grande contribuição caucasiana (Pena *et al*, 2009), mas nosso estudo encontrou um maior componente africano entre os pacientes que os controles de ancestralidade. Esse resultado pode explicar a baixa frequência de mutações em *EGFR*, mais comuns em populações asiáticas e menos frequentes entre caucasianos (Irmer *et al*, 2007). Além disso, os dados obtidos podem sugerir uma baixa frequência de mutações em *EGFR* e uma maior frequência do polimorfismo *OGG1*-Ser326Cys, associadas ao componente africano, para a qual também não existem estudos, apenas alguns realizados em populações afro-americanas (Chang *et al*, 2009; Leidner *et al*, 2009). Por este motivo, mais estudos nessa área tornam-se necessários.

6. Conclusão

O presente estudo identificou a presença do polimorfismo *OGG1* Ser326Cys em 40,5% dos pacientes e em 31% dos controles. Além disso, o polimorfismo rs2072668 segregou junto com a variante 326Cys em casos e controles. A mutação 746_750del em *EGFR* foi encontrada em 7,1% dos pacientes. Foi observada uma alta frequência do SNP rs1050171 entre os pacientes, mas não há relatos de uma associação deste polimorfismo com câncer de pulmão. Não foram detectadas outras mutações no domínio TK de EGFR. A expressão de *Wwox* está reduzida em 79% das amostras analisadas. Os estudos de ancestralidade revelaram um maior componente africano nos casos que nos controles representativos da população brasileira. Não foram identificadas associações entre as variáveis estudadas e o componente ancestral com o câncer de pulmão e prognóstico, porém o número pequeno de amostras pode justificar a falta de associação significativa. Assim, não é possível considerar os resultados obtidos como representantes fidedignos da população brasileira, mas as amostras estudadas representam a parcela da população mineira atendida pelo hospital onde foram coletadas. Dessa forma, este estudo permitiu traçar o perfil dos pacientes portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas do Hospital Júlia Kubitscheck.

7. Referências Bibliográficas

Ahmed, S.M. and R. Salgia, *Epidermal growth factor receptor mutations and susceptibility to targeted therapy in lung cancer*. *Respirology*, 2006. **11**(6): p. 687-92.

Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer*. *Chest*, 2003. **123**(1 Suppl): p. 21S-49S.

Anderson, P.C. and V. Daggett, *The R46Q, R131Q and R154H polymorphs of human DNA glycosylase/beta-lyase hOgg1 severely distort the active site and DNA recognition site but do not cause unfolding*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(27): p. 9506-15.

Asami, S., et al., *Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(9): p. 1763-6.

Bastos-Rodrigues, L., J.R. Pimenta, and S.D. Pena, *The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms*. *Ann Hum Genet*, 2006. **70**(Pt 5): p. 658-65.

Bednarek, A.K., et al., *WFOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(8): p. 2140-5.

Bell, D.W., et al., *Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR*. *Nat Genet*, 2005. **37**(12): p. 1315-6.

Bravard, A., et al., *Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity*. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3642-9.

Cann, H.M., et al., *A human genome diversity cell line panel*. Science, 2002. **296**(5566): p. 261-2.

Cascone, T., M.P. Morelli, and F. Ciardiello, *Small molecule epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 2**: p. ii46-48.

Chang, J.S., et al., *Base excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African-Americans*. Carcinogenesis, 2009. **30**(1): p. 78-87.

Collins, L.G., et al., *Lung cancer: diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2007. **75**(1): p. 56-63.

Cornfield, J., et al., *Smoking and lung cancer: recent evidence and a discussion of some questions*. 1959. Int J Epidemiol, 2009. **38**(5): p. 1175-91.

Correa, P.C., S.M. Barreto, and V.M. Passos, *Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study*. BMC Public Health, 2009. **9**: p. 206.

David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 941-50.

De Ruyck, K., et al., *Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk*. Mutat Res, 2007. **631**(2): p. 101-10.

Dhala, A., K. Pinsker, and D.J. Prezant, *Respiratory health consequences of environmental tobacco smoke*. Clin Occup Environ Med, 2006. **5**(1): p. 139-56, x.

