BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20-12-1
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**“ESTUDOS DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM
CÂNCER COLORETAL”**

NÍDIA ALICE PINHEIRO

**Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Bioquímica.

**ORIENTADOR: PROF. Dr. RICARDO RENZO BRENTANI
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. ANDREW J. G. SIMPSON**

**SÃO PAULO
2001**

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004800

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pinheiro, Nidia Alice

P654e Estudos da expressão diferencial de genes em câncer
colorectal / Nidia Alice Pinheiro. -- São Paulo, 2001.
195p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Brentani, Ricardo Renzo

Co-orientador: Simpson, Andrew John George

1. Biologia molecular 2. Genética molecular I. T. II.
Brentani, Ricardo Renzo, orientador III. Simpson, Andrew
John George, co-orientador

574.88 CDD

“Estudos da Expressão Diferencial de Genes em Câncer Colorectal”

NÍDIA ALICE PINHEIRO

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.*

Aprovada por:

Prof. Dr. RICARDO RENZO BRENTANI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. SERGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ - USP

Profa. Dra. BIANCA SILVANA ZINGALES
IQ - USP

Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZAGO
FMRP - USP

Prof. Dr. BRYAN ERIC STRAUSS
ICB - USP

SÃO PAULO
01 DE OUTUBRO 2001.

“... Não sabes, não ouviste que o eterno Deus, o Senhor, o Criador dos fins da terra, nem se cansa nem se fatiga? Não há esquadrinhação do seu entendimento. Dá esforço ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os mancebos certamente cairão. Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças, subirão com asas como águias: correrão, e não se cansarão; caminharão e não se fatigarão.”

Isaías 40, 28-31

“CAMINHO PRÓDIGO”

**AMO-TE COM A FORÇA BRANDA
QUE ME IMPULSIONO AO SORRISO,
SINTO-TE TÃO PERTO QUE PAREÇO
RESPIRAR TEU CHEIRO AO REDOR.**

**TUAS MÃOS SUSTENTANDO-ME OS PASSOS
COM PALAVRAS CARINHOSAS BUSCANDO MEU CORAÇÃO.
AH! TEU SORRISO FRANCO E TÃO SOMENTE MEU,
QUE FALTA ME FAZ TEUS MÍNIMOS MOVIMENTOS.**

**HOJE NOVAMENTE PENSEI EM TI, E CHOREI,
DESEJEI BIPARTIR-ME RAPIDAMENTE
PODENDO UMA DE MIM CONSTRUIR MEUS CASTELOS
E A OUTRA HABITAR AS ZONAS CAMPESTRES DE TEU AMOR.**

**SIM, DESEJEI POR PAPÉIS A VOAR...
E NO MESMO MOMENTO TE ABRAÇAR,
SENTIR-ME PROTEGIDA EM TUAS MÃOS
DELICADAMENTE FIRMES GRANDES E MINHAS...**

Nídia Alice Pinheiro

“Abstrações do concreto”, página 40.

**Aos meus pais,
Por serem indubitavelmente,
Meu porto seguro,
Meus alicerces**

AGRADECIMENTOS

Há os que não gostam desta parte, ou achem desnecessária. Mas, para mim, é essencial agradecer aqueles que podem não ter pipetado ou qualificado comigo, mas que possivelmente vibraram com meus resultados positivos, lamentaram por meus fracassos e erros, mas nunca me abandonaram....Ou mesmo não fazendo nada disso, de uma forma ou de outra foram importantes para a concretização de um trabalho...Acredito sim, que nenhuma vitória pertença apenas a quem ergue o troféu, por isso quero aqui agradecer,

Ao Deus único e soberano que sustenta meus passos e decisões.

Aos meus pais, pelo amor incondicional; pelos medos e aflições que sentiram, pelas saudades e por tudo o que me ensinaram a ser e a sentir.

Aos meus irmãos, cada um dentro de sua chatice peculiar, pela proteção a irmã caçula mimada e pentelha.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer – São Paulo, pela oportunidade que tive de realizar meus trabalhos nesta instituição, o que permitiu toda minha formação científica, como também por aceitar a minha orientação para esta tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Andrew J. G. Simpson, uma releitura de meu destino profissional me colocou dentro de seu grupo, e isto foi o que de melhor poderia ter acontecido, pois era um desejo meu. Sou grata pelos ensinamentos que tua forma dinâmica, inteligente e bem humorada de agir me proporcionaram. Com certeza guardo uma grande admiração por tudo o que representa enquanto cientista, orientador e empreendedor.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Lima Reis, por discussões na fase inicial deste trabalho.

As minhas grandes amigas, Valéria Paixão ou “**Valerié**” ou Val com sua “Sinceridade Caustica” e Jane “Haruko” kaiano “sobe ano-desce ano”, mais conhecida como “**Japa**

paraguaya”, Janão, Japinha, Janoca, Japoronguinha....Uma coisa é certa, mesmo chatinhas como vocês são...Eu amo vocês...jamais esquecerei o apoio que recebi nos momentos mais angustiantes, quando longe de minha família, eu ganhei duas irmãs.

A Dra. Otávia Luisa Damas de Caballero, a quem sempre admirei enquanto companheira de laboratório no grupo de Virologia e isso não é diferente agora. Dentro da ciência, onde os “egos” falam muito alto, às vezes até aos berros, temos um grato exemplo de ego que não precisa berrar para se destacar.

Ao Dr. Paulo de Oliveira, pelos desenhos de programas que foram utilizados no desenrolar deste projeto e a **Helena Samaia e Fábio Passeti** pela ajuda em uma das análises. Todos pertencentes ao laboratório de Bioinformática desta Instituição

Ao Dr. Fernando Soares, pela atenção dispensada no início da padronização da técnica de microdissecção das peças tumorais.

Aos pacientes que não sofreram em vão, pois inúmeros trabalhos científicos buscando o bem geral, têm sido proporcionados com os seus consentimentos.

Aos colegas do grupo do Laboratório de Genética do Câncer, aqueles que já cumpriram seu papel por aqui e já se foram, e aqueles que aqui ainda permanecem. Grupos heterogêneos nos ensinam muito. Desejo sucesso a todos vocês: Fabrício, Ana Paula, Patrícia Jeane, Valéria, Elisangela, Anna Christina, Annamaria, Ricardo Moura, Luis Fernando Lopez, José Cláudio, Jane, Andréa.

A diretoria do “condomínio” pelos momentos de lazer e descontração que passamos juntos. Patrícia “Saviocorinthians”, João Simão, Silvana, Laroça, Elisangela (alfa-hélice para os íntimos), Janoca.

Ao laboratório do Prof. Dr. Santeli do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que cordialmente nos permitiu usar seu PhosphorImager, no início deste trabalho.

Aos técnicos Carlinhos e Miyuki, pelo trabalho e ajuda na coleta e preparação das microdissecções.

Ao Dr. Aristóbolo da Silva, pela grande ajuda nos primeiros experimentos com a técnica de Differential Display.

Ao Dr. Alex e a Waleska, técnicos do laboratório de Reação Inflamatória deste Instituto.

À amiga Inês, do Centro de estudos do hospital A.C. Camargo, pela grande ajuda no programa para as análises de concordância.

À todos os funcionários e amigos do Instituto Ludwig, que sempre me trataram com carinho e atenção: pós-graduandos, funcionários da administração e técnicos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Armando Moraes Ventura pelos conselhos, discussões científicas e leitura de parte desta tese.

Ao Wanderlei Pires de Camargo, pela ajuda em algumas correções da redação desta tese.

À secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, representada por todos seus funcionários sempre atenciosos e prestativos em seus trabalhos.

Ao CNPQ pelo apoio no primeiro ano de desenvolvimento deste projeto.

À Fapesp pelo apoio destinado aos três últimos anos deste projeto.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Introdução.....	1
1-Expressão Gênica em Câncer.....	1
2-Câncer Colorectal	5
3-Técnicas para a Identificação de Genes Diferencialmente Expressos	13
Objetivos.....	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos.....	23
Material e Métodos.....	25
A-Experimentos realizados com a técnica de Differential Display.....	25
1-Escolha das amostras tumorais e linhagens celulares de câncer colorectal escolhidas para os experimentos de Differential Display.....	25
2-Microdissecção das amostras tumorais.....	26
3-Extração do RNA das amostras microdissecadas e de tecido tumoral não microdissecado.....	26
4-Tratamento dos RNAs das amostras tumorais com DNase I-RNase Free.....	27
5-Síntese do cDNA das amostras de tumor microdissecadas.....	28
6-Amplificação do cDNA das amostras de tumor microdissecadas (Differential Display).....	29
7-Análise e recuperação das bandas diferencialmente expressas	31
8-Amplificação por PCR dos DNAs eluídos das bandas diferencialmente expressas e clonagem em vetor pUC18.....	32
9-Reação de PCR para analisar eficiência de ligação (oligonucleotídeos flanqueadores da região de ligação em pUC18).....	35
10-Bactérias competentes e transformação bacteriana.....	35
11-minipreparação de DNA plasmidial.....	38
12-Protocolo de sequenciamento.....	39
13-Gel de formaldeído.....	41
B-Experimentos realizados com as membranas GDA (Gene Discovery Array–Incyte Genomics).....	42
1-Escolha das amostras tumorais de câncer de cólon.....	43
2-Microdissecção das amostras tumorais.....	44
3-Extração do RNA das amostras microdissecadas e de tecido normal não microdissecado.....	44
4-Isolamento do mRNA PolyA+ do RNA total.....	45
5-Síntese do cDNA das amostras de tumor microdissecadas.....	46
6-Hibridização e exposição dos filtros do GDA.....	47
7-Lavagem das membranas GDA para a reutilização.....	48
8-Análise dos resultados das hibridizações com os filtros GDA.....	49

C-Experimentos com RT-PCR semi-quantitativa para validação dos resultados da expressão diferencial de Genes em câncer colorretal.....	51
1-Escolha das amostras tumorais de câncer colorretal usadas em reações de RT-PCR.....	51
2-Microdissecção das amostras tumorais.....	52
3-Extração do RNA das amostras microdissecadas e tecido normal não microdissecado.....	52
4-Isolamento do mRNA PolyA+ do RNA total.....	52
5-Tratamento dos RNAs das amostras tumorais com DNaseI-RNase free.....	52
6-Reação de polimerização em cadeia (PCR) para os genes p53, D-loop e GAPDH.....	52
7-Southern-blot para o gene D-Loop e Northern-blot para o gene GAPDH.....	54
8-Síntese do cdna das amostras de tumor microdissecadas.....	55
9-Reação de RT-PCR semiquantitativa.....	56
10-Oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de RT-PCR semiquantitativa.....	58
11-Mapeamento Gênico.....	60
12-comparação com resultados da técnica de Affymetrix em tecido colorretal normal e tumoral.....	61
13-Comparação com Projeto Piloto de Mama.....	62
14-Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para o Contig H70732-N73523.....	62
15-Comparação com dados presentes em homepage de SAGE.....	63
16-Hibridização da membrana Multiple Tissue Expression Array (Clontech) com sondas de Oligophrenin-1.....	64
Resultados.....	65
A-Para os experimentos de expressão diferencial de genes em câncer colorretal com a técnica de Differential	66
1-Microdissecção das amostras tumorais.....	66
2-Amplificação e análise do cDNA das amostras de tumor microdissecadas.....	66
3-Recuperação e amplificação das bandas diferencialmente expressas do gel de Differential Display.	68
4-Clonagem dos DNAs amplificados das bandas diferencialmente expressas em vetor pUC18.....	68
5-Seleção e sequenciamento dos clones de cDNAs das amostras diferencialmente expressas.....	68
B-Para os experimentos de expressão diferencial de genes com as membranas GDA-IncyteGenomics..	77
1-Microdissecção das amostras tumorais.....	77
2-Hibridização das membranas GDA1.2 e GDA1.3.....	77
Discussão.....	164
Referências Bibliográficas.....	188
Anexos.....	195

RESUMO

A tumorigênese do cólon é considerada como um processo complexo que ocorre em múltiplos passos, através de uma série de mutações gênicas capazes de promover a evolução de uma lesão precursora até um adenocarcinoma invasivo e metastático.

O desenvolvimento e progressão do câncer e a reversão da tumorigenicidade são acompanhados por complexas mudanças no padrão da expressão gênica. Microarrays de cDNAs fornecem um poderoso instrumento para se estudar esses complexos fenômenos.

O propósito deste estudo foi o de determinar a expressão diferencial de genes em tumores coloretais em comparação aos seus tecidos normais. Nós também investigamos a possível variabilidade da expressão gênica entre misturas de tumores coloretais microdissecados. Essas amostras foram analisadas usando o sistema Gene Discovery Array Human System (Incyte Genomics) que consiste de duas membranas de nylon com clones de cDNA fixados em duplicatas, em uma densidade de 36,864 clones por filtros ou 18,376 clones de cDNA individuais. Nossos resultados mostraram vários clones diferencialmente expressos entre os tecidos tumorais e normais analisados. Os resultados obtidos com membranas GDA foram comparados através de um programa de computador na linguagem UNIX aos dados publicados por Alon *et al.*, 1999, que trabalharam com o sistema “Affymetrix Oligonucleotide Array” com complementariedade para mais que 6,500 genes humanos. Os resultados encontrados nessas análises foram contrastados com os presentes nas bibliotecas de SAGE, através do instrumento “Northern Virtual” presente na página “Sagenet.org”. Alguns dos genes diferencialmente expressos encontrados neste estudo foram analisados pela técnica de RT-PCR semiquantitativa em tumores coloretais individuais.

ABSTRACT

Colon tumorigenesis is considered a complex multistep process that occurs through a series of gene mutations, leading from precursor lesions to invasive and metastatic adenocarcinoma. The development and progression of cancer and the reversal of tumorigenicity are accompanied by complex changes in patterns of gene expression. Microarrays of cDNA provide a powerful tool for studying these complex phenomena. The purpose of the present study is to determine differential gene expression in colon tumors as compared with normal tissue. We also investigated the possible variability of the gene expression among pools of micro dissected colon tumors. These samples were analyzed using the Gene Discovery Array Human system (Incyte Genomics) that consists of two nylon membranes in a double spotted pattern at a density of 36,864 per spots per filter or 18,376 individual cDNA clones. Our results showed several differentially expressed clones between normal and tumor tissue analyzed. Our results were compared by software analysis to the patterns was found by Alon et al., 1999 using affymetrix oligonucleotide array complementary to more than 6,500 human genes tumor. We analyzed ours data against SAGE library by "Northern Virtual" tools ("Sagenet.org" homepage). Some genes founded in these analyses were tested in RT-PCR semi-quantitative analysis.

ABREVIATURAS

μl	Micro litro = 10 ⁻⁶ L
APC	Gene supressor de tumor associado a “Familiar Adenoma Poliposis Coli”
ATP	Adenosina Trifosfato
BPV	“Bovine papillomavírus”
D.D	Differential Display
DCC	gene codificante para a proteína da membrana celular e matriz celular, deletado em carcinoma de cólon.
ddNTP	Dideoxidonucleotídeos trifosfatados
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Os quatros Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EST	Etiqueta de sequência expressa
GDA	Gene Discovery Array
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosídeo
Kb	Quilobases
LB	“Luria-Bertani broth”
M	Molar
mM	Milimolar = 10 ⁻³ M
NCR	“Non-Coding Region”
ORF	“Open reading frame”
P53	Gene supressor de tumor p53
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida não Desnaturante
pb	pares de bases
PCR	Reação de Polimerização em cadeia
pRB	Proteína do gene do Retinoblastoma
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction
RB	Gene do Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico

RT-PCR	“Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction”
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
TBE	Tris-Borate EDTA
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethyl-ethylenediamine
W	Watts
<i>Wnt-2</i>	Gene supressor de tumor Willms
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

INTRODUÇÃO

1- EXPRESSÃO GÊNICA EM CÂNCER

A transformação maligna de uma célula é acompanhada e caracterizada por mutações no material genético e em consequência a expressão aberrante de múltiplos genes. A identificação desses genes provê bases para um melhor diagnóstico e prognóstico para o câncer.

A genética do câncer é uma problemática envolvendo genes associados a várias funções celulares normais, incluindo: proliferação celular (Hunt & Scherr, 1994), reparo do DNA (Sancar, 1994), estabilidade cromossômica (Hanawalt, 1994), na comunicação célula-célula, na interação matriz-célula (Giancotti, 1990; Hirano, 1992; Akiyana, 1996), angiogênese (Hanahan *et al.*, 1992), no processo de invasão tumoral, motilidade e metástase (Muller *et al.*, 1995; Steller-Stevenson *et al.*, 1993), senescência (Campisi, 1994; Swisshelm *et al.*, 1995) e apoptose (Wyllie, 1995).

A expressão gênica alterada é um acontecimento freqüentemente resultante de mutações cruciais em estágios diferentes durante o desenvolvimento tumoral, ou decorrente de mudanças na regulação de genes não mutados.

Como exemplo, podemos citar genes que codificam para moléculas que diretamente induzem transcrição (Klimpfinger *et al.*, 1990), regulação do crescimento (Tsushima *et al.*, 1996) e proliferação (Arber *et al.*, 1996), como também aqueles genes que codificam para moléculas chave em vias de transdução de sinal, tais como as proteínas wnt-2 (Vider *et al.*, 1996). As proteínas CD44 (Woodman *et al.*, 1996) e FAK (Weiner *et al.*, 1993) têm sido encontradas com aumento de expressão em tumores de cólon. Os genes codificantes para os inibidores de ciclo celular, como p16, ou para os de reparo de “mismatch” como hMLH1, são suprimidos ou perdidos em tumores de cólon devido à perda de heterozigotidade e/ou devido a metilação de seus promotores (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Kane *et al.*, 1997), entre outros tantos exemplos tão bem conhecidos nos dias atuais.

Mais de 100 oncogenes têm sido identificados, contudo, apenas um subconjunto encontra-se consistentemente mutado em cânceres humanos (Weinberg, 1996).

Aqueles envolvidos em múltiplos tipos de tumor incluem os que codificam para receptores de fator de crescimento *erbB* e *erbB₂*, *ras*, *myc* e *Bcl1*. Com relação aos genes supressores de tumor, vários são correntemente aceitos como exemplos de genes cuja mutação ou deleção está associada com tumorigenese em um ou mais tipos de câncer (Weinberg, 1996). Exemplos bem conhecidos incluem *Rb*, *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *VHL*, *APC*, *NF-1*, *NF-2* e *MTS-1* (que codifica para a proteína p16, um inibidor do ciclo celular).

Genes envolvidos na definição do fenótipo maligno são operacionalmente definidos por sua expressão alterada. De forma geral, apenas genes mutados são considerados como candidatos a genes envolvidos em processos neoplásicos, mas o fenótipo carcinogênico resulta de uma expressão gênica alterada e não é uma simples relação 1:1 entre genes mutados e fenótipos de câncer. Como exemplos podemos citar os genes envolvidos em câncer tais como *myc*, *p53* e *WT-1* que codificam para fatores de transcrição (Sager *et al.*, 1993) que em resposta regulam outros genes ou vias gênicas que se encontram à jusante deles. Ainda um outro exemplo de gene conhecido como gene neoplásico é o *erb-B₂* que codifica para receptores transmembrânicos que por sua vez regulam genes à jusante através da via de tradução de sinal.

A identificação de diferenças genéticas entre células normais, células pré-cancerosas e células cancerosas, contribuem para o entendimento do câncer de forma a promover a descoberta de genes que diretamente causam o câncer. Além disso, pode fornecer um caminho para identificar células pré-cancerosas, e reforçar métodos para uma detecção precoce (diagnóstico). Dessa forma, esse tipo de abordagem pode contribuir para o aumento na habilidade de tratar pacientes portadores do mesmo tumor com o tratamento apropriado às suas diferenças individuais. Frequentemente pacientes portadores de tumores que pelos critérios tradicionais são indistinguíveis, podem experimentar diferentes respostas apesar de receberem o mesmo tipo de tratamento. Por exemplo, o resultado da pesquisa apresentada na figura 1, demonstra que para pacientes sofrendo de neuroblastoma, a presença ou ausência de um subconjunto de genes específicos encontrados no cromossomo I correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos pelo paciente frente ao tratamento.

Figura 1 – Genes e o tratamento do câncer. O gráfico mostra um exemplo de presença ou ausência da região cromossômica 1p em pacientes com retinoblastoma e porcentagem de sobrevivência. Extraído de Caron, H, et al., New England Journal of Medicine, 1996.

Num futuro próximo, essas características do tumor poderão ser usadas para identificar aqueles pacientes que se beneficiarão de um tratamento mais agressivo, e os que se adaptarão melhor aos protocolos de tratamentos convencionais.

Ao sermos capazes de estabelecer para uma célula o repertório de genes expressos juntamente com a soma dos produtos gênicos produzidos por cada um deles, podemos produzir uma impressão digital (“fingerprint”) poderosa. Isso nos tornará capazes de comparar a impressão digital de uma célula normal à de uma célula cancerosa, e detectar genes suspeitos devido à sua ausência ou presença, e que por isso merecem futuras investigações sobre seu papel no câncer, ou ser mais evidenciados em testes para detecção precoce da doença (Figura 2).