- Djordjevic, M.V., S.D. Stellman, and E. Zang, *Doses of nicotine and lung carcinogens delivered to cigarette smokers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(2): p.106-11
- Donati, V., et al., *WWOX expression in different histologic types and subtypes of non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 884-91.
- Ettinger, D.S., *Clinical implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors: focus on non-small cell lung cancer*. Oncologist, 2006. **11**(4): p. 358-73.
- Fabbri, M., et al., *WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15611-6.
- Gorlova, O.Y., et al., *Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors*. Int J Cancer, 2006. **118**(7): p. 1798-804.
- Guler, G., et al., *The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma*. Cancer, 2004. **100**(8): p. 1605-14.
- Han, S.W., et al., *Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2538-44.
- Hirano, T., *Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis*. J Radiat Res (Tokyo), 2008. **49**(4): p. 329-40.
- Hung, R.J., et al., *International Lung Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(11): p. 3081-9.

Hung, R.J., et al., *Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(8): p. 567-76.

Irmer, D., J.O. Funk, and A. Blaukat, *EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy*. Oncogene, 2007. **26**(39): p. 5693-701.

Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.

Kasai, H. and S. Nishimura, *Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(4): p. 2137-45.

Kohno, T., et al., *Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 724-8.

Kondo, M., et al., *Mutations of epidermal growth factor receptor of non-small cell lung cancer were associated with sensitivity to gefitinib in recurrence after surgery*. Lung Cancer, 2005. **50**(3): p. 385-91.

Leidner, R.S., et al., *Genetic abnormalities of the EGFR pathway in African American Patients with non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5620-6.

Li, H., et al., *The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(7): p. 1739-45.

Matsuo, K., et al., *Risk factors differ for non-small-cell lung cancers with and without EGFR mutation: assessment of smoking and sex by a case-control study in Japanese*. Cancer Sci, 2007. **98**(1): p. 96-101.

Murray, S., et al., *Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients*. Lung Cancer, 2006. **52**(2): p. 225-33.

Paz-Elizur, T., et al., *Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(1): p. 45-60.

Paz-Elizur, T., et al., *DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(17): p. 1312-9.

Paz-Elizur, T., et al., *DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention*. Cancer Lett, 2008. **266**(1): p. 60-72.

Pena, S.D., et al., *DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians*. Braz J Med Biol Res, 2009. **42**(10): p. 870-6.

Peto, R., et al., *Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies*. BMJ, 2000. **321**(7257): p. 323-9.

Pimenta, F.J., et al., *Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas*. Int J Cancer, 2006. **118**(5):p.1154-8.

Rami-Porta, R., J.J. Crowley, and P. Goldstraw, *The revised TNM staging system for lung cancer*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **15**(1): p. 4-9.

Richards, R.I., *Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences*. Trends Genet, 2001. **17**(6): p. 339-45.

Riely, G.J., et al., *Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7232-41.

Roswall, N., et al., *Source-specific effects of micronutrients in lung cancer prevention*. Lung Cancer, 2009.

Roswall, N., *Folate and lung cancer risk*. Lung Cancer, 2010.

Saviozzi, S., et al., *Non-small cell lung cancer exhibits transcript overexpression of genes associated with homologous recombination and DNA replication pathways*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3390-6.

Sugimura, H., et al., *hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1999. **8**(8): p. 669-74.

Thomas, R.K., et al., *High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 347-51.

Vogel, U., et al., *No association between base excision repair gene polymorphisms and risk of lung cancer*. Biochem Genet, 2004. **42**(11-12): p. 453-60.

Whitrow, M.J., et al., *Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature*. Respirology, 2003. **8**(4): p. 513-21.

Yamane, A., et al., *Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1689-94.

Yendamuri, S., et al., *WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(4): p. 878-81.

Yoshida, K., et al., *Clinical outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients screened for epidermal growth factor receptor gene mutations*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009.

Zienolddiny, S., et al., *Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2006. 27(3): p. 560-7.

8. Anexos

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Título do Estudo: *Farmacogenética e Farmacogenômica de Doenças Pulmonares (CID10-C34)*

2. Pesquisador Principal: Juliana Garcia Carneiro, bióloga, mestre em Genética, doutoranda em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 3409-9135.

3. Objetivos do estudo: Avaliar a existência de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de doenças pulmonares para indicar uma terapêutica mais específica e adequada a cada paciente, minimizando os efeitos colaterais dos fármacos e possibilitando uma possível melhora na qualidade de vida e sobrevida.

4. Procedimentos: O paciente será solicitado a coletar sangue periférico para análise de DNA. Serão feitas também coletas de amostra tecidual caso sejam necessários procedimentos de broncoscopia e/ou cirurgia a “céu aberto”, indicados previamente para propedêutica e/ou terapêutica da doença, pelos médicos assistentes. As coletas serão gratuitas. Os dados do paciente serão mantidos em sigilo.

5. Possíveis riscos e desconfortos associados ao estudo: Os riscos são inerentes aos procedimentos de broncoscopia e/ou cirúrgicos aos quais o paciente está sujeito em função das indicações clínicas. Em relação à coleta de sangue periférico, podem ocorrer dolorimentos, hematomas, e/ou sangramentos no local onde será feita a punção. Estes sintomas são passageiros e não comprometem a saúde do paciente.

6. Benefícios em participar do estudo: As informações obtidas por meio deste estudo serão importantes para auxiliar no tratamento específico e na melhoria da qualidade de vida e sobrevida do paciente portador de doença pulmonar.

7. Direito de Recusa: A participação neste estudo é completamente voluntária. O paciente tem todo o direito de se recusar a fazer parte deste estudo. Isto não acarretará qualquer prejuízo em seu atendimento médico.

8. Declaração de Consentimento:

Eu, após compreender estas informações sobre os exames que serão realizados, concordo em participar deste estudo.

Nome do participante ou representante legal (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Assinatura do pesquisador

Data

Anexo 2

Ser326Cys polymorphism in OGG1 and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer Brazilian patients

**J.G. Carneiro^{a,*}, F.A. Bianchi-Leidenz^a, R. Melilo-Carolino^a, M.A.C. Bicalho^{a,b},
A. Vilhena^b, N. Amaral^b, L. Bastos-Rodrigues^a, L.A DeMarco^a**

^a *Department of Molecular and Biochemical Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil*

^b *Center of Thoracic Surgery, Hospital Júlia Kubitscheck, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author. Tel.: +55 31 3409-9134.

E-mail address: jgarciacarneiro@yahoo.com.br

Contact address: Avenida Professor Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 30130-100

Summary Base excision repair (BER) is the primary mechanism for repairing small base lesions in DNA resulting from oxidation and alkylation damage, associated to lung cancer development. The genetic polymorphism Ser326Cys on OGG1 protein has been considered for several research groups as one important candidate factor for lung cancer risk, since it has been related to a reduced DNA repair ability, however there are not many studies about this polymorphism in Brazilian population. We sequenced all 7 exons of OGG1 gene from 42 Brazilian NSCLC patients and 30 controls. Ser326Cys polymorphism was found in 40.5% on patients and 31% on controls. The intronic polymorphism IVS4-15C>G (rs2072668) was found segregating with SNP rs1052133 (Ser326Cys) in cases and controls. In ancestry analysis, case samples had a higher African component than control group (0.1153 ± 0.02117 and 0.04508 ± 0.009953 , respectively; $p = 0.0026$; $p < 0.05$). We found no significant association between the genetic polymorphism and clinicopathological data. Although further studies are needed, with a larger number of samples, with our findings it was possible to characterize the clinical and molecular aspects of NSCLC Brazilian patients.

KEYWORDS: Non-small cell lung cancer, BER pathway, OGG1-Ser326Cys polymorphism, Ethnicity

1.Introduction

Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths worldwide. Its high incidence and poor prognosis makes it a concerning health problem [1, 2]. In Brazil, according to INCA (National Institute of Cancer) more than 27,000 new cases were reported in 2008. One of the most exogenous cancer-causing factors are tobacco products. 80% to 90% of lung cancer patients smoke. Association between smoking and lung cancer has been established for several groups all over the world [3-5]. Retrospective studies on men and women show association between cigarette smoking and lung cancer. Smoking is associated with formation of oxidative lesions that generate point mutations on DNA [1, 6, 7].