Figura 2- Expressão Genica: O "fingerprint" da célula.

A análise da expressão gênica e de possíveis variabilidades entre tumores possibilitará uma melhor compreensão do processo tumorigênico do cólon, e a seleção de marcadores prognósticos, ao caracterizar as diferentes fases dessa doença. O modelo do câncer coloretal nos possibilita a aquisição de novos conhecimentos, com a finalidade de buscar novos subsídios a respeito do comportamento biológico das células tumorais e da relação estabelecida entre a neoplasia e o hospedeiro. Através da identificação da expressão diferencial obteremos um melhor entendimento do ambiente molecular desse tumor com todos os possíveis imbricamentos de vias de expressão gênica envolvidas.

Os perfis gênicos identificados devem ser muito bem caracterizados, para a visualização de valores clínicos que levem a melhores e mais eficientes métodos de diagnóstico e prognóstico para a doença.

2 - CÂNCER COLORETAL.

Diversos estudos ao nível molecular revelam conjuntos de alterações genéticas em vários cânceres humanos que possivelmente correspondam ao desenvolvimento tumoral em múltiplos passos.

O câncer coloretal é um tumor de cólon ou reto, que acomete com alta frequência ambos os sexos. Fatores ambientais como dieta, exercícios físicos, consumo de álcool, além da história familiar, aparecem como fatores de risco epidemiológico para este tipo de câncer (Potter, 1997). O risco de uma pessoa qualquer da população desenvolver câncer coloretal durante o seu tempo de vida é de cerca de 6 a 7%. Mas o risco para este tipo de câncer começa a aumentar após os 40 anos de idade, com pronunciado aumento aos 50-55 anos de idade, e dobra a cada década posterior atingindo um pico aos 75 anos de idade (Figura 3). Independente dos avanços de técnicas cirúrgicas e tratamento adjuvante, não tem havido nenhuma mudança radical no resultado do tratamento quando o paciente procura atendimento médico com o tumor em fase avançada. Assim, abordagens preventivas, primárias (identificação de fatores genéticos, biológicos e ambientais) e secundárias (manipulação clínica), devem ser desenvolvidas para que se possa reduzir a morbidade e mortalidade dessa doença.

Em incidência, o câncer coloretal é o quarto após os de mama, pulmão e próstata. A segunda causa de morte independente da idade nos Estados Unidos é o carcinoma de cólon metastático (80% dos pacientes que morrem deste câncer têm metástase no fígado) (Reddy, 1997). Mais de 90% dos cânceres de cólon são representados por adenocarcinomas (Potter, 1997). Em termos mundiais os EUA apresentam a mais alta incidência em homens e mulheres, 30,0 a 35,0 por 100,000 habitantes; a Europa apresenta a incidência de 15,0 a 20,0 por 100,000 habitantes e a América Latina e África apresentam de 10,0 a 15,0 por 100,000 habitantes.

O câncer é a terceira maior causa das mortes no Brasil (11,38% dos óbitos) e a segunda doença que mais mata, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (27,46% do total). Tanto entre homens como entre mulheres a faixa etária que apresentou a maior taxa de mortalidade por câncer este ano esteve compreendida entre 60 e 69 anos, seguida de 70 a 79 anos. Por tipos de câncer, entre os homens, o de pulmão, estômago e

esôfago mataram mais na faixa dos 60 a 69 anos, enquanto os de próstata e de cólon/reto apresentaram maior taxa de mortalidade na faixa dos 70 a 79 anos. Entre as mulheres, o câncer de mama e o de colo do útero mataram mais na faixa dos 50 aos 59 anos, enquanto o de pulmão causaram mais óbitos na faixa dos 60 a 69 anos e os de estômago e de cólon/reto na faixa dos 70 a 79 anos (Boletim do INCA-2000). A maior incidência no país dos cânceres de próstata, mama e cólon/reto (este último tanto entre homens como mulheres) aconteceu na Região Sul.

As estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil, anunciadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, indicam que 104.200 brasileiros deverão morrer este ano vítimas da doença, e que serão diagnosticados 261.900 novos casos. Seguindo a tendência mundial, a taxa de mortalidade está crescendo no Brasil (Boletim do INCA-2000).

Figura 3- Câncer de cólon e reto: média anual de incidência idade-específica e taxa de mortalidade para a população norte americana, porém perfeitamente aplicável para regiões brasileiras.

As tabelas 1, 2 e 3 ,abaixo, mostram a incidência de diferentes tipos de cânceres de acordo com a região do país e as figuras 4 e 5 mostram a taxa bruta de mortalidade por sexo, para os tipos de câncer mais freqüentes no país.

	Brasil	Sul	Sudeste	Nordeste	Norte	Centro-Oeste
1°	Pele	Pulmão	Mama	Pele	Colo de útero	Pele
2°	Mama	Mama	Cólon e Reto	Mama	Pele	Mama
3°	Colo de útero	Pele	Pele	Estômago	Estômago	Colo de útero
4°	Estômago	Cólon e Reto	Estômago	Colo de útero	Mama	Próstata

Tabela1-Tipos de Câncer por Ordem de Incidência (Novos Casos em 2000) – Geral.

	Brasil	Sul	Sudeste	Nordeste	Norte	Centro-Oeste
1°	Pele	Pulmão	Próstata	Pele	Estômago	Pele
2°	Pulmão	Pele	Cólon e Reto	Estômago	Pele	Próstata
3°	Próstata	Próstata	Pulmão	Próstata	Pulmão	Pulmão
4°	Estômago	Cólon e Reto	Estômago	Pulmão	Próstata	Estômago

Tabela 2-Tipos de Câncer por Ordem de Incidência (Novos Casos em 2000) – Homens.

	Brasil	Sul	Sudeste	Nordeste	Norte	Centro-Oeste
1°	Mama	Mama	Mama	Mama	Colo de útero	Pele
2°	Colo de útero	Pele	Colo de útero	Colo de útero	Pele	Mama
3°	Pele	Colo de útero	Cólon e reto	Pele	Mama	Colo de útero
4°	Cólon e reto	Cólon e reto	Pele	Estômago	Estômago	Cólon e reto

Tabela 3-Tipos de Câncer por Ordem de Incidência (Novos Casos em 2000) – Mulheres.

Figura 4 - Taxa bruta de mortalidade por câncer de algumas localizações primárias Brasil - Homens, 1980-1996. Fontes: Ministério da Saúde: DataSus, SIM, INCA; e IBGE: DEPE/DEPIS.

Figura 5 - Taxa bruta de mortalidade por câncer de algumas localizações primárias Brasil - Mulheres, 1980 – 1996. Fontes: Ministério da Saúde: DataSus, SIM, INCA; e IBGE: DEPE/DEPIS.

No Brasil a incidência de câncer colorretal em 1996 foi de 17.000 novos casos, com discreta predileção pelo sexo feminino (Pro-Onco, 1996), apresentando-se como o quinto tumor mais freqüente (7,27%), considerando-se ambos os sexos, depois dos cânceres de mama (12,15%), colo uterino (8,08%), estômago (7,68%) e pulmão (7,43%) (INCA, 1998). Em algumas localidades com importação de hábitos alimentares de países desenvolvidos, as taxas de incidência dessa doença é relativamente mais alta, como no caso de Porto Alegre em 1991, com a mais alta taxa para o sexo masculino (24.49/100.000), enquanto Fortaleza, 1985, apresentou a menor taxa de incidência para essa neoplasia para o sexo masculino, 5.81/100.000 (Pro-Onco, 1996). Na tabela 1 observamos que o câncer colorretal permanece como o quinto mais incidente.

O diagnóstico do câncer colorretal faz-se, basicamente, pela clínica através do toque retal, retossigmoidoscopia, RX contrastado dos cólons e colonoscopia.

Este tipo de câncer é um excelente exemplo de carcinogênese em múltiplos passos, no qual foram elucidadas várias mudanças genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento do câncer (Fearon *et al* 1990). Nesse processo caracterizado pelo acúmulo progressivo de mutações, as mutações de *p53* são consideradas eventos relativamente tardios (Fearon *et al.*, 1990, Hollstein *et al.*, 1991) e decisivos para a manifestação das formas mais agressivas ou malignas dos tumores coloretais.

Esse acúmulo de alterações sucessivas observadas nesse tipo de câncer, culmina com o evento mais tardio nesse processo que é a perda do braço curto do cromossomo 17 e o gene *p53*, desencadeando a transformação de adenoma para carcinoma. Esta região é a mais freqüentemente afetada por perda alélica em câncer colorretal, com deleção em mais de 80% em todos os tumores (Baker *et al.*, 1990). A partir desse estágio, outras alterações induzem invariavelmente ao desenvolvimento de metástases, que levam ao óbito do paciente.

A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são os principais procedimentos para o tratamento do câncer. Os dois últimos métodos têm como fatores limitantes de uso seus estreitos índices de ação entre o tecido normal e o neoplásico, o que os tornam terapêuticos pouco específicos e, eventualmente, muito tóxicos. Concorrem para isso a similaridade que há entre os componentes bioquímicos e subcelulares do câncer e do tecido normal. Por isso, tanto a radioterapia como a quimioterapia atingem as células do

tecido normal, quando o alvo pretendido é, apenas, a neoplasia. A cirurgia não é muito diferente, pois também lesa ou extirpa o tecido normal para que o câncer possa ser atingido, contudo este último método atinge uma cura de cerca de 50% dos casos.

Juntos o cólon e o reto formam um tubo longo e muscular chamado de grande intestino (Figura 6). O câncer que começa no cólon é chamado de câncer de cólon, e o câncer que começa no reto, é chamado de câncer retal. Os cânceres afetando ambos esses órgãos podem ser chamados de câncer coloretal. A exata causa desse tipo de câncer não é conhecida, entretanto alguns fatores de risco como idade, dieta, pólipos, história médica da pessoa, história médica familiar, colitis ulcerativas, aumentam as chances das pessoas desenvolverem o câncer coloretal.

Figura 6: Esquema ilustrativo mostrando o grande intestino e a distribuição dos carcinomas no cólon e reto. Podemos observar que a maioria dos tumores incide no lado esquerdo do intestino entre o cólon sigmóide e o reto.

Alguns testes para detecção precoce do câncer são: teste de sangue oculto nas fezes; sigmóidoscopia, colonoscopia, exame reto digital e duplo contraste de enema de bário. Já o diagnóstico do câncer coloretal pode ser feito por exames físicos.

Utilizando esses testes, o câncer coloretal pode ser dividido em estágios que levam em consideração o grau de invasão do tumor em relação ao tecido adjacente e a capacidade das células tumorais atingirem linfonodos regionais ou distantes. Na figura 7 vemos um esquema ilustrativo da sobrevida em pacientes após 5 de detecção do tumor,

levando-se em conta o grau invasivo do tumor. O câncer colorretal pode ser dividido em estágios:

Estagio 0: O câncer é muito precoce. É encontrado apenas no mais externo revestimento do cólon e reto.

Estagio I: O câncer atinge a parede mais interna do cólon ou reto.

Estagio II: O câncer se espalha para fora do cólon ou reto para tecidos próximos, mas não em linfonodos.

Estagio III: O câncer se espalha para os linfonodos, mas não para outras partes do corpo.

Estagio IV: O câncer se espalha para outras partes do corpo. O câncer colorretal tende a se espalhar para o fígado e ou pulmão (Cancer of the Colon and Rectum – file: [http://www.A/About SHGC Publications.html](http://www.A/About%20SHGC%20Publications.html) – [Http://cancernet.nci.nih.gov/](http://cancernet.nci.nih.gov/)).

Dukes: **A ou B** **C** **D**
 local **regional** **distante**

Figura 7: Esquema ilustrativo da sobrevida após 5 anos em pacientes com tumores de cólon e reto. Estadiamento segundo os critérios de Dukes. Os valores entre parênteses são referentes à sobrevida dos pacientes em cada estadio da doença.

3 – TÉCNICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS:

Em vista da necessidade de identificação de genes chave no processo de estabelecimento de uma doença, vários métodos têm sido descritos para identificar mRNAs diferencialmente expressos em estudos comparativos, como é o caso das técnicas de Hibridização Subtrativa (Lee *et al.*, 1991), RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) (MacClelland *et al.*, 1995). e a Differential Display (D.D.) descrita por Liang *et al.*, 1992. (Figura 8)

RAP-PCR, uma reação de PCR usando um molde de cDNA e um único oligonucleotídeo selecionado arbitrariamente, oferece uma impressão digital de mRNAs através dos produtos de PCR. Uma baixa temperatura é utilizada no primeiro ciclo de amplificação do cDNA, visando a ligação inespecífica dos iniciadores aos seus vários sítios de complementaridade no molde. Assim, após a transcrição reversa e desnaturação, a iniciação arbitrária é feita na primeira fita de cDNA recém sintetizada que se torna disponível para um segundo evento de iniciação arbitrária seqüência seletiva com o mesmo iniciador ou outro diferente. O produto deste segundo passo agora possui os iniciadores presentes em cada extremidade e pode ser amplificado na reação de PCR e teoricamente somente segmentos provenientes de mRNA são amplificados. Isto porque um sítio foi gerado durante a síntese do cDNA e o outro sítio adicionado durante o pareamento em baixo rigor durante o primeiro ciclo da PCR. Na dependência do tamanho do iniciador, sistema de gel e polimerases utilizadas, o número de produtos facilmente visíveis pode variar de cerca de 5 a 100. Esta técnica é considerada adequada para isolar genes diferencialmente expressos em dois estados diferentes da célula (MacClelland *et al.*, 1995).

A estratégia geral da técnica D.D. compreende a amplificação de seqüências de cDNA de subconjuntos de mRNA através da transcrição reversa desses e da reação de polimerização em cadeia (PCR). As seqüências curtas obtidas são visualizadas em gel de sequenciamento. Basicamente os fundamentos teóricos aplicáveis a RAP-PCR, e Impressões digitais de RNA são os mesmos em linhas gerais, aplicáveis para a técnica de D.D, excetuando o uso de iniciadores ancorados, para a realização da reação de

transcriptase reversa. Esses iniciadores possuem onze nucleotídeos T, seguidos de uma base que pode ser T, C ou G e mais uma outra base qualquer. Dessa forma com um conjunto de quatro iniciadores T11VA, T11VC, T11VG, T11VT, podemos dividir toda a população de mRNA em 12 subpopulações de cDNA de fita simples. Com esses cDNAs sendo utilizados como moldes em uma reação de PCR, onde o iniciador ancorado combinado com outro iniciador ancorado e aleatório de 10 bases (Ldd1, Ldd2 ou Ltk3), são utilizados sob baixo rigor. Uma suficientemente baixa temperatura é utilizada no primeiro ciclo de amplificação do cDNA, visando a ligação inespecífica dos iniciadores aos seus vários sítios de complementaridade no molde. Assim, após a transcrição reversa e desnaturação, a iniciação é feita na primeira fita de cDNA recém sintetizada que se torna disponível para um segundo evento de iniciação arbitrária sequência seletiva com os iniciadores. O produto deste segundo passo, agora possui os iniciadores presentes em cada extremidade e pode ser amplificado na reação de PCR e teoricamente somente segmentos provenientes de mRNA são amplificados. Isto porque um sítio foi gerado durante a síntese do cDNA e o outro sítio adicionado durante o pareamento em baixa estrigência (ou rigor) durante o primeiro ciclo da PCR.

Alguns problemas vistos nesta técnica se correlacionam à possibilidade de contaminações das amostras com pequenas quantidades de DNA genômico. Devido a maior complexidade do DNA, o número de sítios de complementaridade é muito maior do que os oferecidos pelo mRNA, crescendo-se as concentrações relativamente altas de iniciadores, de DNA polimerase e as condições de pareamento pouco rigorosas. Outro fato a ser visto é a probabilidade de que o produto observado não seja apenas função das melhores combinações possíveis entre o iniciador e o molde, mas sim da abundância de cada RNA. Dessa forma pode-se pensar que RNAs raros sejam sub-representados entre os produtos visíveis no gel. Para minimizar esse problema faz-se análises de "Northern blots" ou mesmo "nested PCR" das impressões digitais encontradas (Ralph *et al.*, 1993). Essas técnicas basicamente englobam os mesmos passos com apenas algumas variações.

Figura 8: Esquema ilustrativo para a técnica de “Differential Display”.

As novas tecnologias emergentes para avaliação da expressão gênica podem ser divididas em métodos seriais e métodos paralelos. Uma delas é a “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE), técnica que permite a análise simultânea e quantitativa de um grande número de transcritos, isto é, a técnica mostra não somente quais genes estão ativos no tecido, mas também a qual nível (Velculescu *et al.*, 1995).

A técnica de SAGE (Serial analysis of gene expression) foi desenhada para tomar vantagem dos dados conseguidos pela tecnologia de sequenciamento e dessa forma obter

um perfil quantitativo da expressão gênica celular (Figura 9). Essencialmente, a Técnica de SAGE mede não o nível de expressão de um gene, mas quantifica uma etiqueta (“tag”), a qual representa o produto de transcrição de um gene. Uma etiqueta para o propósito de SAGE é uma sequência de nucleotídeos de um tamanho definido, diretamente 3'-adjacente ao 3' mais próximo ao sítio de restrição de uma endonuclease de restrição particular. Os dados produzidos pela técnica de SAGE são uma lista de etiquetas com seus correspondentes valores contados, sendo assim uma representação digital da expressão gênica celular. A técnica de SAGE inclui vários passos de biologia molecular, sequenciamento de DNA e técnicas de bioinformática. A construção de uma etiqueta de SAGE para o mapeamento de um gene é um trabalho em múltiplos passos e processos automatizados. Este método se baseia no isolamento de mRNAs poliadenilados com subsequente síntese de cDNA biotinilado. Os cDNAs biotinilados são ligados a “beads” de estreptoavidina e então digeridos com uma enzima de ancoragem que corta cerca de 4 bases à extremidade 3'. Após a ligação com 2 diferentes conjuntos de “linkers” chamados de “linkers” 1A,B e 2 A, B ao 3'do cDNA ligado a estreptoavidina, é usada a enzima *BsmFI*. Esta é uma enzima de restrição tipo IIs, usada para digerir 19pb a “downstream” do 3' terminal de seu sítio de restrição, codificado no conjunto de “linkers”. Isto produz conjuntos de “linkers” solúveis (1 e 2), cada um com uma etiqueta de 14pb. Nos conjuntos de “linkers” são produzidas extremidades abruptas a seus 3'terminais e então ligados para formar “ditags” de 102pb. Os “ditags” são amplificados por PCR, resolvidos em gel de poliacrilamida 12%, purificados e digeridos com a mesma enzima de ancoragem. Subseqüentemente, os “ditags” de 26 mer resultantes são submetidos a um PAGE de 12%, purificado e ligado para formar concatameros, os quais são clonados em um vetor pZero e este usado para transformar bactérias DH10B. O sequenciamento dos “ditags” em concatameros capacita a catalogação e quantificação da frequência de “tags”, as quais delineiam a identificação e abundância dos transcritos para um dado tecido ou linhagem celular.

Como descrito originalmente, o tamanho da etiqueta era de nove pares de bases, e a enzima de restrição usada era a *NlaIII*. Os protocolos de SAGE correntemente usados produzem uma etiqueta de cerca de 10 a 11 bases, e embora a enzima *NlaIII* continue a ser usada mais amplamente, outras enzimas podem ser utilizadas.

Uma etiqueta de 10 bases não é uma perfeita representação de um transcrito completo de um gene. Há situações em que 2 ou mais genes dividem a mesma etiqueta (i.e., uma etiqueta designada para um gene é ambígua), e situações em que um gene tem mais que uma etiqueta (i.e., alternância de terminação em um indivíduo, e polimorfismo em uma população, assim o gene para a etiqueta designada, não é específica). Além dessa dificuldade inerente em fazer uma etiqueta específica e não ambígua para o gene designado, há uma taxa de erro de sequenciamento, totalmente aceitável do ponto de vista da maioria dos experimentos de sequenciamento, mas que pode ter vários efeitos perturbadores nos dados das etiqueta de SAGE pelo fato de serem seqüências curtas. Desta forma, há dois desafios ao se tratar com dados de SAGE na forma de etiquetas e valores. O primeiro diz respeito à segurança que as etiquetas e seus valores oferecem como uma representação válida de transcritos e níveis de expressão, e o segundo é tornar uma etiqueta válida para uma designação gênica.

Assumindo que haja uma média de 1% por base de taxa de erro de sequenciamento, para 10 bases, a chance de um ou mais erros acontecer é grosseiramente de 10%. Assim, o erro mesmo se acontecer em menor nível que a etiqueta contada, aumentará a contagem de uma etiqueta já estabelecida e o valor de uma etiqueta a qual na verdade não existe. Ainda, ao se fazer uma etiqueta para a designação de um gene, há cerca de 10% de chance de uma etiqueta de 10 bases incluir um ou mais erros, independentes dos erros de sequenciamento posteriores ao isolamento dessa etiqueta.

Esta técnica foi testada em seqüências isoladas de pâncreas, resumidamente, mostrando que todos dos 10 transcritos mais abundantes foram derivados de genes de pâncreas com funções conhecidas, e sua prevalência foi consistente com prévias análises de RNA pancreático através de abordagens convencionais (Velculescu *et al.*, 1995).

O grupo Volgestein aplicou a técnica de SAGE para comparar o padrão de expressão entre câncer de cólon primário e tecido de cólon normal. As amostras foram originárias de 2 pacientes e a análise mostrou que a maioria dos transcritos foi expressa a níveis similares, havendo, contudo, 289 transcritos expressos a níveis significativamente diferentes. Transcritos que foram expressos em níveis mais altos em tumor de cólon (108), quando comparados ao normal o foram em média 13 vezes maior. Já os transcritos que se apresentaram com diminuição de expressão em tumores de cólon (181), quando

comparados ao normal, o foram em média 10 vezes menor. Para determinar o quanto as diferenças foram independentes do microambiente celular do câncer, foi desenvolvido um estudo com uma linhagem celular de câncer coloretal. Cerca de 130 dos 181 transcritos que foram expressos a baixos níveis na linhagem celular tumoral foram também expressos à mais baixos níveis nos tumores. Enquanto que uma fração significativa (47 de 108) dos transcritos expressos a altos níveis em câncer primário foi também expressa em mais altos níveis na linhagem celular de colón e reto (CR). Isso mostrou que muitas das diferenças que distinguem células normais de células tumorais *in vivo* persistem durante o crescimento *in vitro*. Mas, apesar das similaridades foram encontradas também muitas diferenças, por exemplo, 47 de 228 genes expressos a altos níveis em linhagem celular de câncer coloretal também o foram em câncer coloretal primário. Quando foram combinados os resultados do padrão de expressão de câncer CR (*in vivo* e *in vitro*) ao das células de cólon normais, foram revelados 548 transcritos expressos diferencialmente, com uma média de diferença de expressão de 15 vezes para esses transcritos. Com os genes com maior diferença de expressão sendo provavelmente os mais importantes biologicamente. Uma questão, que fica desse estudo resumido acima, é a potencial heterogeneidade de expressão entre tumores individuais. Embora este estudo tenha demonstrado um grande número de diferenças, também é importante o fato de que a fração de transcritos exibindo diferenças significantes foi também relativamente pequena, representando 1,55 dos transcritos detectados em qualquer tipo celular. Os achados de que centenas de genes específicos são expressos a diferentes níveis em câncer CR, provê uma riqueza de dados para futuros experimentos biológicos e diagnósticos.

Figura 9: Esquema da técnica SAGE (Serial analysis of gene expression).

Schena e col., em 1995, por sua vez, usaram um sistema de alta capacidade de monitoramento da expressão de muitos genes em paralelo. Esse sistema consiste de “microarrays”, preparados por robôs de alta velocidade, de DNAs complementares aplicados em lâminas de vidro para fazer medidas quantitativas da expressão dos genes correspondentes. Para testar a técnica foi feita a análise de expressão diferencial dos genes da *Arabidopsis Thaliana* (que possui o menor genoma entre os eucariotos superiores) por medidas simultâneas da hibridização com sondas fluorescentes de cores diferentes. Depois de preparados os “arrays” com os cDNAs da *Arabidopsis* e tendo os fixados com temperatura e processos químicos, adicionou o pool de cDNA preparado do mRNA codificante de proteínas extraídas das folhas da *Arabidopsis* e marcados com um corante vermelho e o cDNA preparado com mRNA codificantes para proteínas das raízes marcadas com corante verde. O padrão de fluorescência foi medido por um “scanner” computadorizado, que indica os níveis de expressão relativa dos genes nos dois tecidos, e a atividade absoluta de cada gene pela comparação de seu padrão de fluorescência ao padrão de quantidades conhecidas de cDNA. A expressão observada foi cerca de 100 vezes maior em um tecido que em outro e após o sequenciamento, os resultados obtidos mostraram, por exemplo, genes para enzimas fotossintéticas ativos nas folhas, mas não nas raízes. Nessa análise comparativa entre folhas e raízes foram identificados 27 genes expressos diferencialmente, sendo que para este teste inicial os “microarrays” continham apenas 45 cDNAs.

Os genes estimados para o genoma humano excedem os genes da *Arabidopsis* em pelo menos 5 vezes (Meyerowitz & Pruitt, 1985). Tal aumento em complexidade sugere que “cDNA microarrays” similares, preparados dos repertórios crescentes de ESTs humanos (National Center of Biotechnology information), poderiam ser usadas para determinar o padrão de expressão de dezenas de milhares de genes humanos em diversos tipos celulares. Com “cDNA microarrays” para monitorar o padrão complexo de expressão, esses tecidos podem servir como um sensível sensor *in vivo* para o diagnóstico clínico. Podendo assim os “cDNA microarrays”, também conhecidos como “DNA chips” e “DNA biochips”, prover uma útil ligação entre seqüências de genes humanos e a medicina clínica.

Como vimos a tecnologia de “array” ou arranjos gênicos, que podem ser descritos como “macroarray” e “microarray”, diferindo no tamanho dos “spots” das amostras, torna possível o simultâneo estudo da expressão de milhares de genes durante um único experimento (Heller *et al.*, 1997; Schena *et al.*, 1995; Schena *et al.*, 1996).

O denominador comum nesta técnica é a existência de uma plataforma sólida (lâmina de vidro, nylon, silicone chips, plástico, papel) com um conjunto de ácidos nucleicos imobilizados, aplicados manualmente ou pelo uso de automação (robô) em um arranjo pré-determinado, que participam em uma interação interfacial sólido-fluido com uma solução de ácidos nucleicos alvos. Desde que uma alta densidade de genes pode ser estudada em paralelo, somente uma pequena soma de amostras é necessária. De forma similar à reação de polimerização em cadeia (PCR), o microarray tem uma multitude de aplicações. A primeira das aplicações dos “biochips” como descrito, foi no monitoramento da expressão gênica (Schena *et al.*, 1995). Essa técnica pode ser também utilizada para detecção de mutações (Fodor, 1997), como na análise de detecção de mutação em *BRCA-1* (Hacia *et al.*, 1996), para a análise de polimorfismos como em estudos de genes da protease classe B de HIV-1, para mapeamento gênico, estudos evolucionários (Wang *et al.*, 1998; Sapolsky *et al.*, 1996), para analisar todo o DNA mitocondrial humano (Chee *et al.*, 1996), para análises de fibrose cística (Cronin *et al.*, 1996), entre outras aplicações.

Outro método é o Affymetrix GeneChip platform ou Oligonucleotide Array (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), nesse método ocorre a síntese da sequência de cDNA diretamente em lâminas de vidro usando máscaras de fotolitografia para produzir a sequência correta (Wodicka *et al.*, 1997). Os “affymetrix chips” possuem sequências oligonucleotídicas de 25 mer do gene. Método também usado para monitorar a expressão gênica, onde pares de sondas de perfeitos e simples “mismatches” correspondendo a cada gene alvo são sintetizados em áreas adjacentes no arranjo. Cada gene ou transcrito é analisado por múltiplos pares de sondas. O “gene Chips software” é sensível o suficiente para detectar mudanças em expressão gênica em torno de 2-3 vezes entre os experimentos. Este método foi usado por Alon U., *et al.* (1999), para monitorar o nível de expressão de genes em 40 tumores e 22 tecidos normais de cólon.

O sistema GDA (Gene Discovery Array) desenvolvido pela Incyte Genomics e usado neste trabalho consiste de clones de cDNAs em células de bactérias hospedeiras, do IMAGE Consortium Clone Collection. Os clones de cDNA são crescidos nas membranas e processados para liberar o DNA plasmidial. Cada colônia tem o tamanho de 0.4mm antes da lise. Tais clones são então desnaturados e fixados a membranas de nylon por irradiação de luz ultravioleta. Havendo cerca de 1×10^8 cópias de cada plasmídeo por ponto na membrana. Cada membrana tem dimensões de 22cm x 22cm, com um ordenamento de 18,376 clones individuais de cDNAs humanos, não redundantes, em duplicatas; 32 controles em duplicatas e controles negativos, também em duplicatas (clones de *Drosophila* e *Arabidopsis*). A análise é feita através de software GDS (Gene Discovery Software) para extrair os dados obtidos após hibridação com sonda marcada com ^{32}P e exposição da membrana ao equipamento Phosphorimager. A quantidade necessária para uma boa hibridização deve ser de pelo menos 1.0µg de RNA poly A+ e uma concentração ótima é de 2.5µg. O limite de detecção predito para essas membranas é de 1 cópia em 10,000 (5 cópias por célula) e os clones são escolhidos do IMAGE Consortium clone set (<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html>). Dados de seqüências e anotações para esses clones são disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and TIGR (<http://www.tigr.com>).

Este é um produto relativamente novo de forma que existem apenas 3 publicações disponíveis até o momento. Um esquema geral dessa técnica pode ser visto na figura 10.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Identificar genes diferencialmente expressos em amostras tumorais de carcinoma coloretal que possam vir a ter valor para diagnóstico e/ou prognóstico dentro do câncer coloretal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Seleção das amostras de tumor de cólon a serem usadas neste estudo;
- 2 - Padronização da técnica de dissecação das amostras tumorais escolhidas visando minimizar ao máximo as possíveis contaminações com tecidos normais;
- 3 - Padronizar a extração do mRNA das amostras dissecadas e, síntese do cDNA dos diferentes mRNAs e amplificação por Reação de Polimerização em cadeia (PCR);
- 4 - Padronização da técnica de Differential Display (D.D.) radioativa, análise dos resultados e reamplificação das bandas diferencialmente expressas na eletroforese em gel de sequenciamento;
- 5 - Aplicar a padronização da técnica radioativa às amostras de carcinomas coloretais escolhidas;
- 6 - Padronização da técnica de recuperação das bandas diferencialmente expressas em gel de poliacrilamida e reamplificação do DNA recuperado;

7 - Clonagem e sequenciamento dos cDNAs representativos dos mRNAs diferencialmente expressos nas amostras estudadas; pesquisa por similaridades para os transcritos no GenBank;

8 - Teste com as membranas GDA (Incyte Genomics) usando “pool” de tumores coloretais;

9 - Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para os clones que apresentam diferença ao nível de expressão entre os tecidos normais e tumorais analisados e testá-los para diferentes tumores individuais através da técnica de RT-PCR semiquantitativa.

MATERIAL E MÉTODOS

A – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A TÉCNICA DE DIFFERENTIAL DISPLAY

1 - ESCOLHA DAS AMOSTRAS TUMORAIS E LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER COLORETAL ESCOLHIDAS PARA OS EXPERIMENTOS DE DIFFERENTIAL DISPLAY.

Os tumores foram escolhidos do banco de tumor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC) com prévia análise que constou dos seguintes itens:

A - Escolha de tumores previamente analisados para mutação no gene *p53* por sequenciamento direto do DNA.

Mediante dados de arquivos do ILPC, esses tumores foram escolhidos com relação ao estágio da doença, grau de diferenciação do tumor e localização da mutação, todas as amostras de tecido fresco tumoral. Assim as amostras escolhidas para o estudo foram:

1- Tumor de cólon com grau de diferenciação G2, estágio IV e mutação pontual no exon 5 do gene *p53*, ao códon 175 (G → C) com troca do aminoácido ARG por CYS.

2 - Tumor de cólon com grau de diferenciação G2, estágio III e mutação pontual no exon 5 do gene *p53*, ao códon 175 (G → C) com troca do aminoácido ARG por CYS.

3 - Tumor de cólon com grau de diferenciação G2, estágio III e mutação pontual no exon 4 do gene *p53*, ao códon 114 (G → T) com troca do aminoácido LEU por PHE..

4 - Tumor de cólon com grau de diferenciação G2, estágio III e mutação pontual no exon 7 do gene *p53*, ao códon 234 (A → G) com troca do aminoácido TYR por CYS.

5 - Duas amostras de tumor de cólon com grau de diferenciação G2, estágio III sem mutação no gene *p53*.

6 - Uma linhagem celular de carcinoma de cólon, SW837, com mutação no códon 273 do gene *p53*.

7 - Três amostras de tecido de cólon normal.

B - Através da análise histológica de lâminas do material tumoral coradas com H.E. (hematoxilina e Eosina) conduzida com o auxílio de um patologista (Dr. Humberto Torloni), determinamos as regiões apenas compreendidas por tecido tumoral e o estado

histológico geral desse tecido tumoral, presença de necrose ou infiltrados de tecido normal ou células inflamatórias.

2 - MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Após análises histológicas das amostras de tumor de cólon escolhidas, procedemos à técnica de microdissecção de uma das amostras visando testar a técnica e padronizá-la. Dessa forma uma das amostras de tumor de cólon congelada, sem mutação detectada no gene *p53*, foi escolhida e dela foram feitas secções de 20µm para a microdissecção. Este corte do tecido foi aderido a uma lâmina histológica seca e corada com azul de toluidina. A microdissecção foi feita sob um microscópio com o uso de um bisturi estéril com o qual toda a região de mucosa normal e demais tecidos normais adjacentes ao tumor foram retirados. Posteriormente o tecido tumoral foi raspado da lâmina com bisturi estéril para dentro de um tubo de microcentrífuga. Desse material foi extraído o mRNA e testado. Com o resultado sendo positivo, todas as amostras de tecido tumoral com alteração no gene *p53* foi microdissecado e tiveram seus mRNAs extraídos. De cada amostra foram feitas dez lâminas com três cortes cada uma.

3 - EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS MICRODISSECADAS E DE TECIDO NORMAL NÃO MICRODISSECADO.

As preparações dos RNAs foram feitas através do método de "RNAzol™ B Isolation of RNA" (Cinna/Tel-Test). Este reagente promove um complexo do RNA com a guanidina e moléculas de água, abolindo as interações hidrofílicas de DNA e proteínas, sendo esses eficientemente removidos da fase aquosa, enquanto o RNA permanece nesta fase durante a extração da amostra.

Resumidamente:

Homogeneização: os cortes de 20µm dos tecidos tumorais raspados das lâminas histológicas ou 100mg do tecido congelado não microdissecado das amostras não mutadas (cortados com bisturi estéril), foram homogeneizados em 2 ml de RNAzol™ B em tubo de polietileno no primeiro caso, e macerados em macerador de vidro no segundo caso.

Extração: Ao homogenato foram adicionados 0.2 ml (0.1 vol.) de clorofórmio/álcool isoamílico e dividido em volumes iguais para quatro tubos de polietileno de 1.5ml, homogeneizados vigorosamente por 15 segundos e incubados em geladeira (4°C) por 20 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12,000g (4°C) por 15 minutos. O volume da fase aquosa era de cerca de 50% do volume inicial de RNazol™ B mais o volume de tecido usado para a homogeneização.

Precipitação: A fase aquosa foi transferida para tubos de polietileno de 1,5 ml novos e a ela foi adicionado igual volume de isopropanol e incubados por 30 minutos a -70°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 12,000g (4°C). O RNA precipitado formou um sedimento amarelo-esbranquiçado no fundo do tubo.

Lavagem do RNA: O sobrenadante foi removido e o "pellet" lavado com 0.8 ml de etanol 75% através de agitação vigorosa em vortex e subsequente centrifugação por 8 minutos a 7,500g (4°C).

Ao final do procedimento o sedimento foi seco a temperatura ambiente por 5 minutos e ressuspenso em 40-50µl de água tratada com DEPC (0.1 % de dietilpirocarbonato -DEPC para cada 100ml de água deionizada e posteriormente autoclavada). Na leitura de D.O. (densidade óptica) a razão 260/280 foi sempre superior a 1.9 - 2.0, mostrando RNA livre de proteínas.

4 - TRATAMENTO DOS RNAs DAS AMOSTRAS TUMORAIS COM DNase I - RNase FREE.

Para o tratamento dos RNAs das amostras tumorais com DNase I foram usadas concentrações de RNAs que variavam de 30 a 50 µg. O volume de cada amostra foi completado para 50µl finais com T.E. pH 7.4 (Tris -EDTA).

Sempre em gelo, foram adicionados 50µl da mistura aos RNAs dissolvidos:

10µl de 10mM de MgCl₂/100mM de DTT.

2.0µl de DNase I RNase - free (GIBCO-BRL 2mg/200µl).

38.0µl de TE, pH 7.4.

Essa mistura foi incubada a temperatura de 37°C por 15 minutos, tratada com proteinase K (40µg/ml-GIBCO-BRL) e incubadas por mais trinta minutos a 37°C. Esta reação DNase/Proteinase K foi interrompida com 25µl da solução "DNase Stop Mix".

Solução DNase Stop Mix*:

50mM de EDTA (0,5M)

1.5M de Acetato de sódio 3M

Água tratada com DEPC.

*Todas as soluções foram previamente autoclavadas.

Na reação interrompida foi feita uma extração fenol (saturado com água) vol./vol. e uma extração clorofórmio/álcool-isoamílico vol./vol. A fase aquosa produzida nas extrações foi precipitada com 250mM de NaCl e 2 vol e 1/2 de etanol 75% por 30 minutos a -70°C, após o que foi centrifugada por 30 minutos a 4°C a 12,000g. O sedimento depois de lavado com etanol 75% e seco por 5 minutos a temperatura ambiente foi ressuspensão em 34µl de água tratada com DEPC. A D.O. foi lida novamente e calculada a perda de RNA durante o tratamento, no caso a perda observada por nós variou de 40 a 50% do valor de concentração inicial para cada RNA submetido ao tratamento.

5 - SÍNTESE DOS cDNA DAS AMOSTRAS DE TUMOR MICRODISSECADAS.

Para a síntese dos cDNAs foram usadas de cada amostra, 200ng de seu RNA total tratado com DNase I, como molde da reação abaixo:

Oligos dT ₁₁ VT (25µM)	2.0µl
mRNAs (200ng)	2.0µl
<u>Água</u>	<u>16.0µl</u>
Vol.final	20.0µl,

aquecidos a 70°C por 10 minutos, centrifugadas rapidamente e deixadas em gelo por 2 minutos.

À mistura de reação foram acrescentados:

Tampão 5x *(<i>SuperScript</i> -GIBCO-BRL)	4.0µl
DNTP's (10mM)	2.0µl
RNAzin (40u/µl - GIBCO-BRL)	1.0µl
Transcriptase Reversa (200u/µl - <i>SuperScript</i> -GIBCO-BRL)	1.0µl
<u>DTT (0.1M)</u>	<u>1.0µl</u>
Total	20.0µl

*5x First Strand Buffer [250mM Tris-HCl ph 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂].

A síntese dos cDNAs foi feita a uma temperatura de 42°C por uma hora, após o que foi inativada por 15 minutos a 70°C.

Os cDNAs sintetizados foram estocados a uma temperatura de -70°C até a amplificação por PCR.

6 - AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DAS AMOSTRAS DE TUMOR MICRODISSECADAS (DIFFERENTIAL DISPLAY)

Utilizando-se de três diferentes oligonucleotídeos de seqüências de bases aleatórias e do oligo dt utilizado para a síntese do cDNA foi conduzida uma amplificação por PCR-radioativa dos cDNAs produzidos das amostras tumorais.

Para esta síntese foram usadas as amostras: CON 186 (tecido de cólon normal); COT 186 (tumor de cólon com alteração ao códon 175 do gene *p53*, microdissecada), COT 203 (tumor de cólon com alteração ao códon 234 do gene *p53*, microdissecada), COT 158 (tumor de cólon sem alteração detectada no gene *p53*).

Como controle de contaminação com DNA genômico, na PCR foi usada uma mistura de todos os RNAs tratados com DNase I (diluídos 1:10), em um tubo de PCR contendo a mistura de reação e todos os oligos nucleotídeos aleatórios e o oligo dt utilizados.

Os oligonucleotídeos usados foram descritos em (Liang *et al.*, 1993):

Ltk3

5'-CTTGATTGCC-3'

Ldd1

5'-CTGATCCATG-3'

Ldd2

5'-CTGCTCTCAA-3'

Oligodt11VT:

5'-TTTTTTTTTTT-3' (usado nos experimentos mostrados)

Oligodt11VA:

5'-TTTTTTTTTTTVA-3' (não usado nos experimentos mostrados)

Oligodt11VC:

5'-TTTTTTTTTTTVC-3' (não usado nos experimentos mostrados)

Oligodt11VG:

5'-TTTTTTTTTTTVG-3' (não usado nos experimentos mostrados)

A mistura de reação para a amplificação por PCR foi:

<u>Reagentes</u>	<u>Volumes</u>
Taq DNA polimerase (5u/μl Sequence grade/Promega)	0.5μl
Tampão 10x * (GiBCO-BRL)	2.0μl
MgCl ₂ (25mM/ GiBCO-BRL)	2.0μl
Oligodt ₁₁ VT (5μM)	2.0μl
Oligos (Ldd1 ou Ldd2 ou Ltk3)	2.0μl
CDNA	2.0μl
DNTP's (10mM)	1.0μl
a dCTP ³²	0.5μl
Água	q.s.p. para 20.0 μl

*Tampão 10 x para PCR [200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]

Essa mistura de reação foi submetida aos seguintes passos de ciclagem: Um ciclo de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 40°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 30 segundos, terminando com um ciclo de 94°C por 30 segundos, pareamento a 40°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 10 minutos. Foram tomados 6μl do produto dessa reação e diluídos em 4μl de solução de corrida desnaturante (95% de formamida, 20mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xilenocianol), aquecidos em bloco seco a 95°C por 15 minutos

para desnaturar e aplicados em um gel de poliacrilamida 6% desnaturante por aproximadamente 4 horas a 1300 volts , posteriormente o gel úmido foi transferido para um suporte (filme de radiografia velado e limpo) recoberto por papel plástico tipo vitafilm e exposto contra filme de raios-X por cerca de 3 horas a 12 horas. Após a revelação foi possível analisar os perfis de bandas gerados nessa reação de D.D. e selecionar as bandas diferencialmente expressas.