Each cell of the human body is constantly attacked by endogenous and exogenous factors that cause a large number of mutations. Reactive oxygen species (ROS) are byproducts of oxygen metabolism that, by direct oxidative attack to cellular components like proteins, lipids and nucleic acids, cause cellular damage [6, 8, 9]. 8-oxoguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine; 8-oxo-Gua) is a mutagenic lesion formed spontaneously on DNA or due to exogenous factors like ionizing radiation, chemical pollutants, heavy metals, food and bacteria. It induces a GC-to-TA transversion point mutations and it is believed to play a key role on cancer development [8, 10].

Unrepaired oxidative damage can induce point mutations to DNA, related to several diseases [6, 8, 10]. According to Mellon and Hanawalt [11], damages to DNA are responsible for 80% to 90% of all cancers [8]. Therefore, human body counts on defense mechanisms to prevent damage to DNA. Repair systems have the

ability to remove DNA lesions and, therefore, reduce mutation frequency of cancer-related genes [6, 8, 10]. Base excision repair (BER) is the primary mechanism for repairing small base lesions in DNA resulting from oxidation and alkylation damage [12, 13]. 8-oxo-Gua is removed from DNA through the short-patch BER pathway, initiated by 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) [8, 10]. *OGG1* gene has 7 exons and encodes OGG1, a 345 amino acids protein with DNA glycosylase and AP lyase activities that removes 8-oxo-Gua from double-stranded DNA [2].

Studies have investigated whether reduced DNA repair is a contribution factor for cancer formation and prognosis. It has been previously shown that low OGG1 activity is associated with lung cancer and tobacco smoke can increase the risk of development of the disease [1]. A non-synonymous genetic polymorphism (rs1052133) leads a change at codon 326 (Ser326Cys) on OGG1 protein, and has been considered for several research groups as one important candidate factor for lung cancer risk, since it has been related to a reduced DNA repair ability. Previous studies indicated that OGG1-326Cys variant exhibits a 2- to- 6 fold lower ability to excise 8-oxo-Gua from DNA [2, 8, 12]. Moreover, homozygotes for the OGG1- 326Cys allele have a lower DNA repair capacity compared to heterozygotes and OGG1-Ser326 allele [2].

Frequency of OGG1-Cys326 allele varies among populations, ranging from 20% to 40% in Caucasians to 40% to 60% in Asians [2, 12]. Brazilian population is formed by a combination of different ethnicities [14] and there are no studies correlating the polymorphism to ethnical composition in this country.

In the present study we established the profile of a group of NCSLC Brazilian patients by observing the frequency of OGG1-Ser326Cys polymorphism and its correlation to clinical aspects such as smoking status, histological type and disease

prognosis. Ancestry component was calculated for each individual to determine the distribution of the OGG1-326Cys allele through ethnicities.

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

Fifty patients from the Thoracic Section of Hospital Júlia Kubitscheck, Brazil, diagnosed with primary NSCLC, were selected for the study. They were eligible for surgery and had no previous history of chemotherapy or radiotherapy treatment. After patients signed the consent form, samples were collected at time of surgery and stored at -80°C. Collects were performed during July/2006 to July/2009.

In the control group, thirty healthy individuals were selected so we could compare Ser326Cys polymorphism frequency among people with and without lung cancer. Blood samples were collected and DNA analyses were performed together with patients DNA. Cases and controls were matched for age, sex and smoking status. The project had the approval of the Ethical Research Committee of UFMG (ETIC 473/05).

Information about histological type and smoking status were obtained from patients interview and medical files analyses. Patients' follow-up was done through clinical exams at each scheduled appointment or through medical files, in case of death.

Patients who reported tobacco use until time of diagnostic were classified as smokers; former smokers comprised those who reported tobacco use but cessation happened before time of diagnostic; patient who never reported any tobacco use during their lives were classified as non-smokers.

Patients who presented good clinical conditions after surgery and during appointments, with no symptoms or metastasis were considered as having a good prognosis; those who presented symptoms, metastasis and/or died within one year and a half after surgery from disease complications were classified on the bad prognosis group.

2.2. Genotyping

DNA from tissue samples was extracted according to a proteinase K-based protocol. Briefly, samples were macerated and placed on a 1,5µl tube with a 200ul solution of lysis buffer (50mM Tris HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0; 0,5% SDS, QSP H₂O) and proteinase K (20mg/ml). Tubes were kept on water bath at 65°C for an hour. After, another volume of lysis buffer was added and samples were left at room temperature for 15 more minutes. Later, tubes were centrifuged at 11,000 x g for 20 minutes. Supernatant was kept and added to it 2 volumes of ethanol 100% and 10% of supernatant volume of cold NaAC 3M, pH 8,2. Samples were gentle mixed until DNA mass could be visualized. The pellet was washed with ethanol 70% and eluted in 200ul of TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 7,0-8,0).

DNA from blood samples was extracted using the following protocol: blood samples were placed on a 50ml Falcon tube and 1 volume of TKM1 (10 mM Tris-HCL pH 7.6, 10 mM KCL, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA) and Triton-100 (>20ml of blood= 0.5ml of Triton-100; 20ml of blood = 0.4ml of Triton-100; <15ml of blood = 0.3ml of Triton-100) was added to it. Samples were then centrifuged at 2500 x g for 15 minutes. The pellet was kept and washed with the same volume of TKM1. Samples were mixed and centrifuged at 1600 x g for 10 minutes. Supernatant was

once again dismissed and pellet was resuspended in TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.4M NaCl, 2 mM EDTA). Volume of TKM2 also depends on blood initial volume (>20ml of blood = 4ml of TKM2; 15ml of blood = 2.4ml of TKM2; 10ml of blood = 1.6ml of TKM2). 10% SDS was added (>20ml of blood = 250ul of SDS; 15ml of blood = 150ul of SDS; 10ml of blood = 100ul of SDS), samples were mixed and incubated on water bath at 55°C for 10 to 20 minutes. After incubation, 6M NaCl was added (>20ml of blood = 1.5ml of NaCl; <15ml of blood = 0.9ml of NaCl) and tubes were centrifuged at 15500 x g for 15 minutes. The supernatant was then transferred to a new Falcon tube containing 4ml of 100% Ethanol and mixed gently, until DNA mass could be visualized. DNA mass was washed on 70% Ethanol and left on a clean tube until dries. DNA was resuspended on 500ul of TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), incubated at 55°C for 2 days and stored at 4°C.

A set of primers covering the 7 exons of OGG1 was designed using Primer3 program. Base sequences of all primers are: *OGG1.1* 5'CCTCGGATTGGCTACCTCTA3', 5'CGTGCTTGTTCCTCTTTTG3'; *OGG1.2* 5'TTTGTAGAGGTGAGGTTTCG3', 5'TTTGGGTCTGTTTGTTC3'; *OGG1.3* 5'AATGAGAGGTCTGGTGTTGC3', 5'TTCTGGATAGGGGAAGTGTT3'; *OGG1.4* 5'AACTTGAAGATGCCTGATGC3', 5'CTCATTTTCCTGCTCTCCTCT3'; *OGG1.5* 5'CCAGAGTGAAGGAGAAAGCA3', 5'TGTGACCCATCAACAGAAGT3'; *OGG1.6* 5'GGTCACAGAAGGGGTCAGAT3', 5'GTGTAGGAGGGTGGAGTC3'; *OGG1.7* 5'CAGACTCCACCCTCCTACAG3', 5'CTTCCCTACCACTCCTCACT3'.

For PCR reactions 125ng/ul of each DNA was mixed to 2.5ul of 10X IIB Buffer (40mM NaCl; 10mM Tris HCl pH=8.4; 0.1% Triton X-100; 1.5mM MgCl₂),

2.5ul of 0.2mM dNTP, 0.5ul of each primer at 10pmol/ul and 0,25ul of Taq polymerase 0,625U. Samples were placed on a Eppendorf Mastercycler gradient thermocycler at 94°C for 3 minutes and then 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds and a final extension time at 72°C for 5 minutes. PCR products were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) following manufacturer's protocol and visualized on a silver-stained 6,5% polyacrilamide gel.

Sequences were obtained on ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries (Applied Biosystems) and analyzed using ABI Sequencing Analysis and Sequencer v. 4.9 programs.

2.3. Ancestry Analysis

All samples were submitted to an analysis of biogeographical genomic ancestry. Each sample was independently typed for 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms (indels) as described previously [15]. Amplicons were then sized using a ABI3130 sequencer (Applied Biosystems) and analyzed using GeneMapper Software Version 4.0 program (Applied Biosystems).