Preparo do gel de poliacrilamida para o D.D.

Uréia=	30g
Solução 40%=	7.5ml
BTE 10x*=	6.0ml
Água=	23.3ml
APS 10%=	600µl
TEMED=	30µl

*Tampão Tris-borato-EDTA, (pH 8,0)

7 - ANÁLISE E RECUPERAÇÃO DAS BANDAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

O gel após submetido a eletroforese e exposto contra filme de raio x foi revelado e o perfil de bandas diferencialmente expresso foi analisado e identificado. Toda banda que se mostrou com intensidade aumentada ou diminuída entre as amostras analisadas no gel foi marcada. Com folhas de acetato transparente foi feito um molde das regiões das bandas e do marcador presente nos cantos do autoradiograma (Stratagene[®]), de forma que pudéssemos identificar o exato lugar da banda no gel e cortá-la.

Com esse molde fomos para o gel colocando-o exatamente em cima das marcas feitas, e com um bisturi estéril cortamos as bandas cuidadosamente e as colocamos em tubos de 1.5ml de microcentrifuga contendo 100µl de água estéril deixados à temperatura ambiente por 10 minutos e eluimos o produto de PCR por incubação a 95°C por 15

minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado com NaOAc 0,3M e dois volumes e meio de etanol 100% a -70°C por 30 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 85% e seco em centrifuga Savant, após o que foi ressuspensão em 40µl de água estéril.

Depois de extraídas todas as bandas de interesse do gel de D.D., este é reexposto e depois de revelado, é feita a sobreposição com o autoradiograma original para se certificar de que se tenha cortado a banda certa.

8 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS DNAs ELUÍDOS DAS BANDAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS E CLONAGEM EM VETOR PUC 18.

Foi feita uma reação de PCR igual à descrita no item 5 do Material e Métodos, excetuando-se a utilização do isótopo radioativo α dCTP³². Para essa reação de PCR usamos 2µl de cada DNA eluído para um volume final de reação de 40µl.

Todo o volume da reação de PCR (40µl) foi aplicado em um gel de agarose 1% e submetido a eletroforese a 100 volts. As bandas de interesse foram interceptadas por membranas DEAE (Schleicher & Schuell-porosidade 0,45µm) e a eletroforese continuada por mais 15 minutos a 100 volts até que todo o DNA fosse transferido para a membrana.

Esta membrana foi então retirada do gel e lavada em solução “baixo sal” (0.15M NaCl, 0.1mM EDTA, 20mM Tris pH 8.0) e depois incubada por duas vezes em 200µl de solução “alto sal” (1.0mM NaCl, 0.1mM EDTA, 20mM Tris pH 8.0), a 65°C por 15 minutos cada incubação. O produto dessa incubação em solução de “alto sal” foi submetido a uma extração orgânica com fenol/clorofórmio, precipitado com 2 volumes e meio de etanol absoluto por 15 minutos a -70°C e após centrifugação a 4°C o “pellet” foi ressuspensão em 20µl de TE (Tris 10mM pH 7.4, EDTA 1mM).

Foram tomados 5µl deste DNA para ser analisado quanto à sua pureza e quantidade em gel analítico de agarose, corado com brometo de etídeo. Estas amostras devidamente purificadas foram submetidas ao processo de clonagem através do SureClone Ligation Kit (Pharmacia Biotech).

Os produtos de PCR dessas amostras já devidamente purificados foram preparados para a reação de ligação utilizando-se a atividade exonucleásica 3'-5' do

fragmento Klenow da DNA polimerase I visando remover bases únicas das extremidades 3' pendentes no fragmento. Concomitantemente, os fragmentos de PCR a serem clonados foram fosforilados pela T4 polinucleotídeo quinase na presença de ATP. Após extração orgânica com fenol/clorofórmio e purificação em MicroSpin Column (Pharmacia Biotech), o produto de PCR foi ligado ao vetor de ligação *pUC18*, previamente restrito com a enzima *SmaI* para a formação de sítios “blunt-end” e tratado com fosfatase alcalina bovina - BAP. A seleção foi feita pelo crescimento de colônias de bactérias *E.coli/DH5-α* (resistentes a ampicilina) transformadas com uma alíquota da mistura da reação de ligação, que anteriormente foi analisada quanto a sua eficiência através de reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos franqueadores da região de inserção do vetor *pUC18* (Dias Neto *et al.*, 1996).

Todo o processo de sequenciamento foi conduzido utilizando-se o CysTMAutoCycleTM Sequencing Kit e sequenciador automático, ALFexpressTM DNA SEQUENCER (Pharmacia Biotech).

Reação de “Blunting/Kinasing”

Nesta reação foram adicionados os seguintes componentes a um tubo de microcentrifuga:

Produto de PCR	2.0μl
DNA Polimerase/Fragmento Klenow	0.5μl
Tampão 10X Blunting/Kinasing*	2.0μl
T4 Polinucleotídeo quinase	1.0μl
Água destilada estéril	q.s.p. 20.0μl

*Os componentes e suas respectivas concentrações não são fornecidos pelas instruções do SureClone Ligation kit.

O volume foi cuidadosamente misturado e após ser centrifugado brevemente, incubado a 37°C por 30 minutos.

Após a incubação foram adicionados 20μl de fenol/clorofórmio, agitado em vortex por 10 segundos e centrifugado por um minuto em microcentrifuga. O sobrenadante foi coletado e purificado em coluna MicroSpin.

Uma coluna MicroSpin foi colocada em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml. A esta coluna foram transferidos 500µl de resina Sephacryl®S-200 e empacotada em 1 minuto de centrifugação em microcentrifuga. Após remoção do tubo de microcentrifuga, o efluente foi descartado e a coluna com a resina devidamente empacotada foi transferida para tubo novo de 1,5ml. O produto da reação de “Bluntig/Kinasing” foi lentamente colocado sobre o centro da resina e centrifugados novamente por 1 minuto. A coluna foi descartada e o efluente da coluna utilizado na reação de ligação.

Ligação do produto de PCR em vetor

Efluente da coluna	10.0µl
50ng de vetor desfosforilado	1.0µl
Tampão de ligação 5X*	2.0µl
T4 DNA ligase	1.0µl
<u>Água destilada estéril</u>	<u>6.0µl</u>
Volume total	20µl

*Os componentes e suas respectivas concentrações não são fornecidos pelas instruções do SureClone Ligation kit.

Todo o volume da reação foi misturado muito bem e centrifugado levemente, antes de ser incubado a 16°C por toda uma noite.

Deste produto ligado são tomados 2µl para avaliação da eficiência da ligação através de uma reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos franqueadores da região de inserção no vetor *pUC 18*. Uma alíquota deste produto de PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante corado pela prata e comparado ao produto do vetor linearizado, sem inserto (aberto-110pb).

9 - REAÇÃO DE PCR PARA ANALISAR EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO
(OLIGONUCLEOTÍDEOS FLANQUEADORES DA REGIÃO DE LIGAÇÃO EM *pUC 18*):

dNTP's (1.25mM)=	1.5µl
Tampão 10 x (GIBCO-BRL)*=	1.5µl
primer 3' (20µM)=	0.3µl
primer 5' (20µM)=	0.3µl
taq.pol (5U/µl)=	0.15µl
<u>água=</u>	<u>11.25µl</u>
vol. Final	15.0µl

*Tampão 10 x para PCR [200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]

Oligonucleotídeos para *pUC 18*:

sense - 5'-d (GTTTCCAGTCACGAC)-3

anti-sense 5'-d (CAGGAAACAGCTATGAC)-3

10- BACTÉRIAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.

As bactérias *DH5α* foram tornadas competentes para o uso no protocolo de transformação plasmidial seguindo os passos:

1- Uma colônia isolada e saudável foi pega de placa de agar e colocada para crescer em 5 ml de meio LB a 37°C até a OD550 alcançar 0.3;

2- 5ml da cultura foram inoculados em 100ml de meio LB e crescidos a 37°C até DO550 (Densidade Óptica) alcançar 0.48;

3- Deixados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 2000rpm por 10 minutos em tubos Falcon de 50ml, em centrifuga de mesa. O sobrenadante foi descartado completamente;

4- O tampão de transformação I (10ml/tubo) foi adicionado e homogeneizado;

5- Deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugados a 2000rpm por 5 minutos;

6- As células foram ressuspensas gentilmente com tampão de transformação II (1ml/tubo), deixadas em gelo por 15 minutos;

7- As células foram divididas em tubos 0,5ml de polipropileno (eppendorf) (estéril e à 20°C), 200µl/tubo (20 tubos); congeladas rapidamente em banho gelo-seco/etanol. e estocadas em freezer.

Meios e tampões

1 - Tampão de transformação I (TfbI).

<u>Conc. Final</u>	<u>Reagente</u>	<u>p/ Vol. Final (200ml)</u>
30mM	KOAC	0.588g
100mM	RbCl	2.420g
10mM	CaCl ₂	0.294g
50mM	MnCl ₂	1.910g
15% de glicerol		30ml

acertado o pH com ácido acético diluído para 5.8, exatamente.

2 - Tampão de transformação II (TfbII).

<u>Conc. Final</u>	<u>Reagente</u>	<u>p/ Vol. Final (200ml)</u>
10mM	MOPS	0.210g
75mM	CaCl ₂	1.100g
100mM	RbCl	0.120g
15% de glicerol		15ml

acertado o pH para 6.5 com NaOH

Tbfl e TfbII foram esterilizados por filtração e estocados a -20°C.

Meio para crescimento das bactérias competentes:

<u>Preparo do meio L.B.</u>	<u>100ml</u>	<u>Placas de agar</u>
Triptona	10,0g	10,0g
Tris-HCl/pH7,4	10,0ml	10,0ml
MgSO ₄ 1M	1,0ml	1,0ml
Extrato de levedura	5,0g	5,0g
NaCl	5,0g	5,0g
Bacto-agar	-----	15,0g
Água	q.s.p.	q.s.p.

Colocados para autoclavar em recipientes de vidro de 250ml.

Placas para crescimento das bactérias transformadas.

<u>Reagentes</u>	<u>concentração estoque</u>	<u>concentração final</u>
Meio LB + Bacto-agar		250,0ml
IPTG	1M	37,0μl
X-Gal	50mg/ml	20,0μl(40μg/ml)
Ampicilina	50mg/ml	250,0ml (50μg/ml)

Após a verificação das reações de ligação quanto à sua eficiência, 5μl a 10μl da mistura foram transferidos para transformar 100μl de bactérias competentes *E.coli/DH5α* resistentes a ampicilina, em tubo de microcentrifuga de 1,5ml. Este tubo, contendo a mistura de ligação mais a bactéria competente, foi deixado por 30 minutos em gelo e então submetido a choque térmico por 1 minuto em temperatura de 42°C, sendo transferido para gelo por 2 minutos. A seguir, foi adicionado 1ml de meio LB seguido de incubação a 37°C por 40 minutos. Para o plaqueamento em placas de petri contendo bacto-agar/X-gal e IPTG foram tomados 200μl do produto transformado que foram cuidadosamente espalhados de forma homogênea por sobre a placa que foi incubada a 37°C por toda uma noite em estufa de CO₂. Apenas as colônias brancas foram submetidas

a "screening" para detecção dos clones que carregavam o inserto. As colônias foram coletadas com palitos estéreis e então mergulhadas em uma reação de PCR contendo os oligonucleotídeos iniciadores para *pUC*. Em seguida, esse mesmo palito foi deixado dentro de um tubo de coleta contendo 5ml de meio LB e ampicilina (50µg/ml), incubado a 37°C sob agitação, durante a noite.

11- MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Após a separação eletroforética dos produtos da reação de PCR em gel de agarose 1% e verificadas as colônias possuidoras do inserto desejado, foi feita uma mini-preparação de DNA plasmidial através do Kit-Wizard (Pharmacia):

1. 3,0ml de cultura bacteriana a partir de apenas uma colônia individual foram precipitados em tubo de microcentrífuga de 1,5ml,;
2. Ao produto precipitado foram adicionados 150µl de solução de ressuspensão (Kit), e homogeneizados;
3. 150µl de solução de lise (Kit) foram adicionados ao tubo e homogeneizados por inversão até que o conteúdo do tubo assumisse uma aparência clara.
4. 150µl de solução neutralizante (Kit) foram adicionados e homogeneizados por inversão, até que as proteínas precipitassem em coloração branca.
5. O tubo foi centrifugado por 5 minutos em microcentrífuga e o sobrenadante transferido para tubo de 1,5ml novo.
6. A esse tubo foram adicionados 500µl de resina (Kit) e deixado sob agitação suave por 10 minutos.

Empacotamento da coluna:

1. O embolo de uma seringa de 3,0ml foi retirado;
2. A coluna foi adaptada à seringa e a resina complexada ao plasmídeo foi vertida;
3. o embolo da seringa foi recolocado, fazendo-se pressão sobre a resina;
4. A coluna foi retirada da seringa e em seguida o embolo foi retirado da seringa;

5. A coluna foi adaptada a seringa novamente e vertidos 2,5ml de solução de lavagem (Kit) a seringa, o embolo foi recolocado fazendo-se pressão sobre a solução.
 6. A coluna foi colocada em tubo de microcentrifuga de 1,5ml; 50µl de água estéril a 70°C foram adicionados à coluna, e deixados incubando por um minuto, seguindo-se centrifugação da coluna em microcentrifuga por um minuto.
- 5µl desse volume já purificados foram tomados e analisados quanto à quantidade e qualidade de pureza, em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Nessa purificação espera-se que toda, ou a maior parte do DNA plasmidial esteja em uma única conformação, a superenrolada.

12 - PROTOCO DE SEQUENCIAMENTO

Todo o processo de sequenciamento foi conduzido com o Cy5 AutoCycle™ Sequencing Kit desenhado especialmente para ser usado com os ALFexpress™ and ALFred™ DNA Sequencers para ciclos de reações de sequenciamento.

1. O DNA foi preparado conforme os procedimentos citados acima;
2. O tubo de Taq. DNA Polimerase foi centrifugado levemente antes de ser aberto.
3. O estoque de Taq DNA polimerase foi diluído com o tampão de diluição da enzima a 1,25 unidades/µl;
4. Para cada DNA molde foram marcados quatros tubos de microcentrifuga A, C, G e T adicionados 2µl do estoque de solução ddNTP apropriado para cada tubo e colocados em gelo;
5. A cicladora automática Perkin-Elmer Cetus Thermocycler foi programada para os seguintes passos:

Aquecer a 95°C por 5 minutos, seguidos por 20 ciclos de 3 passos:

60°C por 30 segundos

72°C por 30 segundos

95°C por 30 segundos

72°C por 5 minutos, para os “primers forward” e,

95°C por 5 minutos

54°C por 30 segundos

72°C por 30 segundos

95°C por 30 segundos

72°C por 5 minutos, os “primers reverse”

O programa foi finalizado com um “soak file” à temperatura de 4°C até que o “stop solution” pudesse ser adicionado as reações. E após ser misturado com a camada aquosa, colocado em gelo. Cada amostra foi aquecida por 3 minutos a 95°C imediatamente antes de aplicar 10µl no gel.

Os Oligonucleotídeos iniciadores usados foram:

ALFred M13-Fow: 5'-Cy5™ -d[CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC]-3'.

ALFred M13 Rev :5'-Cys™-d[TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC]-3'.

Mistura de reação

DNA	500ng de plamídeo
primer	3-5pmoles
DMSO	2µl (opcional)
água	acima de 9µl
adicionar: tampão de reação	2µl
solução de dNTP	5µl
Taq DNA pol (1.25u/µl)	2µl

Preparo do gel de sequenciamento.

<u>Reagentes</u>	<u>concentração final</u>
acrilamida	5.7%
N,N'- Methylenebisactylamide	0.3%
uréia	7.0M
Tris-borato(pH 8.3)	100mM
Na ₂ EDTA	1mM
N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine	3mM.

Ao final da corrida, o sequenciador automático emite uma folha com a leitura dos picos emitidos por cada nucleotídeo, um cromatograma.

13 - GEL DE FORMALDEÍDO

Para 150,0ml (gel de agarose 1%):

122,0ml de água autoclavada

1.5g de agarose

3,0ml de 50 x Borato

150,0μl de EDTA

Aquecer em forno microondas até que os componentes se dissolvam bem, adicionar 25ml de formaldeído e despejar no aparato de gel horizontal médio.

Tampão de corrida: Para 1.5l:

Em 1.395l de água adicionar 30ml de 50x borato, 1.5ml de EDTA e 75.0ml de formaldeído.

Preparo das amostras:

à mistura de 4,5μl de RNA (15.0μg) e água, adicionar:

5x "running buffer" 2,0μl

Formaldeído 3,5μl

Formamida 10,0μl,

para um volume total de 20,0μl por amostra. Desnaturar a mistura a 65°C por 15 minutos, colocar em gelo por 2 minutos, centrifugar rapidamente e adicionar a cada amostra: 2,0μl de "Loading Buffer" para RNA e 1,0μl de Brometo de etídeo, perfazendo um volume final de 23μl aplicados ao gel. O gel foi pré-corrido por 15 minutos a 5 volts por cm em 1 x "running buffer" para eliminação de excesso de formaldeído e corrido à mesma velocidade.

B) EXPERIMENTOS REALIZADOS COM AS MEMBRANAS GDA (GENE DISCOVERY ARRAY-INCYTE GENOMICS)

I - ESCOLHA DAS AMOSTRAS TUMORAIS DE CÂNCER DE CÓLON.

Esses tumores também são provenientes do banco de tumores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC).

Dados de arquivos do ILPC mostram que esses tumores escolhidos pertencem ao mesmo estadió da doença II, III e IV grau de diferenciação do tumor, G2. Todas as amostras foram previamente analisadas por um patologista para avaliar o grau de contaminação com tecido normal e possibilidade de eliminação da quase totalidade do mesmo através de microdissecção. Assim as amostras escolhidas para o estudo foram:

a) Amostras tumor de cólon e reto; e seus respectivos pares de tecidos normais usadas nos experimentos com pool de 3 e 9 tumores:

Tecidos	Topografia	Morfologia	Estadio Clínico	Número de amostras
9 tecidos	Cólon, NOS*	adenocarcinoma moderadamente diferenciado	II	1
	Cólon, NOS*	adenocarcinoma Tubular	III	2
	Cólon,ascendente	adenocarcinoma Mucinoso	IV	1
	Cólon,descendente	adenocarcinoma	IV	3
	Retosigmoide	adenocarcinoma	IV	2
3 tecidos	Cólon, NOS*	adenocarcinoma	III	1
	Cólon, NOS*	adenocarcinoma	IV	1
	Retosigmoide	adenocarcinoma	IV	1

NOS* (Not Otherwise Specified), não especificado de outra maneira.

Tabela 4: - Amostras de tecidos e misturas usadas nos experimentos com membranas de microarray.

Na tabela abaixo estão as informações sobre a idade, sexo e localização regional de cada paciente participante das misturas de tumores:

PACIENTE	IDADE	SEXO	NATURALIDADE	NACIONALIDADE	RAÇA
1	55	F	São Paulo	Brasileira	Branca
2	52	M		Portuguesa	Branca
3	34	F	São Paulo	Brasileira	Branca
4	75	F	Bahia	Brasileira	Branca
5	71	F	Santa catarina	Brasileira	Branca
6	84	M	Bragança	Portuguesa	Branca
7	83	M	Sergipe	Brasileira	Branca
8	60	M	Kumanoto	Japonesa	Asiático
9	69	F		Espanhola	Branca
10	68	F	São Paulo	Brasileira	Branca
11	58	M	São Paulo	Brasileira	Asiático
12					

b) Através da análise histológica de lâminas do material tumoral coradas com H.E. (hematoxilina e Eosina) conduzida com o auxílio de um patologista (Dr. Fernando Soares), determinamos as regiões apenas compreendidas por tecido tumoral e o estado histológico geral desse tecido tumoral, presença de necrose ou infiltrados de tecido normal ou células inflamatórias.