2.4. Statistical Analysis

Results obtained were submitted to univariate and multivariate analysis using SPSS 13.0 software. As population clustering algorithm it was applied the Structure program version 2.1 available at <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>. This software uses multilocal genotypes to allocate ancestry proportions of individuals to

different clusters (populations). The individuals are grouped (probabilistically) on the basis of their genotypes.

3. Results

3.1. Subjects features

Fifty NSCLC tissue samples were collected at Thoracic Surgery Center at Hospital Júlia Kubitscheck, Minas Gerais, Brazil. Post-surgical exams didn't confirm any malignancy in three samples; in two others DNA extraction was inefficient, probably due to the great amount of necrotic tissue on samples, and three more patients couldn't be contacted after surgery, so it was not possible to determine their clinical evolution. Therefore, eight samples had to be excluded from the study. A total of forty-two samples were submitted to experimental analyses; 66.7% were males and 33.3% were females, with a mean age of 59.4 years. 76.2% had history of tabagism, of which 52.4% were smokers and 23.8% were classified as former smokers. The other 23.8% were non-smokers. Control group consisted of thirty individuals, with ages between 55 – 87 years (mean age - 71.8 years). 43.3% were smokers and 56.6%, non-smokers. All clinical data are represented on Table 1.

45.2% of NSCLC were classified as squamous cell carcinoma; 26.2% consisted of adenocarcinoma and 28.5% were classified as others. Samples were classified as staging IB (45.2%), IIB (23.8%), IIIA (14.3%), IIIB (9.5%) and IV (2.4%). Two samples had no records about staging and were classified as non-referents (NR).

Clinical evolution was also followed during the entire period of study. 59.5% of patients presented a bad prognosis with cancer recurrence, metastasis and confirmed death until one year and a half after surgery. 33.3% had a good prognostic,

presenting satisfactory clinical conditions at hospital appointments and absence of metastasis. Three patients died of non-related disease causes and were classified as NR (Table 1).

3.2. OGG1 mutations and clinicopathological correlations

Ser326Cys polymorphism is encoded on *OGG1* exon 7; however, all exons were sequenced in order to visualize possible mutations in other regions of the gene. Seventeen patients had the OGG1-32Cys variant (40.5%), compared to 31% on control group. OGG1-Ser326 variant was found on 25 patients (59.5%) and 69% of controls (Table 2). An intronic polymorphism IVS4-15C>G (rs2072668) was found segregating with SNP rs1052133 (Ser326Cys) in all samples, cases and controls.

All samples were submitted do univariate and multivariate analyses to assess the correlation among clinical and pathological factors, such as age, sex, smoking, histological type, staging and prognosis with presence of polymorphism. Statistical analyses showed no significant differences among polymorphism and clincopathological features, as patient numbers were small.

3.3. Ancestry Analysis

Ancestry component of each individual was established through indels genotyping and analysis of results using GeneMapper v.4.0 and Structure v.2.1 programs. Fifty samples, already testes in previous ancestry studies representing Brazilian population, were used as controls for our analysis. Proportion of European, African and Amerindian components in patients were, in this order, 0.8419 ± 0.02575

(mean $\pm$ SE), 0.1153 ± 0.02117 and 0.04273 ± 0.01053 . In control group proportion were 0.9162 ± 0.01811 , 0.04508 ± 0.009953 e 0.03866 ± 0.01013 . There was statistical difference among cases and controls concerning European ($p = 0.0426$; $p < 0.05$) and African components ($p = 0.0026$) (Figure 1). Analyses between polymorphism and ancestry did not reach statistical significance, probably due to the small number of samples.

4. Discussion

In this study, we report a molecular analysis of OGG1 Ser326Cys polymorphism from 42 NSCLC samples and its correlation with patient clinicopathological features. A frequency of 40.5% of the 326Cys variant was found among cases while controls had a 31% frequency of the same variant. The intronic polymorphism IVS4-15C>G (rs2072668) was found segregating with SNP rs1052133 (Ser326Cys) in cases and controls. However, there is no previous evidences showing any relationship between those two SNPs.

Previous studies associate a reduced repair ability of OGG1 protein to an increasing risk of lung cancer [1], and there are many research groups focusing on determine the role of Ser326Cys polymorphism on lung cancer development, with contradictory conclusions. Yamamane et al [16] performed an experimental assay in H1299 human lung cell lines and detected less repair ability of 8OHG-induced mutations in OGG1-Cys326 cells than OGG1-Ser326 cells, suggesting that Cys326 variant may be a risk factor for lung cancer development. Paz-Elizur et al [1] also suggest that cigarette smoking associated to Cys326 variant would increase lung cancer risk. Kohno et al [2] found an association between Ser326Cys polymorphism and lung adenocarcinoma in a japanese study. Other studies, however, exclude the hypothesis that this polymorphism plays a role in lung cancer development. Vogel et al [17] observed the frequency of OGG1 variants among Danish patients with lung cancer and did not find any significant correlation with *OGG1* polymorphism, neither with other genes related to DNA repair. Hung et al [18] calculated the frequency of polymorphisms in BER pathway genes among lung cancer Caucasian patients and did

not detect any association among variants, although he does not exclude the possibility that OGG1-Ser326Cys polymorphism might play a minor role in disease development. In our study, like in others, analyses did not find any significant association among lung cancer, Ser326Cys polymorphism and clinicopathological features, such as smoking history, sex, age, histological type, staging and prognosis. The small number of samples in our study does not allow, however, any definitive conclusions.

Li et al [19], from a retrospective analysis of several studies, suggest the relevance of ethnical aspects in association studies. This might explain the great number of controversial results concerning the role of OGG1 polymorphism and lung cancer risk. OGG1-Ser326Cys frequency is found to be higher among Asians (>40%) than Caucasians (< 21%) [2, 12] and, for this reason, the influence of this polymorphism can differ among populations. Mixed populations, as Brazilian, are even harder to analyze, since they are composed of different ethnical groups. Ancestry studies in Brazil [14] identified a great European contribution to population though each individual has his own proportion of European, African and Amerindian components. Therefore, Brazilian population must be analyzed individually, not in a group context. There are not many studies reporting OGG1-Ser326Cys polymorphisms in mixed populations, especially among Brazilians. In the present study we found there is a greater African contribution among NSCLC patients than standard control population. There are few studies describing the behavior of OGG1 variants among Africans [20, 21], and this result led us hypothesize that Africans may have more frequency of the polymorphism, despite the lack of significant association between ancestry and OGG1-Ser326Cys occurrence. Once again, the small number of patients does not allow us to give any concrete data, which is why more studies in this

field are needed. However, the studied samples represent a small part of the Brazilian population living in Minas Gerais. Therefore, with this study it was possible to characterize the clinical and molecular aspects of NSCLC Brazilian patients from Hospital Júlia Kubitscheck.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq). We would like to thank the thoracic surgical team from Hospital Júlia Kubitscheck for helping us with patient's informations and sample collection.

References

1. Paz-Elizur, T., et al., *DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(17): p. 1312-9.
2. Kohno, T., et al., *Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 724-8.
3. Djordjevic, M.V., S.D. Stellman, and E. Zang, *Doses of nicotine and lung carcinogens delivered to cigarette smokers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(2): p. 106-11.
4. Peto, R., et al., *Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies*. BMJ, 2000. **321**(7257): p. 323-9.
5. Whitrow, M.J., et al., *Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature*. Respirology, 2003. **8**(4): p. 513-21.
6. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
7. Cornfield, J., et al., *Smoking and lung cancer: recent evidence and a discussion of some questions*. 1959. Int J Epidemiol, 2009. **38**(5): p. 1175-91.
8. Hirano, T., *Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis*. J Radiat Res (Tokyo), 2008. **49**(4): p. 329-40.
9. Asami, S., et al., *Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung*. Carcinogenesis, 1997. **18**(9): p. 1763-6.