2 - MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Após análises histológicas das amostras de tumor de cólon escolhidas, procedemos à técnica de microdissecção de uma das amostras, visando testar a técnica e padronizá-la. Dessa forma todas as amostras de tumor de cólon congeladas escolhidas foram microdissecadas. Fez-se um corte do tecido que foi aderido a uma lâmina histológica seca e corada com azul de toluidina, que serviu como uma máscara para delimitar, sobre a

peça, as regiões de tecido tumoral e de tecido normal. A microdissecção foi feita sob uma lupa com o uso de um bisturi estéril com o qual todas as regiões de mucosa normais e demais tecidos normais adjacentes ao tumor foram retirados. Posteriormente o tecido tumoral foi recolhido para dentro de um tubo estéril contendo a solução de extração de RNA e macerado com o uso de um aparelho apropriado. Desse material foi extraído o mRNA e testado.

3 - EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS MICRODISSECADAS E DE TECIDO TUMORAL NÃO MICRODISSECADO.

As preparações dos RNAs foram feitas através do método de "TRizol® Reagent Total RNA Isolation Reagent" (GIBCOBRL), recomendado pela Incyte Genomics. Este reagente promove um complexo do RNA com a guanidina e moléculas de água, abolindo as interações hidrofílicas de DNA e proteínas, sendo esses eficientemente removidos da fase aquosa, enquanto o RNA permanece nesta fase durante a extração da amostra.

Resumidamente:

Homogeneização: a peça de tecidos tumorais microdissecados de 50 a 100mg do tecido congelado e do tecido normal não microdissecado (cortados com bisturi estéril), foram homogeneizados em 1 ml de TRizol® em tubo de polietileno e macerados com o uso de um polytron.

Separação das fases: O homogenato foi incubado por 5 minutos a 20°C para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. À solução homogeneizada foram adicionados 0.2ml (0.1 vol.) de clorofórmio/álcool isoamílico para cada 1ml de TRizol®, agitados manualmente e vigorosamente por 15 segundos, e incubados por 2 a 3 minutos a 20°C. A suspensão foi centrifugada a 12,000g (4°C) por 15 minutos. O volume da fase aquosa é cerca de 60% do volume inicial de TRizol® usado para a homogeneização.

Precipitação: A fase aquosa foi transferida para tubos de polietileno de 1,5 ml novos e a ela foi adicionado igual volume de isopropanol e incubados por 30 minutos a 70°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 12,000g (4°C). O RNA precipitado formou um sedimento amarelo-esbranquiçado no fundo do tubo.

Lavagem do RNA: O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 0.8 ml de etanol 75% através de agitação vigorosa em vortex e subsequente centrifugação por 8 minutos a 7,500g (4°C).

Ao final do procedimento o sedimento foi seco à temperatura ambiente por 5 minutos e ressuspensão em 40-50µl de água tratada com DEPC (0.1 % de dietilpirocarbonato -DEPC para cada 100ml de água deionizada e posteriormente autoclavada). Na leitura de D.O. (densidade óptica) a razão 260/280 foi sempre superior a 1.9 - 2.0, mostrando RNA livre de proteínas. A fase orgânica foi preservada em tubo de polietileno de 1,5 ml novo para posterior isolamento do seu DNA, para eventual sequenciamento.

4 – ISOLAMENTO DO mRNA POLY A+ DO RNA TOTAL.

O isolamento do poly A+ das amostras foi efetuado através do mRNA Isolation kit – for Total RNA (Miltenyi Biotec). O isolamento por este kit é feito usando MACS Oligo (dt) MicroBeads. Resumidamente, pré-aquecemos o tampão de eluição (1mM de EDTA) a 65°C em banho seco e aquecemos o RNA total por 3 minutos também a 65°C e posteriormente o colocamos em gelo.

O RNA total foi diluído com 1 volume de tampão de lise/ligação (um tampão de alto sal contendo 1% de SDS). Para as 150µg de RNA total utilizadas em cada preparação foram adicionados 25µl de Microbeads Oligo(dt). Uma coluna do tipo “Molecular Biology Column” foi posicionada em um campo magnético de um separador MACS apropriado e a ela foram aplicadas 250µl de tampão de lise/ligação deixando fluir livremente pela coluna, o efluente foi descartado. O RNA total foi aplicado ao topo da matriz da coluna, os mRNAs marcados magneticamente ficam retidos na coluna. A

coluna foi lavada com 1 x 250µl de tampão de lise/ ligação e lavadas 4 vezes com 250µl de tampão de lavagem.(uma solução de baixo sal contendo NaCl, Tris HCl e EDTA). Para a eluição do mRNA, a coluna permaneceu no campo magnético e a ela foram aplicados 200µl de tampão de eluição (1mM de EDTA) pré-aquecido O mRNA é eluido por gravidade. A terceira da Sexta gota contém aproximadamente 90% do mRNA isolado.

O mRNA eluido foi concentrado com 0.1 volume de 3M de acetado de sódio pH 5.2 e 3 volumes de etanol absoluto, misturados por inversão e incubados por 1 hora a -70°C. Centrifugados por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o mRNA seco a vácuo e dissolvido em 25.0µl de água tratada com DEPC

Para a extração de mRNA foram usadas 150µg de RNA total, com cerca de 30% de cada RNA participante do pool de RNA total. Esta quantidade de RNA total nos fornece uma média de 2.5 a 4.0µg de poli A⁺, dependendo da preparação.

5 - SÍNTESE DOS cDNA DAS AMOSTRAS DE TUMOR MICRODISSECADAS.

Para a síntese dos cDNAs das diferentes misturas tumorais foram usadas 2.5µg de mRNA poli A⁺, de cada amostra, , como molde da reação abaixo:

20.0µl de mRNA poli A (2.5µg) foram misturados a 2.0µl do 5'-oligo (dt) 18mn (50µM-GIBCO-BRL), e incubados a 70°C por 10 minutos e colocados em gelo por 5 minutos. A amostra foi liofilizada em centrifuga tipo savant e ressuspensa adicionando-se à ela:

Tampão 5(x) Primeira-fita (GIBCO BRL) *	1.6µl
DTT (0.1M)	0.8µl
dA/dG/dT (10mM)	0.4µl
[α-P ³²] dCTP (2000-4000Ci/mmol, 10uCi/µl)	4.0µl
SuperScript II RT (200U/µl)	<u>1.2µl</u>
Vol.final	8.0µl por amostra.

A mistura foi agitada em vortex, centrifugada rapidamente e deixada incubando à 42°C por 2 horas.

*5x First Strand Buffer [250mM Tris-HCl ph 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂].

Aos cDNAs marcados radioativamente foram adicionados 42µl de água estéril e os nucleotídeos não incorporados foram removidos em colunas de sefadex G-50 (preparadas em bulbos de seringas de insulina com lâ de vidro e tubo coletor de 15 ml).

Cada conjunto de membranas é provido de 100ng de um DNA marcador de orientação para as membranas, que auxilia o posicionamento das membranas no “grid” do software de análise.

O DNA marcador foi marcado radioativamente através do kit rediprime™II (random prime labelling system-amersham pharmacia biotech):

25ng do DNA foram diluídos em 45µl de TE (Tris/EDTA) e desnaturados a 95°C por 5 minutos em banho seco, após o que foram centrifugados e adicionados a mistura de marcação (solução de dATP, dGTP, dTTP, Klenow-exonuclease free e random primers), homogeneizados e adicionados 5µl Redivue [α -P³²] dCTP. A reação foi incubada a 37°C por 10 minutos. 5µl de 0.2M de EDTA foram usados para interromper a reação.

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos em colunas de sefadex G-50 (preparadas em bulbos de seringas de insulina com lâ de vidro e tubo coletor de 15 ml).

6 – HIBRIDIZAÇÃO E EXPOSIÇÃO DOS FILTROS GDA

Os dois filtros foram pré-hibridizados em garrafas de hibridização com 20 ml de solução de hibridização [50% (v/v) de solução estoque de fosfato de sódio*, 7% (w/v) de SDS, 1% (w/v) de BSA e 1mM de EDTA] por 30 minutos a 68°C. Após o que, a sonda específica (normal ou tumoral) juntamente ao DNA marcador é adicionada à solução de hibridização nos filtros correspondentes e deixados hibridizar por toda a noite.

Lavagem dos filtros GDA após a hibridização:

Após a hibridização foram feitas três lavagens de 15 minutos cada com a solução de lavagem (50% de solução fosfato estoque, 1% de SDS e 1mM de EDTA). Os filtros foram monitorados para a radioatividade incorporada e expostos em um phosphor screen.

* solução fosfato estoque (1M em Na^+ , 0.5M em PO_4^{3-}):

0.5M de Na_2HPO_4 ; pH ajustado para 7.2 com ácido fosfórico: 89g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 ml de ácido fosfórico 85% para 1000ml.

A figura 10 ilustra os passos gerais de um experimento usando as membranas GDA.

7- LAVAGEM DAS MEMBRANAS GDA PARA REUTILIZAÇÃO.

1-As membranas foram colocadas em garrafas de hibridização com a face dos DNAs para o centro da garrafa e foram adicionados 50mls de NaOH 0.4 N e agitados por 45 minutos a 45 graus Celsius e 20 rpm.

2- As membranas foram lavadas uma vez com 50mls de 0.2M de tris-HCl pH7.2, 0.1% de SDS, 0.1X de SSC por 45 minutos a 45°C e 20 rpm.

3- Posteriormente lavadas por duas vezes com 100mls de 0.2M de tris-HCl, pH7.2, 0.1% de SDS, 0.1X de SSC por 10 minutos a temperatura ambiente e 20 rpm.

Após as lavagens, as membranas foram re-expostas em phosphorimager para assegurarmos de que a sonda foi completamente retirada.

Solução estoque 20x SSC: Misturar 175,3g de NaCl com 88,2g (de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3$)₇ *2H₂O (citrato de sódio); adicionar 900ml de água. Ajustar o pH para 7.0 com 1M de HCl e completar o volume para 1 litro com água estéril.

Solução estoque 10% SDS: Dissolva 100g de SDS em um volume final de 1 litro de água estéril. Aquecer a 65°C para dissolver completamente.

8-ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS HIBRIDIZAÇÕES COM OS FILTROS GDA

Os filtros hibridizados com a sonda de cDNA derivada do tecido normal e a derivada de tecido tumoral foram ambas expostas em phosphor screen por 4 horas e posteriormente a imagem foi capturada em um phosphorimager (Molecular Dynamics) e a imagem com extensão .gel enviada para a GSI- "in-house GDA screening service"- Incyte Genomics. Os resultados das análises dos filtros ficam disponíveis no "site" da Incyte Genomics com acesso somente através de um "username" e senha secreta, enviada através do endereço eletrônico para o usuário.

Tal serviço é cobrado e demora em média duas semanas para ser efetuado.

De forma resumida o cálculo efetuado pelo software envolve:

- a) *pelo valor da intensidade*: Densidade x área é a média dos valores das densidades de cada pixel multiplicado pela área do alvo. Tal medida geralmente reflete a soma do sinal sendo emitida pela forma de um alvo.
- b) *Correção de "background"*: são usados os valores de densidade dos pixel vizinhos que circundam cada quatro em quatro área quadrada. Esse valor é usado subtraindo os dados da densidade. Correção de "background" (Dados de densidade – densidade de bKgd) x (dados de área).
- c) *Normalização do filtro A em relação ao filtro B*: A média global é calculada para o valor corrigido do "background" em cada filtro. Estes valores são usados para normalizar cada ponto no filtro A com o ponto correspondente no filtro B. De forma que para cada ponto, X_B , no filtro B é calculado um novo valor para comparar ao valor A multiplicando o valor B por uma derivada constante e pela divisão da média do filtro A sobre a média do filtro B. Desta forma a somatória total do valor da intensidade para ambos os filtros é a mesma.

Foi feito o cálculo da taxa X_A/X_B para cada ponto e usado para selecionar todos os pontos, com uma chave de seleção secundária da diferença absoluta da média de valores de “background” corrigida para cada ponto. A razão máxima é fixada a 99, incluindo pontos corrigidos para “background” de intensidade zero.

Os dados são enviados em forma de tabelas, onde constam localização do clone no filtro, número e posição na placa que o gerou, “score”, taxa, diferença de intensidade, número de acesso no GenBank e informações de acesso no UniGene, se houver. Nessas membranas, qualquer ponto com uma medida de razão (ponto/ponto) maior que 5 vezes deve ser considerado como diferencialmente significante.

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRAY

Figura 10: Esquema representativo de um experimento de análise da expressão gênica pela técnica de Microarray – Sistema GDA da Incyte Genomics.

**C – EXPERIMENTOS COM RT-PCR SEMIQUANTITATIVA PARA VALIDAÇÃO DOS
RESULTADOS DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM CÂNCER COLORETAL.**

1-ESCOLHA DAS AMOSTRAS TUMORAIS DE CÂNCER DE CÓLON USADAS EM REAÇÕES DE RT-PCR.

Os tumores coloretais usados foram provenientes do banco de tumores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC).

Dados de arquivos do ILPC mostram que esses tumores de cólon e reto escolhidos pertencem ao estadio da doença II, III e IV, e grau de diferenciação do tumor, G2. Todas as amostras foram previamente analisadas por um patologista para avaliar o grau de contaminação com tecido normal e possibilidade de eliminação da quase totalidade do mesmo através de microdissecção. Assim, as amostras escolhidas para o estudo foram:

As amostras que representam pares tumorais e normais de tecido coloretal descritas na tabela abaixo foram usadas nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa. Através da análise histológica de lâminas do material tumoral coradas com H.E conduzida com o auxílio de um patologista (Dr. Fernando Soares), determinamos as regiões apenas compreendidas por tecido tumoral e o estado histológico geral desse tecido tumoral, presença de necrose ou infiltrados de tecido normal ou células inflamatórias.

A tabela abaixo nos mostra informações sobre idade, sexo e regionalidade de cada paciente estudado:

PACIENTE	IDADE	SEXO	NATURALIDADE	NACIONALIDADE	RAÇA
1	57	F	São Paulo	Brasileira	Branca
2	51	M	São Paulo	Brasileira	Branca
3	74	M	Rio Grande do Sul	Brasileira	Branca
4	44	F	Bahia	Brasileira	Branca
5	58	M	São Paulo	Brasileira	Branca
6	30	M	São Paulo	Brasileira	Branca
7	29	M	Minas Gerais	Brasileira	Branca

2 - MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Após análises histológicas das amostras de tumor de cólon escolhidas, procedemos à técnica de microdissecção das amostras de tumor de cólon congeladas pela mesma técnica descrita no item B-2.

3 - EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS MICRODISSECADAS E DE TECIDO NORMAL NÃO MICRODISSECADO.

As preparações dos RNAs foram feitas através do método de "TRizol® Reagent Total RNA Isolation Reagent" (GIBCOBRL), recomendado pela Incyte Genomics, de forma similar ao item B-3.

4 – ISOLAMENTO DO MRNA POLY A+ DO RNA TOTAL.

O isolamento do poly A⁺ das amostras foi efetuado através do mRNA Isolation kit – for Total RNA (Miltenyi Biotec). de forma similar ao item B-4.

5 - TRATAMENTO DOS RNAs DAS AMOSTRAS TUMORAIS COM DNase I - RNase FREE.

Todas as amostras receberam o tratamento com DNaseI-RNase Free mediante a técnica descrita no item A-4 de Material e Métodos.

O tratamento foi feito todas as vezes que sobras de DNA genômico foram encontradas nas amostras.

6 – REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA OS GENES P53, D-LOOP E GAPDH.

Para a validação dos RNAs tratados com “DNaseI-RNase free”, foram feitas reações de PCR usando, como iniciadores, oligonucleotídeos desenhados para o gene mitocôndrial *D-loop*, e para os exons 2-4 e introns 5-6 do gene *p53*. Caso o produto para o DNA *D-loop* aparecesse entre as amostras tratadas, ou o produto da amplificação de *p53* apresentasse o tamanho não esperado, estas eram submetidas a novo tratamento com DNase. Em não havendo amplificação para os genes testes, estas amostras eram

submetidas a novos testes para comprovação de ausência de contaminação com DNA genômico e degradação do material.

A mistura de reação para a amplificação por PCR foi:

Reagentes	D-loop	P53 exons 2-4	P53 introns 5-6
Taq DNA polimerase(5u/μl) (GiBCO-BRL)	0.25μl	0.25μl	0.25μl
Tampão 10x *(GiBCO-BRL)	5.0μl	5.0μl	5.0μl
MgCl ₂ (50mM/GiBCO-BRL)	1.5μl	1.0μl	1.5μl
cDNA	2.0μl	2.0μl	2.0μl
dNTP's (10mM)	1.0μl	1.0μl	1.0μl
Oligo 3' (10pM/μl)	0.5μl	0.75μl	0.5μl
Oligo5' (10pM/μl)	0.5μl	0.75μl	0.5μl
Água	39.25μl		
Temperatura de anelamento	55°C	58°C	58°C

*Tampão 10 x para PCR [200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]

Sequência dos oligonucleotídeos para os genes *D-loop*, *GAPDH*, *P53 exons 2-4* e *P53 introns 5-6*:

1 - *D-loop*: FW 5'- AATAACAATTGAATGTCTGCAC -3'

RV 5'- TTGAGGAGGTAAGCTACATA -3'

Amplicon= 379pb

2- *GAPDH*: FW 5'- CTGCACCACCAACTGCTTA -3'

RV 5'- CATGACGGCAGGTCAGGTC -3'

Amplicon= 498pb

3 – *P53 exons 2-4*: FW 5'- GGAGGAGCCGCAGTCAGA -3'

RV 5'- CAAGAAGCCCAGACGGAAAC-3'

Amplicon = 548pb

4 – *P53 introns 5-6*: FW 5'- TCACTTGTGCCCTGACTT -3'

RV 5'- AACCAGCCCTGTCGTCTC-3'

Amplicon = 268pb

7 – SOUTHERN-BLOT PARA O GENE D-LOOP E NORTHERN-BLOT PARA O GENE GAPDH.

As amostras que não apresentaram amplificação para o gene *D-loop* ou para o fragmento correspondente aos introns 5-6 do gene *p53* na reação de PCR foram submetidas a uma hibridização em Southern-blot com a sonda para o gene mitocondrial *D-loop*, para garantir a ausência de contaminação com DNA genômico (Figura 32). As amostras foram ainda submetidas a uma análise de northern-blot, com um gene constitutivo (*GAPDH*) para termos uma idéia de sua normalização e expressão (Figura 33). A técnica de Southern-Blot foi feita segundo os protocolos tradicionais encontrados em Maniatis *et al.*, 1987.

A técnica de Northern-Blot foi feita segundo o protocolo abaixo:

Gel de formaldeído (1% agarose)

Para 150,0ml (gel de agarose 1%):

122,0ml de água autoclavada

1.5g de agarose

3,0ml de 50 x Borato

150,0µl de EDTA, aquecer em forno microondas até que os componentes se dissolvam bem, adicionar 25ml de formaldeído e despejar no aparato de gel horizontal médio.

Tampão de corrida: Para 1.5l:

Em 1.395l de água adicionar 30ml de 50x borato, 1.5ml de EDTA e 75.0ml de formaldeído.

Preparo das amostras:

à mistura de 4,5µl de RNA (15.0µg) e água, adicionar:

Tampão de corrida (5x) = 2,0µl

Formaldeído = 3,5µl

Formamida = 10,0µl, para um volume total de 20,0µl por amostra. Desnaturar a mistura a 65°C por 15 minutos, colocar em gelo por 2 minutos, centrifugar rapidamente e

adicionar a cada amostra: 2.0µl de tampão de amostra para RNA e 1.0µl de Brometo de etídeo, perfazendo um volume final de 23µl aplicados ao gel.

O gel foi pré-corrido por 15 minutos a 5 volts por cm em tampão de corrida 1 x concentrado, para eliminação do excesso de formaldeído e submetido à eletroforese a mesma velocidade. Após a corrida, o gel foi lavado por 2 vezes em água estéril tratada com DEPC (0.1 % de dietilpirocarbonato -DEPC para cada 100ml de água deionizada e posteriormente autoclavada), e colocado em aparato de transferência para membrana de nylon.

As sondas foram marcadas radioativamente através do kit rediprime™II (random primer labelling system-amersham pharmacia biotech): 25ng do DNA foram diluídos em 45µl de TE (Tris/EDTA) e desnaturados a 95°C por 5 minutos em banho seco, após o que, foram centrifugados e adicionados a mistura de marcação (solução de dATP, dGTP, dTTP, Klenow -exonuclease free e random primers), homogeneizados e adicionados 5µl Redivue [α -P³²] dCTP. A reação foi incubada a 37°C por 10 minutos. 5µl de 0.2M de EDTA foram usados para interromper a reação. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos em colunas de sefadex G-50 (preparadas em bulbos de seringas de insulina com lã de vidro e tubo coletor de 15 ml).

A membrana foi hibridizada usando-se o método de hibridização descrito por Church & Gilbert, 1984.

8 - SÍNTESE DOS cDNA DAS AMOSTRAS DE TUMOR MICRODISSECADAS.