10. Paz-Elizur, T., et al., *DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention*. Cancer Lett, 2008. **266**(1): p. 60-72.
11. Mellon, I. and P.C. Hanawalt, *Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand*. Nature, 1989. **342**(6245): p. 95-8.
12. Bravard, A., et al., *Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3642-9.
13. David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 941-50.
14. Pena, S.D., et al., *DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians*. Braz J Med Biol Res, 2009. **42**(10): p. 870-6.
15. Bastos-Rodrigues, L., J.R. Pimenta, and S.D. Pena, *The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms*. Ann Hum Genet, 2006. **70**(Pt 5): p. 658-65.
16. Yamane, A., et al., *Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1689-94.
17. Vogel, U., et al., *No association between base excision repair gene polymorphisms and risk of lung cancer*. Biochem Genet, 2004. **42**(11-12): p. 453-60.
18. Hung, R.J., et al., *Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(8): p. 567-76.

19. Li, H., et al., *The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(7): p. 1739-45.
20. Chang, J.S., et al., *Base excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African-Americans*. Carcinogenesis, 2009. **30**(1): p. 78-87.
21. Leidner, R.S., et al., *Genetic abnormalities of the EGFR pathway in African American Patients with non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5620-6.

Figure List

Figure 1 – Ancestry analysis in cases and controls. There was a greater contribution of African component in cases than controls ($p = 0.0026$; $p < 0.05$)

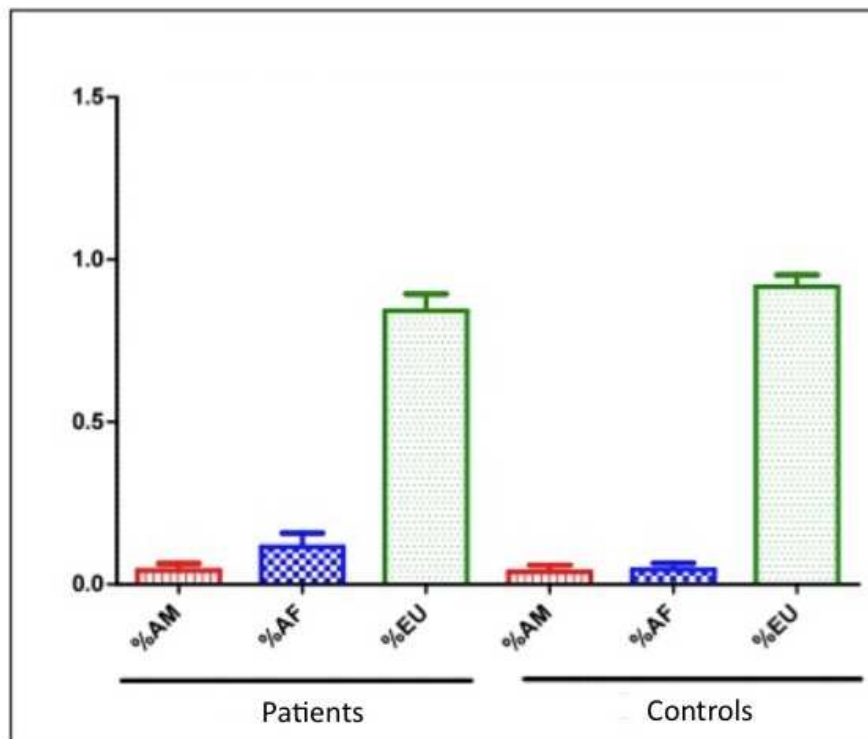


Fig 1: Carneiro, J.G *et al*

Table 1 - Clinical and Pathological data

	Patients	Controls	
	No.	No.	%
Total	42	30	100
Sex			
Male	28	15	30.00
Female	14	15	30.00
Age (years)			
Medias	59.4	71.8	
Range	34 - 77	55 - 87	
Histology			
Adenocarcinoma	11		
Squamous cell carcinoma	19		
Others	12		
Staging			
IB	19		
IIB	10		
IIIA	6		
IIIB	4		
IV	1		
NR	2		
Smoking			
Smokers	22	13	43.30
Former smokers	10		
Never-smokers	10	17	56.60
Prognostic			
Good	14		
Bad	25		
NR	3		

Table 2 - OGG1 Ser326Cys Polymorphism Frequency

	Patients		Controls	
	No.	%	No.	%
Total	42	100	30	100
Ser326Cys polymorphism				
OGG1-326Se 25		59.50	21	69.00
OGG1-326Cy 17		40.50	9	31.00
Homozygc 2		4.80	2	6.90
Heterozyg 15		35.70	7	24.10

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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