Para a síntese dos cDNAs dos diferentes tecidos tumorais e normais foram usadas de cada amostra, 1.0µg de mRNA poli A⁺, como molde da reação abaixo:

Reagentes	Volumes
5'-oligo (dt) 18mn (50µM-GIBCO-BRL)	1.0µl
mRNA poli A (1.0µg)	3.0µl
Água/DEPC	8.0µl
Volume Final	12.0µl

Esta mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos e colocados em gelo por 5 minutos, após o que foram adicionados:

Tampão 5(x) Primeira-fita (GIBCO BRL)	4.0µl
DTT (0.1M)	1.0µl
dA/dG/dT/dC (10mM)	1.0µl
RNAzin (40U/µl)	1.0µl
SuperScript II RT (200U/µl)	1.0µl
Volume final	8.0µl por amostra.

A mistura foi agitada em vortex, centrifugada rapidamente e deixada incubando a 42°C por 1 hora, e inativada por 15 minutos a 70°C.

*5x First Strand Buffer [250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂].

9 – REAÇÃO DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVA.

Com o produto da síntese do cDNA obtido conforme o item acima, procedemos a uma reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos, de acordo com a reação de PCR descrita abaixo:

Reagentes	Volumes
Taq DNA polimerase(5u/µl) (GiBCO-BRL)	0.5µl
Tampão 10x *(GiBCO-BRL)	5.0µl
MgCl ₂ (50mM/GiBCO-BRL)	1.5µl
CDNA	1.0µl
DNTP's (1.25mM)	1.0µl
Oligo 3' (20pM/µl)	1.0µl
Oligo5' (20pM/µl)	1.0µl
Água	39.0µl
Volume Final	50µl

*Tampão 10 x para PCR [200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]

Essa mistura de reação foi submetida aos seguintes passos de ciclagem: Um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 2 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento à 69°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, seguidos de 2 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 65°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, terminando com 25 ciclos de 94°C por 30 segundos (neste último passo o número de ciclos depende do par de oligonucleotídeo utilizado e da visualização do resultado em gel, onde era possível se perceber saturação ou não da reação de PCR - foram testados 35 ciclos, 30 ciclos, 25 ciclos, 20 ciclos) pareamento a 62°C por 5 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos. A temperatura de pareamento variava de acordo com os pares de oligonucleotídeos utilizados nos diferentes experimentos. Os produtos dessas reações de RT-PCRs foram visualizadas em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante corado pela prata.(Sanguinetti *et al.*, 1994). A análise foi feita com os respectivos pares de tecidos tumorais e normais submetidos a eletroforese lado a lado no gel.

Método de coloração pela prata

para um volume final de 300ml de solução:

1) Solução fixadora:

0,5% de ácido acético glacial;

10% de etanol absoluto

completar para 300ml com água Milli-Q.

2) Solução de prata:

0,2% de nitrato de prata dissolvido em 300ml de água Milli-Q.

3) Revelador

30% de hidróxido de sódio (NaOH);

0,5% de folmaldeído;

completar para 300ml com água Milli-Q.

Em cuba de vidro, devidamente limpa, o gel foi incubado por 10 minutos em solução fixadora sob agitação à temperatura ambiente, em seguida, trocamos essa solução pela de nitrato de prata e deixamos incubar por mais 10 minutos. Após o tempo de

impregnação do DNA com o nitrato de prata, lavamos cuidadosamente e rapidamente o gel por duas vezes, com água deionizada e adicionamos o revelador deixando incubar por no mínimo, 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente.

Após as bandas do gel serem reveladas, trocamos a solução reveladora pela fixadora, e procedemos à secagem do gel.

Secagem do gel.

Sobre uma placa de vidro de tamanho pouco maior que o do gel, colocamos uma folha de papel celofane úmido, de comprimento e largura suficientes para revestir a placa. Sobre ela colocamos o gel corado pela prata e, então, o cobrimos com outra folha de papel celofane úmida com as mesmas especificações que a anterior. Tomamos o cuidado de retirar todas as bolhas de ar que, por ventura, se formaram durante os procedimentos descritos.

10 – INICIADORES USADOS NA REAÇÃO DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVA.

Os clones escolhidos para a RT-PCR semiquantitativa provém do resultado da análise de consistência entre os experimentos com GDA (apresentados no relatório anterior) e dos genes que figuravam como os primeiros em diferença de expressão gênica (“Top genes”) em cada análise de GDA realizada em tecido coloretal, aparecendo como possíveis supressores de tumor ou possíveis oncogenes.

1 -W01911: FW 5'-GAT-GCA-CTA-CTC-AGT-TGC-ACC-3'

RV 5'-CCA-TGC-AGG-ATT-ATT-AAG-GGT-G-3'

2- H16042 : FW 5'-CAC-GAC-TGG-AGA-TTA-AAC-GAA-C-3'

RV 5'-CCT-GAA-GGG-TGA-ACT-TCC-GCA-3'

3 -R23999: FW 5'-TGG-CTA-TTC-TGG-CTT-GTC-CTG-C-3'

RV 5'-GCA-AGT-GTC-TGA-GAA-TCT-GCG-G-3'

4 – H70732: FW 5'-GCT-AAT-GAG-AAC-TAG-TAC-GGC-3'

RV 5'-CCT-TGC-CAC-CAC-ATA-ATT-TGG-3'

5 – AA057839: FW 5'-CAG-GCG-ATT-TAT-TGT-AAA-CAG-G-3'

- RV 5'-ATG-GAA-GAC-TAC-ATG-AGA-TTG-C-3'
- 6 – **H79188**: FW 5'-CTG-CAT-ACT-CTG-GAG-ATC-ACC-3'
RV 5'-GGA-TCT-TGG-GGT-AGA-TGT-CCA-3'
- 7 – **R77592**: FW 5'-CAC-AAA-GCT-TGA-ACT-ATT-TAC-TGC-AT-3'
RV 5'-ACT-TTT-TGG-TGT-ACA-GTT-CTG-AGT-TTT-3'
- 8 – **H73050**: FW 5'-CAT-GGA-GTG-ACT-GGA-GCG-TA-3'
RV 5'-GGG-TCA-CAG-ATC-TTC-GTG-GT-3'
- 9 – **H44773**: FW 5'-ACT-GAG-TGA-ATG-TGA-TGG-TTC-AGA-G-3'
RV 5'-AGG-TGC-TAC-CAG-CTC-CTC-TTA-CT-3'
- 10 – **R44113**: FW 5'-TTG-CAT-TAA-AAC-ACA-CAT-ACA-AAC-A-3'
RV 5'-CTT-TAT-TAA-TCA-CAG-CTT-GCT-CAC-A-3'
- 11 – **H20266**: FW 5'-TCA-ATC-TTT-GTC-CTG-TAT-AAG-AAT-TAC-3'
RV 5'-CAG-CTG-CAA-GAT-AAT-GAG-GC-3'
- 12 – **R81942**: FW 5'-GCA-CTG-GGA-GAT-ATA-CCT-AAT-GCT-A-3'
RV 5'-TTC-TAA-GGT-AGC-TGC-AGA-TAA-GTG-G-3'
- 13 – **N93218**: FW 5'-CTT-AAA-TGG-AAG-TCT-TTT-GGT-CAG-A-3'
RV 5'-AGC-ATA-ATA-AAA-ATC-AAA-GCA-CTG-G-3'
- 14 – **R48311**: FW 5'-CCC-TTT-GTC-CCT-GCA-ACT-AC-3'
RV 5'-AAA-ATC-AGC-ACA-CAA-ATC-CAT-TC-3'
- 15 – **H39058**: FW 5'-CTT-GTG-GAG-TCT-TCC-TTT-ATT-CTT-G-3'
RV 5'-CAC-AGT-GTT-ACA-TCC-ATT-CTC-CAT-A-3'
- 16 – **R63530**: FW 5'-TAA-TAA-TAT-CCC-AGT-ATT-GGT-TGG-G-3'
RV 5'-CAC-AGA-TGC-ATT-TCA-ATA-GTT-TAA-CA-3'
- 17 – **W60704**: FW 5'-AGA-TCG-GCC-CAT-GAA-AAC-TT-3'
RV 5'-TAG-ATT-GAG-GGG-CTG-GAA-TG-3'
- 18 – **H05902**: FW 5'-GAG-AGA-GTC-CCC-ATC-CTT-CC-3'
RV 5'-ACT-TTG-CTG-TCT-GGC-TTG-CT-3'
- 19 – **N36818**: FW 5'-ATT-ACA-GCC-TGC-AGG-ACA-CC-3'
RV 5'-GCC-CCT-TTC-ACA-TCA-AAG-AA-3'

11 - MAPEAMENTO GÊNICO

Para determinarmos a localização da EST H70732 no genoma, utilizamos um painel de híbridos Radiation Hybrids (Research Genetics).

Os RH são intrinsecamente células somáticas híbridas. Cada RH é uma linhagem celular clonal de uma célula de roedor (normalmente Hamster) contendo pedaços de um cromossomo humano específico. Os fragmentos de cromossomos humanos são gerados por irradiação X letal de uma célula de linhagem celular de roedor doadora, contendo um único cromossomo humano e são subsequentemente recuperados por fusão a uma linhagem celular roedora puramente recipiente (Cox *et al.*, 1990). Assume-se que os fragmentos de cromossomo humano sejam translocados para dentro do DNA roedor, embora alguns fragmentos centricos possam segregar individualmente. O painel usado por nós foi o de média resolução Stanford G3 panel of 83 RH clones de todo o genoma humano, criado pela Stanford Human Genome Center. O painel G3DNA serve para identificar marcadores nas regiões de interesse e para estabelecer distâncias entre esses marcadores. O servidor para a localização cromossômica dos marcadores usando o painel G3 é disponível na URL: (<http://www-shgc.stanford.edu>) (Stewart. *et al*(1997)

Em uma primeira etapa realizamos uma reação de PCR controle, visando determinar em qual painel nosso gene se encontrava, se no de média ou de alta resolução (G3A3 – célula de hamster não irradiado; G3RM – linhagem celular linfoblastóide humana); HFL - humano; A23 - (hamster), figura-35. Ao se determinar em qual painel o gene se encontrava, foi feita nova reação de PCR, agora com todos os híbridos do painel, isto é, com todos os 83 clones RH. A reação de PCR foi a seguinte:

Reagentes	Volumes
<i>Taq</i> DNA polimerase(5u/μl) (GiBCO-BRL)	0.5μl
Tampão 10x *(GiBCO-BRL)	5.0μl
MgCl ₂ (50mM/GiBCO-BRL)	1.5μl
CDNA	1.0μl

dNTP's (1.25mM)	1.0µl
Oligo 3' (20pM/µl)	1.0µl
Oligo5' (20pM/µl)	1.0µl
Água	39.0µl
Volume Final	50µl

*Tampão 10 x para PCR [200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]

Essa mistura de reação foi submetida aos seguintes passos de ciclagem: Um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 2 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 69°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, seguidos de 2 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 65°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, terminando com 25 ciclo de 94°C por 30 segundos, pareamento a 62°C por 5 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos.

Para a visualização dos produtos gerados por essa reação de PCR foi utilizado um gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo (Figura 36). De acordo com o que se observava no gel com relação ao clone de 1 a 83 que sofreram amplificação ou não, foi elaborado um gabarito. Nesse gabarito o clone amplificado recebia a notação “1” e o não amplificado a notação “0”, como no exemplo: 100011110000....e assim por diante. Esse gabarito foi enviado para o endereço <http://shgc-www.stanford.edu/RH/rhserverformnew.html>, do “RH server”, que mediante esse gabarito nos forneceu os marcadores presentes nesse gene analisado, o que nos possibilitou localizar em qual cromossomo ele se encontra.

12 – COMPARAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE AFFYMETRIX EM TECIDO DE CÓLON NORMAL E TUMORAL.

Ao tomar contato com os dados gerados pelo grupo de Levine (Alon *et al.*, 1999) em tecido tumoral e normal de cólon, através da técnica Affymetrix, decidimos contrastar nossos resultados de GDA aos deles. Para isso, desenhamos um programa simples para comparação de seqüências na linguagem UNIX (contamos com a ajuda do Dr. Paulo de Oliveira do laboratório de bioinformática desta mesma instituição). Seleccionamos os

clones diferencialmente expressos que apresentavam uma diferença de expressão maior que 5, segundo os critérios da própria Incyte Genomics, em cada uma de nossas análises. E através de um “home page” fornecida pelos autores na publicação (Alon., *et al.*, 1999), conseguimos obter os números de acesso ao GeneBank das 2000 seqüências diferencialmente expressas.

13 – COMPARAÇÃO COM PROJETO PILOTO DE MAMA.

Contando com ajuda do laboratório de bioinformática desta instituição desenhamos um programa para comparação de seqüências na linguagem UNIX, também para compararmos nossos resultados aqueles obtidos pelo projeto piloto de mama, o qual faz parte do projeto de câncer conduzido pelas instituições Ludwig/Fapesp.

14– DESENHO DE OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES PARA O CONTIG H70732-N73523

Ao identificarmos pelas análises ao banco de dados do UNIGENE-NCBI três seqüências depositadas para a EST-H70732 (H70732 5' read (3,8kb); AI032740 3' read (0.7kb) e N73523 3'), decidimos formar “contigs” entre elas e dessa forma desenhar oligonucleotídeos que amplificassem um fragmento maior dessa EST. Com esse produto amplificado e os demais oligonucleotídeos realizamos experimentos de “nested-PCR” nos produtos de Marathon obtidos, visando especificar ainda mais os produtos e assim completar a seqüência para esse gene.

>H70732-N73523

H70732-5'

H70732-5'-2

5'GAGGCCTTCTAATGAGAACTAGTACGGCTTTCAAAGCTCTGACCTCACAT
ATCTA

H70732-5'-3

ATAGGGCAAGCAAAATGGAAAGACAGCGTATACTTGGGGGCAGTGAGTGGG
CCTC
AAAGAAGTGGCAAAGGCAGGGCCCTCAGGCTGGGGTGTTGAGGAAGTCCTA
GATG

ACAATCGTATAATACATTCATATAAAGACAGAGCAATAGCAACATGTCC
TCAGCCTT

H70732-3'

ACAAAAGGAACTTAAACGTGAAATTTTCTT **CGAAATTAATCTCTGSCAAGCT**
CAGT
AAATTGCTTTATTTTAAAGATGTTAAAATTAAAATAACCTTTCCCGATCTCCT
ACTTCCTCCCTTCCCCAAAAACAACCTTTTATAGGTAAAGGAAATAATTCAAC
AAAAATATACAGAACTATTTAAACGTGCAGAGAAAAGATAAGAACTGCTG
CTACGAAAGAGAG
CAAGAGATGGAGAGGAGAACGTGTGATAGGGCTGGCTACTGAGAATAGGCA
AGAA

H70732-3'-2

AAAGAATAATTTAGATGAGAATATGTAT **TGAGGATATATAAATGGCAAAATGG**
ATACAGT-3'

Os segmentos de seqüências destacados em cor azul correspondem aos oligonucleotídeos descritos H70732-5'e H70732-3', inicialmente usados. Os segmentos em cor amarela correspondem às seqüências dos novos oligos desenhados por nós para esse contig H70732-N73523: H70732-5'-2, H70732-5'-3 e H70732-3'-2, e que amplificam para um produto de 189pb, 234pb, 265pb, 400pb e 600pb, dependendo da combinação usada entre os iniciadores 3'e 5' desenhados para esta EST.

15- COMPARAÇÃO COM DADOS PRESENTES NA HOMEPAGE DE SAGE.

As informações em bibliotecas de SAGE e acesso aos dados produzidos nessas bibliotecas podem ser vistas e analisadas através de vários instrumentos on-line via xProfiler e Northern Virtual ao acessarmos o sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>. De posse da seqüência de nossos clones que mostraram-se presentes em pelo menos uma de nossas análises e presente também nas análises de "affymetrix", procedemos a um Northern Virtual na homepage contra os dados de SAGE.

16 – HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA MULTIPLE TISSUE EXPRESSION ARRAY (CLONTECH) COM SONDAS DE OLIGOPHRENIN-1.

The Multiple tissue expression Array (Clontech, Inc) é uma membrana de nylon carregada positivamente a qual poly A⁺ RNAs de diferentes tecidos humanos e linhagens celulares de câncer normalizadas são imobilizadas em “dots” separados em meio a vários controles. Os procedimentos de marcação de sonda e hibridização foram os mesmo já descritos em materiais e métodos, onde procedemos à marcação radioativa através do kit rediprime™II (random prime labelling system-amersham pharmacia biotech) e hibridização feita segundo os protocolos tradicionais encontrados em Maniatis *et al.*, 1987.

Para este procedimento, foi necessário o desenho de novos oligonucleotídeos iniciadores para o gene *Oligophrenin1*:

OLIGOS PARA OLIGOPHRENIN-1:

PHRE-Fw: 5'- TTA-AAA-GCC-TTG-GCC-TCA-GA-3'

PHRE-Rv: 5'-GCA-AAC-ATG-AAG-CAG-CAG-TG-3'

O produto da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores acima e os fragmentos após purificação para marcação e hibridização da membrana Multiple tissue expression array podem ser vistos na figura 48.

VI – RESULTADOS

O início do desenvolvimento deste projeto foi com a padronização da técnica de RAP-PCR (RNA arbitrarily Primed-PCR (Welsh *et al.*, 1991; Welsh & McClelland, 1992). Nós testamos dois métodos para extração de mRNA em amostras de carcinoma colorctal testes, o kit MicroFast-Track da Invitrogen e o QuickPrep®Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech), os dois métodos se mostraram eficientes para obtenção de mRNA com bom rendimento, optamos por usar o último. Para a síntese do cDNA e amplificação do cDNA para obtenção dos perfis de bandas do RAP-PCR escolhemos aleatoriamente sete oligonucleotídeos que variavam de 15 a 20 nucleotídeos cada. Todos os perfis gerados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, que se prestou muito bem para os objetivos da padronização, fornecendo um resultado imediato a ser trabalhado. Contudo não insistimos nesse método, pois a reprodutibilidade das bandas obtidas nos perfis gerados entre os diferentes experimentos realizados com ele foi muito baixa durante o período de padronização do método. Devido a essas limitações técnicas encontradas e por nos ter sido apresentada uma nova metodologia aparentemente melhor, optamos então por testar a técnica de “Differential Display” (D.D.) descrita e usada neste trabalho.

Isto se deveu também a um problema de degradação do material biológico armazenado no antigo banco de tumores do ILPC de onde eram provenientes as primeiras amostras usadas. Detectamos uma demora excessiva entre o período de retirada da peça tumoral do paciente, a análise pelo patologista e seu armazenamento. A partir da constatação desse problema, a metodologia de coleta e armazenamento passou a ser reformulada.

A) PARA OS EXPERIMENTOS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM CÂNCER COLORETAL COM A TÉCNICA DE "DIFFERENTIAL DISPLAY".

1 - MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Depois de selecionadas do banco de tumor do ILPC, as amostras de tumores colorctais descritas em Material e Métodos para os experimentos com "Differential Display", procedemos as microdissecções das mesmas pela técnica descrita anteriormente.

A figura 11 exhibe microdissecções dos cortes histológicos feitos a partir de uma das amostras de tumores colorctais estudadas. Em (A) vê-se a amostra não microdissecada, indicada, pela seta, a parte correspondente ao tecido normal, mais especificamente, a mucosa normal, a seta à direita indica a área correspondente ao tecido tumoral, em (B) vê-se a área tumoral já microdissecada e pronta para ser raspada da lâmina com bisturi estéril e ter seu RNA processado, em (C) a mucosa normal desse tumor totalmente isolada e pronta para ser descartada da lâmina. Com esta metodologia estimamos ter cerca de 85% de material tumoral livre de tecido normal contaminante.

2 - AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DO cDNA DAS AMOSTRAS DE TUMOR MICRODISSECADAS (DIFFERENTIAL DISPLAY).

Depois de extraído os RNAs das amostras microdissecadas e feito o tratamento das mesmas com DNase-RNase free, foi feita uma amplificação das amostras CON186 (tecido de cólon normal); COT186 (tumor de cólon mutado no códon 175-exon 5), COT158 (tumor de cólon sem alteração no gene *p53*) e COT203 (tumor de cólon com mutação no códon 234-exon 7). A princípio foram usadas apenas essas amostras a título de padronização da técnica e perfil de bandas conseguidas. O oligo dt₁₁VT Foi utilizado na síntese do cDNA de cada uma das amostras. Para a amplificação foram feitas combinações desse mesmo oligo dt₁₁VT com os outros três oligos aleatórios (Ldd1, Ldd2 e Ltk3). O produto dessa amplificação marcada com isótopo radioativo α dCTP³² foi então resolvido em um gel de poliacrilamida 6% desnaturante eletroforado por cerca de 4 horas e exposto contra um filme de raios-X por 12 horas. A Figura 12 mostra o perfil de bandas conseguido desse experimento de "Differential Display". De 1 a 4, podemos ver

as amostras CON186 (amostra de tecido de cólon normal), COT186, COT158 e COT203 (amostra de tecido de cólon tumoral) amplificadas com o oligo dT₁₁VT combinado com o oligo Ldd1. Nas canaletas de 5 a 8, as mesmas amostras amplificadas com o oligo Ldd2 e de 9 a 12 com o oligo Ldd3, ambos combinados com o mesmo oligo dT₁₁VT. Na canaleta 13 foi aplicado o controle de DNA genômico, o qual não apresentou nenhuma banda. Indicadas pelas setas em cada uma das canaletas estão as bandas que se mostraram provavelmente diferencialmente expressas entre as amostras analisadas e que foram escolhidas para serem excisadas do gel, clonadas e seqüenciadas. É possível observar nessa foto um rastro no gel atrás das bandas, isso foi provavelmente devido à concentração de oligodT testada (25mM), pois quando diminuimos essa concentração para 2,5mM, o rastro diminuiu sensivelmente (dado não mostrado). Fato este que impediu uma boa imagem do gel para a foto.

A Figura 13 mostra o perfil de bandas conseguido em outro experimento de "Differential Display" com as mesmas amostras utilizadas no experimento acima eletroforadas ao lado das amostras CON193 (tecido de cólon normal), COT193 (tumor de cólon mutado no códon 175, exon 5 do gene *p53*), COT183 (tumor de cólon com mutação no códon 114, exon 4 do gene *p53*), COT173 (tumor de cólon sem alteração no gene *p53*). De 1 a 8, podemos ver as amostras CON186, COT186, COT158 e COT203 CON193, COT193, COT183 e COT173, amplificadas com o oligo dT₁₁VT combinado com o oligo Ldd1, nas canaletas de 9 a 16, as mesmas amostras amplificadas com o oligo Ldd2 e de 17 a 24 com o oligo Ltk3, ambos combinados com o mesmo oligo dt. Na canaleta 25 foi aplicado o controle de DNA genômico, que neste caso apresentou algumas bandas, o que é preocupante, pois indica a dificuldade de obter resultados confiáveis, livres desse tipo de contaminação quando usamos essa técnica.

Neste experimento acima a síntese do cDNA foi feita com apenas 100ng de cada RNA, na tentativa de nos livrarmos de problemas na amplificação, sejam eles, fraca amplificação dos cDNAs (resolvido para algumas amostras) e rastros que admitíamos que pudessem ser causados por excesso de cDNA na mistura de reação (não resolvido).

3 - RECUPERAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DAS BANDAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DO GEL DE "DIFFERENTIAL DISPLAY".

A figura 14 mostra a reexposição em filme de raio x, do gel mostrado na figura 12, após terem sido extraídas as bandas de interesse. Indicadas pelas setas estão os locais onde se encontravam as bandas, indicando que provavelmente tenha havido total extração das mesmas.

Todos os procedimentos de eluição das bandas e amplificação foram feitos como descritos em material e métodos, as figura 15 e 16 exibem os produtos da reamplificação das bandas extraídas, eluídas e eletroforados em gel de agarose 1% corados por brometo de etídeo, onde podemos ver produtos com pesos moleculares que variam de 100 a 1300 pares de bases. O índice de amplificação dos DNAs das bandas recuperadas foi de 100% com o uso do oligo Ldd1, com os oligos Ldd2 e Ldd3 foi de 50% foi necessário adequar diluições do produto eluído para as reações de PCR.

4 - CLONAGEM DOS DNAs AMPLIFICADOS DAS BANDAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM VETOR *pUC 18*.

O produto da amplificação com os oligos Ldd1 foram eletroforados em gel de agarose 1% e purificado em membranas DEAE como descrito em material e métodos. Todos os fragmentos foram ligados em vetor *pUC 18* (SureClone Ligation kit). As ligações foram bem sucedidas e avaliadas através da reação de PCR com oligos franqueadores da região de inserção dos fragmentos ligados no vetor e eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (a coloração e foto não ficaram muito boas, por isso não foram mostradas) (Sanguinette *et al.*, 1994). Estas ligações foram usadas para transformar as bactérias *DH5- α* como descrito em material e métodos.

5 - SELEÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES DE CDNAS DAS AMOSTRAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

Cinco clones bacterianos de cada uma das 15 amostras clonadas foram sequenciados. 50 seqüências deram uma boa leitura, sendo possível localizar o "polilinker" de *pUC 18* e os oligos usados na reamplificação de cada fragmento

(OligodT₁₁VT e Ldd1). As outras 25 restantes não apresentaram um bom resultado para as análises. O “screening” dos clones bacterianos foi feito por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para pUC. O produto da reação de PCR foi resolvido em gel de poliacrilamida corado pela prata e pode ser visualizado na figura 17, com um pouco de distorção do gel. Em uma única amostra (correspondente a uma banda recuperada do gel) cada uma das cinco seqüências analisadas se mostraram diferentes umas das outras nas suas seqüência nucleotídicas e quando analisadas pela ferramenta Blast do NCBI . Na tabela 5 estão alguns exemplos dos clones seqüenciados e analisados em blast.

Figura-11: (a) Corte histológico com tecido tumoral não microdissecado, seta à esquerda mostra a mucosa normal, a seta à direita indica a massa tumoral (B) tecido tumoral microdissecado usado para a extração do RNA para síntese de cDNA e análise por D.D. (C) mucosa normal microdissecada e posteriormente descartada da lâmina.

Figura-12: "Differential Display"-PCR radioativo de mRNA de tecido normal de cólon microdissecado (CON186), tumor de cólon microdissecado mutado no códon 175 (COT186), tumor de cólon microdissecado não alterado (COT158) e tumor de cólon microdissecado mutado no códon 234 (COT203). Foram transcritos reversamente com o oligo dT₁₁VT, amplificadas com os oligos aleatórios Ldd1, Ldd2 e Ltk3 mostrados no topo da figura. Perfis de bandas resolvidos em gel de sequenciamento 6% exposto contra um filme de raios-X, indicados pelas setas estão os fragmentos de cDNA provavelmente diferencialmente expressos.

Figura-13: "Differential Display"-PCR radioativo de mRNA de tecidos normais de cólon microdissecado (CON186 e CON193), tumor de cólon microdissecado mutado no códon 175 (COT186 e COT193), tumor de cólon microdissecado não alterado (COT158 e COT173) e tumor de cólon microdissecado mutado no códon 234 (COT203) e códon 114 (COT183). Os mRNAs foram transcritos reversamente com o oligo dT11VT e amplificados com os oligos aleatórios Ldd1, Ldd2 e Ltk3 mostrados no topo da figura. Perfis de bandas resolvidos em gel de sequenciamento 6% exposto contra um filme de raio - x.

Figura-14: "Differential Display"-PCR radioativo de mRNA de tecido normal de cólon microdissecado (CON186), tumor de cólon microdissecado mutado no códon 175 (COT186), tumor de cólon microdissecado não alterado (COT158) e tumor de cólon microdissecado mutado no códon 234 (COT203). Os mRNAs foram transcritos reversamente com o oligo dT₁₁VT, e amplificados com os oligos aleatórios Ldd1, Ldd2 e Ltk3 mostrados no topo da figura. Perfis de bandas resolvidos em gel de sequenciamento 6% exposto contra um filme de raio-x, indicadas pelas setas e números estão os espaços correspondes as bandas recuperadas do gel.

Figura 15: PCR da re-amplificação dos fragmentos de cDNA eluidos da D.D.-PCR. Dois microlitros da banda recuperada e eluída foram usados como molde para a reamplificação com os mesmos conjuntos de oligos usados para os experimentos de DD-PCR (Oligo dT₁₁VT e Ldd1). Cinco microlitros dos produtos reamplificados foram resolvidos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Acima de cada canaleta estão os nomes das bandas correspondentes a cada amostra reamplificada do cDNA recuperado e eluído. Na primeira canaleta à esquerda encontra-se o marcador de peso molecular 100bp (GIBCO-BRL).

Figura 16: PCR da re-amplificação dos fragmentos de cDNA eluídos da D.D.-PCR. Dois microlitros da banda recuperada e eluída foram usadas como molde para a reamplificação com os mesmos conjuntos de oligos usados para os experimentos de DD-PCR (Oligo dT11VT e Ldd1). Cinco microlitros dos produtos reamplificados foram resolvidos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Acima de cada canaleta estão os nomes das bandas correspondentes a cada amostra reamplificada do cDNA recuperado e eluído. O controle para contaminação é uma reação de PCR sem adição de DNA. Na primeira canaleta à esquerda encontra-se o marcador de peso molecular 100bp (GIBCO-BRL).

A)

B)

Figura17: Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, com o produto da PCR de "screening" de alguns clones representativos dos fragmentos diferencialmente expressos clonados em vetor pUC18. No gel A, estão os clones das amostra CON186 (100pb) e no gel B, COT186 (100pb), Em ambos os géis verifica-se da esquerda para a direita (1) o marcador de peso molecular (100bp-GIBCO-BRL), seguido do pUC18 linearizado (2) (114pb) e dos clones amplificados com os oligos flanqueadores para a região de clonagem no vetor pUC18: 5,6 e7 no gel A e 4,5,6 e 7 no gel B, todos com produtos em torno de 214pb. Na canaleta está o controle negativo da reação de PCR, o "no-DNA".

AMOSTRA	CLONE	SEQUÊNCIA
COT186-3	1	Caenorhabdits elegans cosmid T05H10
	2	X.laevis mitochondrial origin of replication.
	3	Homo sapiens cDNA clone 36356 3'
	4	Human chromossome 3p14.2 fragile site FRA3B
	5	Homo sapiens (clone PMT2-Human1B) alpha-1B
COT186-4	1	Human DNA sequence from PAC 37M17 Chromosome X
	2	Human chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A
	3	Human mRNA for KIAA0180 gene, partial cds
	4	Human apolipoprotein B-100 (APOB) gene, exon 4
	5	Human DNA sequence from PAC 326L13
CON186-4	1	H.sapiens mRNA for glutaminyl-tRNA synthetase
	2	Human Bac clone RG013L03 from 7Q21.
	3	Homo sapiens (clone PMT2-Human1B) alpha-1B
	4	Human DNA sequence from cosmid U42H12
	5	H.sapiens chrom. 5, P1 clone 282D12 ("ALU!!!")
CON186-5	1	H. sapiens (subclone 1 E12 from P1 H20) DNA seq
	2	Human DNA seq.from cosmid CU115G11.
	3	Human V Beta T-cell receptor (TCRBV) gene
	4	H.sapiens H2A/k gene
	5	H. sapiens intestinal mucin (MUC2) gene
COT158-4	1	Chilli vein-banding mottle virus coat prot. Gene
	2	Human DNA sequence from PAC154k9, similar to protein phosphatase inhibitor 2
	3	H.sapiens cDNA clone similar to chromosome XVI reading frame ORF YPL207W
	4	Mouse band 3 anion exchange protein gene
	5	Human GTP cyclohydrase I mRNA, complete cds

Tabela 5- Análise de similaridade em Blast para os fragmentos do gel de DD clonados e sequenciados.

B) PARA OS EXPERIMENTOS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM AS MEMBRANAS GDA (INCYTE GENOMICS)

1 - MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Após selecionarmos do banco de tumor do ILPC, as amostras de tumores coloretais descritas em Material e Métodos para os experimentos com as membranas GDA, procedemos as microdissecções.

Um corte histológico foi feito a partir de cada uma das amostras de tumor coloretais estudadas e foi usado para delimitar na peça tumoral a região de tumor a ser preservada e a região de tecido normal a ser extirpada da peça. A Figura 11 é ainda um bom exemplo para os procedimentos realizados.

2- HIBRIDIZAÇÃO DAS MEMBRANAS GDA 1.2. E GDA 1.3.

No primeiro experimento realizado foram utilizadas membranas do sistema GDA versão 1.2 (18,376 clones de cDNA não redundantes, uso de células hospedeiras SOLR, com mais baixa taxa de crescimento em relação as DH10B, resultando em spots menores, o que ocasionava problemas na perfeita qualidade do controle interno dos filtros, segundo o fabricante). A figura 18 mostra o esquema representativo das análises com as membranas e diferentes misturas de tecidos de cólon e reto normal e tumoral.

Uma das membranas GDA 1.2 foi hibridizada com um cDNA proveniente do pool de 9 tumores coloretais (NIC1) e a outra com o cDNA produzido a partir do RNA do pool dos 9 tecidos normais (NIC2) correspondentes aos tumores. Nós optamos pelo uso de misturas (“pools”) grandes para um teste preliminar na busca de obter resultados mais representativos dos ambientes tumorais. Como poderemos ver pela visualização da hibridização e mesmo pelos dados recebidos em forma de tabelas com valores de “score” e “razão” dos resultados, ocorre o que chamamos de “diluição da expressão gênica” nesse experimento onde utilizamos esse tipo de mistura de tumores. Assim a determinação da diferença de expressão desses genes em tumores individuais fica prejudicada. A Figura 19 mostra a imagem da hibridização deste experimento, onde em A está a membrana

correspondente ao tecido normal e em B a correspondente ao tecido tumoral. É possível observar um padrão de hibridização um tanto esparsa quando comparada às hibridizações posteriores apresentadas na figura 20 e 21, onde estão as hibridizações realizadas com pool de 3 tumores coloretiais (segundo experimento) nas membranas GDA1.2 e GDA1.3 (experimento 3). Na busca de obter níveis de comparações e adequar um número ideal de tumores para o trabalho fizemos o experimento com uma mistura de 3 tumores coloretiais.

Figura 18: Esquema ilustrativo das análises realizadas com as diferentes misturas de tumores e respectivos tecidos normais em membranas GDA 1.2 e GDA 1.3. A análise de concordância realizada entre os experimentos com as membranas GDA 1.2 mostram cerca de 85 a 90 % entre genes com expressão elevada e genes com perda de expressão em tumor, respectivamente.

O segundo experimento foi realizado de forma similar ao primeiro e foi realizado usando agora um pool de 3 tumores coloretiais em membranas GDA1.2 e GDA 1.3 da Incyte Genomics (nova versão com os mesmos 18,376 clones de cDNA não redundantes, as células hospedeiras SOLR foram substituídas devido a sua mais baixa taxa de crescimento em relação as DH10B, resolvendo o problema da qualidade do controle

interno dos filtros). Os clones para a confecção dessas membranas são pegos diretamente das placas do IMAGE e não de replaqueamento das mesmas, (o que requeria um trabalho de identificação de clones individuais mais apurados). A Figura 21 mostra as imagens destas hibridizações feitas em paralelo com os tecidos tumorais (B) e respectivos tecidos normais (A) e a presença de mais pontos “acesos” nesse experimento de hibridização em relação ao mostrado na figura 19. A figura 22 mostra detalhes de uma região das membranas hibridizadas e, apontados pelas setas, estão alguns clones que se mostraram diferencialmente expressos.

O pool de 3 tumores rendeu uma quantidade de poli A⁺ suficiente para que fosse dividido ao meio e com ele fossem feitos dois experimentos. Um como descrito acima e outro no qual seu cDNA foi hibridizado contra as membranas GDA 1.2 usadas anteriormente para a obtenção de resultados para os experimentos de expressão diferencial de genes. Neste experimento foram testadas a sua reutilização e perda de clones durante os processos de lavagem das mesmas (experimento 2 – NIC1/NIC2). Tais membranas somente foram re-hibridizadas após total certeza de que estavam livres do sinal da hibridização anterior (Figura 20).

Quando comparamos os resultados dos primeiros clones analisados das membranas hibridizadas com o pool de 9 tumores (NIC1) com os resultados das membranas hibridizadas com o pool de 3 tumores coloretais (NICBT) observamos uma reprodutibilidade entre eles, diferindo apenas com relação ao “score” e “ratio” apresentado por eles. O clone número 1, cujo acesso no GenBank é WO1911 (EST), apresenta a razão de 292,00 na membrana NIC1 e aparece na membrana NICBT como o quinto mais expresso, com a razão de 999,999; o segundo clone mais expresso na membrana NIC1, cujo acesso no GenBank é H16042 (similar a IG kappa chain precursor V-III region - human), e razão de 11.700, aparece como o trigésimo terceiro clone mais expresso na membrana NICBT, com uma razão de 999,999; e o quarto clone em expressão na membrana NIC1, cujo acesso é H79188 (similar a rna1 DNA-repair protein complementing XP-D cells –human), com a razão de 67,100 aparece na vigésima oitava posição na membrana NICBT, com uma razão de 999,999. O clone R15958 (Serine/treonine-protein kinase receptor R1 precursor) que figura como o sétimo gene em

expressão em NIC1 com uma razão de 36,100 aparece como o 1987º genes expresso em NICBT com um razão de 48,468.

Ao compararmos as membranas NIC2, hibridizada com o pool de 9 tecidos coloretais normais e NICNAN, hibridizada com o pool de 3 tecidos coloretais normais temos: o terceiro clone mais expresso em NIC2, cujo acesso é R23999 (similar a Perlecan) com uma razão de 106,300 aparecendo como décimo quinto clone mais expresso na membrana NICNAN com uma razão de 531,950; o sétimo mais expresso na membrana NIC2, acesso AA057839 (Stratagene Corneal Stroma), com score igual a 154,70 surge como o décimo quarto na membrana NICNAN, com uma razão de 543,849; e o sétimo clone da membrana NIC2, com uma razão de 30,800 e acesso H70732 (EST) aparece como o primeiro clone mais expresso na membrana NICNAN, com uma razão de 954,869. Isso reforça nossa hipótese sobre a diluição da expressão gênica no experimento NIC1/NIC2 onde foi usada a mistura de 9 tecidos tumorais e respectivos tecidos normais. Nas tabelas 9,10 e 11 estão listados os 100 primeiros genes com diminuição de expressão nas três análises.

A figura 23 apresenta os gráficos de dispersão referentes aos três experimentos realizados com pools tumorais e as duas versões de membranas GDA, bem como o agrupamento das três análises no item D da mesma figura. É possível observar que a grande maioria dos genes, como seria de esperar, mantem-se numa razão média de expressão, sendo poucos os genes que se sobressaem com uma razão de diferença elevada, seja com relação à expressão em tumores (ganho de expressão) ou tecidos normais (perda de expressão). As tabelas 6,7, 8 ,9 10 e 11 mostram, respectivamente, detalhes dos 100 genes que apresentaram maior razão entre os genes com expressão elevada e dos 100 genes com maior razão entre aqueles que apresentaram decréscimo de expressão nas três análises efetuadas com as membranas GDA1.2 e GDA 1.3 com as diferentes misturas de tecidos coloretais.

Figura-19: Imagem digitalizada das hibridizações com a mistura de 9 tumores coloretais e respectivos tecidos normais, em membranas GDA 1.2, Incyte Genomics. (A) corresponde a membrana hibridizada com o cDNA derivado do mRNA do tecido normal e em (B) a membrana hibridizada com a sonda derivada do mRNA proveniente do tecido tumoral. As sondas utilizadas foram sintetizadas na presença do nucleotídeo radioativo α -dCTP³².

Figura 20: Imagem digitalizada das hibridizações com a mistura de 3 tumores coloreticais e respectivos tecidos normais de cólon e reto, em membranas GDA 1.2 da Incyte Genomics. (A), corresponde a membrana hibridizada com a sonda de cDNA do tecido normal e em (B), a membrana hibridizada com a sonda de cDNA sintetizado a partir do mRNA do tecido tumoral. As sondas utilizadas foram sintetizadas na presença do nucleotídeo radioativo α -dCTP³².

FIGURA-21 Imagem digitalizada das hibridizações feitas em paralelo com as misturas de 3 tecidos tumorais em (B) e respectivos tecidos normais em (A) em membranas GDA 1.3 da Incyte Genomics. As sondas utilizadas foram sintetizadas na presença do nucleotídeo radioativo α -dCTP³².

Figura 22: Detalhe das imagens das hibridizações com misturas de 3 tumores coloretais e respectivos tecidos normais de cólon e reto, em membranas GDA 1.3 da Incyte Genomics. (A) corresponde a membrana hibridizada com a sonda de cDNA derivada do mRNA do tecido normal e em (B) a membrana hibridizada com a sonda de cDNA derivada do tecido tumoral. As setas indicam clones que mostram diferença de expressão entre as duas membranas. As sondas utilizadas foram sintetizadas na presença do nucleotídeo radioativo α -dCTP³².

Figura 23 : Gráficos ilustrativos das dispersões. Gráficos elaborados com valores de razão maior que 10.0 para cada análise individual, (A) análise com membrana GDA 1.2 e pool de 9 tumores (NIC1); (B) membrana GDA 1.2 e pool de 3 tumores e tecidos normais (NICBT) e (C) membrana GDA 1.3 e pool de 3 tumores e tecidos normais (TUB15), D mostra o agrupamento das três análises

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	R81942	NA	999,999	Oligophrenin-1
2.	N93218	Hs.76667	999,999	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
3.	R63530	Hs.28426	798,830	ESTs
4.	H03287	Hs.23628	768,150	ESTs, Weakly similar to 3-BETA HYDROXY-5-ENE STEROID DEHYDROGENASE [Vaccinia virus (strain copenhagen)]
5.	W60704	Hs.109957	657,410	ESTs
6.	H05491	Hs.12439	631,310	ESTs
7.	AA040149	Hs.110103	528,030	ESTs
8.	H16830	Hs.21811	503,930	Hypothetical protein FLJ10374
9.	N36818	Hs.75968	497,650	Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds
10.	R54660	Hs.95511	485,490	ESTs
11.	H05902	Hs.87908	467,430	Human mRNA for KIAA0309 gene, partial cds
12.	H58671	NA	390,330	EST
13.	AA054571	NA	389,310	EST
14.	N68286	Hs.109391	388,730	ESTs
15.	R60329	Hs.7859	379,500	ESTs
16.	R49824	Hs.77768	376,510	DNAJ PROTEIN HOMOLOG HSJ1
17.	AA059242	Hs.62548	374,590	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY J WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]
18.	N35025	Hs.44055	354,310	ESTs
19.	AA213651	Hs.269864	342,047	ESTs
20.	T90202	NA	340,200	ESTs
21.	AA035437	NA	338,100	ESTs
22.	W20391	Hs.20830	336,940	Human mRNA for kinesin-related protein, partial cds
23.	T85061	Hs.15840	334,260	ESTs
24.	AA033621	Hs.61658	331,630	ESTs
25.	N92452	Hs.76807	313,070	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DR ALPHA CHAIN PRECURSOR
26.	R40307	NA	308,970	
27.	R31226	Hs.85889	308,350	Coagulation factor II (thrombin) receptor
28.	R02394	Hs.124810	305,500	ESTs
29.	W90026	Hs.48604	304,845	ESTs
30.	R91373	Hs.14039	304,520	ESTs
31.	AA034995	NA	301,980	EST
32.	H01173	Hs.293819	301,020	EST
33.	AA047463	Hs.62880	297,470	ESTs, Highly similar to PUTATIVE GTP-BINDING PROTEIN MOV10 [Mus musculus]
34.	W15154	Hs.14920	296,840	ESTs
35.	T80525	NA	286,520	ESTs
36.	T99541	NA	286,390	ESTs
37.	R73030	Hs.29322	280,950	ESTs
38.	R25120	Hs.209569	271,800	ESTs
39.	N64512	Hs.30348	269,000	ESTs
40.	T95084	Hs.163893	268,080	ESTs

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
41.	AA045614	Hs.37012	265,220	CORTICOSTEROID 11-BETA-DEHYDROGENASE, ISOZYME 1
42.	AA148951	Hs.125086	260,270	ESTs
43.	R46328	Hs.109992	260,230	ESTs
44.	T99615	Hs.304116	259,660	EST
45.	R38095	Hs.119001	258,750	ESTs
46.	H27892	Hs.32356	258,540	Hypothetical protein FLJ20628
47.	H12746	Hs.112180	258,160	Zinc finger protein 148 (pHZ-52)
48.	AA194110	Hs.790	253,320	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MICROSOMAL
49.	R12369	Hs.14770	252,410	ESTs, Weakly similar to AMPHIPHYSIN [H.sapiens]
50.	H13185	Hs.30469	252,000	ESTs
51.	AA011559	Hs.49656	251,780	ESTs
52.	W94896	Hs.20188	251,170	ESTs
53.	H57532	Hs.82127	248,970	Human putative IL-16 protein precursor, mRNA, complete cds
54.	N30007	Hs.75511	245,343	Connective tissue growth factor
55.	W44948	Hs.70390	243,880	MONOCYTE CHEMOTACTIC PROTEIN 3 PRECURSOR
56.	H83983	Hs.83477	243,169	Human non-histone chromosomal protein HMG-14 mRNA, complete cds
57.	AA116102	Hs.69738	239,650	ESTs
58.	N52045	NA	238,430	EST
59.	H27915	Hs.32362	235,950	ESTs
60.	H84824	Hs.10669	232,140	ESTs
61.	R70196	Hs.77886	231,480	LAMIN A
62.	R37612	Hs.77602	228,790	Damage-specific DNA binding protein 2 (48 kD)
63.	R41772	Hs.100878	228,630	ESTs
64.	W88948	Hs.20880	227,870	ESTs, Moderately similar to I78885 serine/threonine-specific protein kinase [H.sapiens]
65.	H47315	Hs.35586	222,820	ESTs
66.	N20172	Hs.44585	222,640	Human Bcl2, p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2) mRNA, complete cds
67.	W84698	NA	222,220	EST
68.	N27864	Hs.111076	222,000	Homo sapiens malate dehydrogenase precursor (MDH) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds
69.	H18526	Hs.20903	221,830	ESTs
70.	N58494	Hs.27	220,970	Glycine cleavage system protein P (glycine decarboxylase)
71.	T79850	Hs.14652	219,200	ESTs
72.	N94625	Hs.82933	218,910	ESTs, Weakly similar to K07F5.14 [C.elegans]
73.	R70249	Hs.1717	218,030	IG KAPPA CHAIN C REGION
74.	W32190	Hs.53263	217,800	ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY SX WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]
75.	W03351	NA	216,700	EST

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
76.	R81831	Hs.115709	215,000	ESTs
77.	N73098	Hs.35650	212,420	Human thymidine kinase 2 (TK2) mRNA,
78.	R07160	Hs.124912	211,120	ESTs
79.	W38180	NA	210,860	EST
80.				ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 39.2 KD PROTEIN IN EGT2-KRE1 INTERGENIC REGION [Saccharomyces cerevisiae]
	R49161	Hs.22353	210,846	
81.	R01220	Hs.19149	210,770	ESTs
82.	T83964	Hs.15400	210,550	ESTs
83.				Human mRNA for KIAA0212 gene, complete cds
	N23299	Hs.78093	208,440	
84.	H80618	Hs.40160	207,130	ESTs
85.	H53073	NA	206,000	ESTs
86.				UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2- CDC34 COMPLEMENTING
	R97935	Hs.76932	205,910	
87.	H14832	NA	205,530	ESTs
88.	AA195455	NA	205,210	ESTs
89.	W90523	Hs.55979	204,460	ESTs
90.	H63546	Hs.76353	204,450	Protein C inhibitor
91.				ESTs, Highly similar to MICROSOMAL SIGNAL PEPTIDASE 21 KD SUBUNIT [Canis familiaris]
	T81080	Hs.68644	204,174	
92.	W58124	Hs.80624	203,880	ESTs
93.	R60904	Hs.21966	202,910	ESTs
94.				ESTs, Highly similar to GLUCOSE TRANSPORTER TYPE 4, INSULIN- RESPONSIVE [Mus musculus]
	R17700	Hs.10574	201,800	
95.				Human MaxiK potassium channel beta subunit mRNA, complete cds
	AA029299	Hs.2417	201,310	
96.				Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 (alpha, 26kD)
	T95797	Hs.78592	201,230	
97.	R54479	Hs.82027	200,740	P PROTEIN
98.	H60543	Hs.37848	200,560	ESTs
99.				Vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)
	AA203641	Hs.2257	200,142	
100.				ESTs, Weakly similar to myotubularin [H.sapiens]
	H93767	Hs.24843	200,120	

Tabela 6 : Relação dos 100 genes mais expressos na análise com membrana GDA 1.3 e misturas de 3 tumores coloretais (Tub15). NA: sem entrada no Unigene.

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	W92068	Hs.58694	999,999	Tripeptidyl peptidase II
2.	W37834		999,999	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
3.	W24544	Hs.89713	999,999	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3)
4.	W21429	Hs.57549	999,999	Immunoglobulin gamma 3 (Gm marker)
5.	W01911		999,999	IG KAPPA CHAIN C REGION
6.	W01642	Hs.2981	999,999	Human transcription factor NFATx mRNA, complete cds
7.	T87461	Hs.332669	999,999	Human phospholipase c delta 1 mRNA, complete cds
8.	T86803	Hs.16268	999,999	Human mRNA for KIAA0153 gene, partial cds
9.	T85524	NA	999,999	EST
10.	T84846	Hs.80776	999,999	Glutathione S-transferase M2 (muscle)
11.	T74081	Hs.134249	999,999	ESTs, Weakly similar to CHOLINE KINASE R1/R2 [Rattus norvegicus]
12.	T52737	Hs.119436	999,999	ESTs, Highly similar to inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 [H.sapiens]
13.	R92111	NA	999,999	ESTs
14.	R88553	Hs.73974	999,999	ESTs, Highly similar to MKR2 PROTEIN [Mus musculus]
15.	R60600	Hs.76294	999,999	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)
16.	R48921	Hs.15088	999,999	ESTs
17.	R47867	Hs.165636	999,999	Hypothetical protein DKFZp761C07121
18.	R35191	Hs.85752	999,999	ESTs
19.	R18265	Hs.91662	999,999	KIAA0888 protein
20.	R14667	Hs.300680	999,999	ESTs
21.	R00411	N.A	999,999	ESTs
22.	N92090	Hs.105461	999,999	Hypothetical protein FLJ20357s
23.	N92026	NA	999,999	EST
24.	N80091	Hs.44877	999,999	ESTs
25.	N78169	Hs.18104	999,999	ESTs
26.	N64116	Hs.24624	999,999	ESTs
27.	N59240	Hs.140	999,999	ESTs
28.	H79188	Hs.99987	999,999	ERCC2
29.	H78732	Hs.39943	999,999	ESTs
30.	H45010	Hs.173274	999,999	Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1
31.	H18766	Hs.86126	999,999	ESTs
32.	H16237	Hs.29419	999,999	ESTs
33.	H16042	Hs.1717	999,999	ESTs
34.	AA181793	Hs.1117	999,999	ESTs
35.	AA100388	Hs.7068	999,999	ESTs
36.	AA084632	Hs.1592	999,999	ESTs
37.	AA074240	Hs.82563	999,999	ESTs
38.	AA071352	Hs.343862	999,999	ESTs, Highly similar to UQHU polyubiquitin 9 [H.sapiens]
39.	AA045130	Hs.343154	999,999	ESTs, Similar to hypothetical protein FLJ10761
40.	R53720	Hs.15657	995,040	ESTs

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
41.	H20644	NA	983,810	EST
42.	T83266	Hs.100090	980,840	Human globin gene
43.	T81238	NA	973,150	EST
44.	H06620	NA	969,890	EST
45.	N80358	NA	967,280	EST
46.	R48730	Hs.89603	962,290	Mucin 1, transmembrane
47.	T95573	Hs.77617	957,640	Nuclear antigen Sp100
48.	T47504	NA	942,840	EST
49.	R37545	Hs.77628	934,600	Homo sapiens mRNA for CAB1, complete cds
50.	H15198	Hs.12068	922,180	Carnitine acetyltransferase
51.	T75386	NA	915,910	EST
52.	AA026960	NA	906,540	EST
53.	T77390	Hs.6421	905,620	Homo sapiens clone 23582 mRNA sequence
54.	AA084315	Hs.71346	894,330	Human gene for neurofilament subunit M (NF-M)
55.	N29013	Hs.46230	893,500	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL MYELOID CELL LINE PROTEIN 3 [Homo sapiens]
56.	T65470	Hs.12815	890,050	ESTs
57.	T65358	Hs.85044	881,860	ESTs
58.	N49032	Hs.118618	879,460	Antigen identified by monoclonal antibodies 12E7, F21 and O13
59.	H29534	Hs.22248	872,990	ESTs
60.	N47774	Hs.21371	871,440	ESTs, Highly similar to guanine nucleotide exchange factor [H.sapiens]
61.	T80079	NA	869,860	EST
62.	AA046587	NA	868,780	EST
63.	W33065		866,740	ESR
64.	W31807	Hs.64783	861,280	ESTs, Weakly similar to ZC518.3 [C.elegans]
65.	R13205	Hs.77858	856,320	H.sapiens mRNA for Mox-2
66.	R54764	Hs.26204	851,700	ESTs
67.	T90266		846,250	EST
68.	R91253	Hs.34395	838,630	ESTs
69.	H85723	Hs.30909	838,500	Homo sapiens KIAA0430 mRNA, complete cds
70.	R61123		833,740	EST
71.	H45009		830,840	EST
72.	R13820	Hs.77225	828,100	Human mRNA for KIAA0177 gene, partial cds
73.	N57437	Hs.44041	822,990	EST
74.	N30164	NA	821,360	EST
75.	R16936	Hs.20097	807,710	ESTs
76.	W00930	Hs.22338	806,520	ESTs
77.	H20622	Hs.82932	799,820	Cyclin D1 (PRAD1; parathyroid adenomatosis 1)
78.	R35157	Hs.89979	798,890	Diacylglycerol kinase delta
79.	H73039	Hs.37180	788,120	AH-receptor
80.	N99837	Hs.109425	782,570	ESTs
81.	H95300	Hs.76506	782,260	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
82.	H49697		771,660	EST

Colocação	GenBank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
83.	AA031852	Hs.80919	767,220	Pantophysin [human, keratinocyte line HaCaT, mRNA, 2106 nt]
84.	R34402	Hs.119311	765,340	ESTs
85.	H83982	Hs.83477	764,840	Human non-histone chromosomal protein HMG-14 mRNA, complete cds
86.	R72315	Hs.99785	762,250	ESTs
87.	R13050	Hs.6479	759,530	ESTs, Weakly similar to Sxm1p [S.cerevisiae]
88.	R74405	Hs.29407	754,680	ESTs
89.	N34072	Hs.74471	751,910	Cardiac gap junction protein
90.	AA074032	Hs.83848	734,030	Triosephosphate isomerase 1
91.	H95314	Hs.42053	732,130	ESTs, Moderately similar to MAD PROTEIN [H.sapiens]
92.	N39937	Hs.77917	721,650	UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE ISOZYME L3
93.	R80475	Hs.748	712,670	Basic fibroblast growth factor (bFGF) receptor (shorter form)
94.	R11999	Hs.7270	711,960	ESTs
95.	T77423	Hs.12523	710,900	Human clone 23898 unknown mRNA, partial cds
96.	H83817	Hs.106475	707,030	Homo sapiens katanin p80 subunit mRNA, complete cds
97.	H79184	Hs.76925	700,860	Hypothetical protein FLJ14981
98.	T64843	Hs.12588	698,230	ESTs
99.	T75564	Hs.1890	697,470	Human mRNA for receptor of retinoic acid
100.	R63640	Hs.77554	696,010	ESTs

Tabela 7 : Relação dos 100 genes mais expressos na análise com membrana GDA 1.2 e misturas de 3 tumores coloretiais (Nicbt). N.A.: sem entrada no Unigene.

Colocação	GENBANK	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	W01911	NA	292,000	EST
2.	H16042	Hs.156110	111,700	immunoglobulin kappa constant
3.	AA100388	Hs.285286	76,100	ESTs, Moderately similar to A49873 inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 - human [H.sapiens]
4.	H79188	Hs.99987	67,100	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)
5.	H18766	Hs.86126	60,200	ESTs
6.	W01642	Hs.192861	51,600	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
7.	R15958	Hs.150402	36,100	activin A receptor, type I
8.	H45773	Hs.181062	34,600	serum amyloid A1
9.	H21568	Hs.141475	34,200	ESTs, Moderately similar to ALU1_HUMAN ALU SUBFAMILY J SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY [H.sapiens]
10.	T93230	NA	34,100	EST
11.	R20135	Hs.22897	33,200	Homo sapiens cDNA FLJ11749 fis, clone HEMBA1005558, weakly similar to NUCLEAR PROTEIN SNF7
12.	H50023	Hs.113994	33,200	Homo sapiens cDNA FLJ20796 fis, clone COL00301
13.	R80342	Hs.29928	30,800	
14.	H66535	Hs.75573	30,300	centromere protein E (312kD)
15.	T78546	NA	30,100	EST
16.	W90692	Hs.59346	29,600	hypothetical protein FLJ10514
17.	AA069031	Hs.9614	28,600	ESTs, Weakly similar to Ps 2=basic proline-rich protein(PRB1L precursor protein=basic proline-rich proteins [H.sapiens]
18.	AA070426		27,700	
19.	H66198		27,500	
20.	W67965	Hs.289088	27,100	heat shock 90kD protein 1, alpha
21.	T54422	Hs.9736	26,900	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3
22.	R53678	Hs.184779	26,000	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B1922 (from clone DKFZp586B1922)
23.	AA112466	Hs.130849	25,800	Homo sapiens cDNA: FLJ22315 fis, clone HRC05256
24.	H52746	Hs.113205	25,700	cytochrome c oxidase subunit IV
25.	H70584	Hs.215766	25,500	GTP-binding protein
26.	N50965	Hs.47152	25,300	ESTs, Weakly similar to testicular tektin B1-like protein [H.sapiens]
27.	R74161	Hs.771	25,100	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)
28.	AA002135	Hs.2253	24,200	complement component 2
29.	AA126109	Hs.24815	23,700	2'-5'oligoadenylate synthetase 2
30.	H87311	Hs.59544	23,300	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
31.	H70162	Hs.114253	23,200	EST
32.	AA078915	NA	23,200	EST
33.	AA071099	Hs.177469	22,900	ESTs

Colocação	GENBANK	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
34.	H49806	Hs.274260	22,700	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6
35.	N28517	Hs.2969	22,400	v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog
36.	T60294	Hs.94360	22,000	EST
37.	R56760	Hs.202130	22,000	ESTs
38.	H14441	NA	21,900	EST
39.	N90836	Hs.89764	21,800	fragile X mental retardation 1
40.	N32681	Hs.102267	21,800	lysyl oxidase
41.	AA009869	Hs.37427	21,700	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)
42.	R71723	Hs.79410	21,400	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2 (erythrocyte membrane protein band 3-like 1)
43.	R20019	NA	21,200	EST
44.	R62320	Hs.44743	21,100	KIAA1435 protein
45.	R46282	NA	21,000	EST
46.	R74157	Hs.106876	20,900	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), member D
47.	H01674	NA	20,800	EST
48.	H98046	Hs.138593	20,600	5'-nucleotidase (purine), cytosolic type B
49.	N41573	Hs.23255	20,300	nucleoporin 155kD
50.	N30514	Hs.90011	20,100	adenylosuccinate synthase
51.	R82287	Hs.142111	19,900	ESTs
52.	H28503	Hs.111730	19,900	Homo sapiens cDNA FLJ11946 fis, clone HEMBB1000709
53.	N77133	Hs.22590	19,800	ESTs
54.	H38676	Hs.151641	19,800	glycoprotein A repetitions predominant
55.	T87281	Hs.16355	19,600	EST
56.	R90798	NA	19,600	EST
57.	AA054203	Hs.30209	19,600	KIAA0854 protein
58.	R56663	NA	19,500	EST
59.	H94177	Hs.181163	19,400	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 17
60.	AA085375	NA	19,400	EST
61.	H84008	NA	19,300	EST
62.	H12362	Hs.57973	19,300	Hypothetical protein
63.	R62863	Hs.47679	18,700	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564I112 (from clone DKFZp564I112)
64.	R34057	NA	18,600	EST
65.	AA181350	Hs.286155	18,600	Human skeletal muscle 1.3 kb mRNA for tropomyosin
66.	AA036758	Hs.81256	18,600	S100 calcium-binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)
67.	R06552	NA	18,500	EST
68.	W79028	Hs.125845	18,400	ribulose-5-phosphate-3-epimerase
69.	W03386	Hs.29808	18,300	Homo sapiens cDNA: FLJ21122 fis, clone CAS05917
70.	T91351	Hs.154008	18,300	ESTs
71.	R90884	Hs.77443	18,300	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
72.	AA075652	NA	18,300	EST
73.	W31524	Hs.95262	18,200	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434L235 (from clone DKFZp434L235)
74.	T56371	Hs.278998	18,200	AP-2rep transcription factor
75.	AA086403	Hs.1948	18,100	ribosomal protein S21

Colocação	GENBANK	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
76.	T87470	Hs.14682	18,000	EST
77.	T50828	Hs.9216	17,900	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease
78.	R74408	Hs.2605	17,900	CMRF35 leukocyte immunoglobulin-like receptor
79.	H30629	NA	17,800	EST
80.	AA127869	Hs.155119	17,800	EH domain containing 1
81.	W56877	Hs.44579	17,500	hypothetical protein FLJ20199
82.	R96571	Hs.33433	17,500	EST
83.	R54784	Hs.75621	17,500	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
84.	N45640	Hs.194687	17,500	cholesterol 25-hydroxylase
85.	N32669	Hs.169138	17,500	RPA-binding trans-activator
86.	N24285	Hs.1063	17,500	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
87.	R09668	Hs.131186	17,400	ESTs
88.	H82166	Hs.278569	17,400	KIAA0064 gene product
89.	R48060	Hs.92700	17,300	DKFZP564O243 protein
90.	R37525	Hs.287832	17,300	myelin protein zero-like 1
91.	H56754	Hs.145696	17,300	splicing factor (CC1.3)
92.	AA059324	Hs.118555	17,300	fascin (Strongylocentrotus purpuratus) homolog 2 (actin-bundling protein, retinal)
93.	T72862	Hs.1360	17,100	cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible)
94.	R87343	NA	17,100	EST
95.	R33409	Hs.82002	17,100	endothelin receptor type B
96.	H38881	Hs.110457	17,100	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
97.	AA102339	Hs.27262	17,100	Homo sapiens clone 25110 mRNA sequence
98.	T54426	Hs.75617	17,000	collagen, type IV, alpha 2
99.	H94204	Hs.246046	17,000	ESTs, Weakly similar to RET1_HUMAN RETINOL-BINDING PROTEIN I, CELLULAR [H.sapiens]
100.	T98110	NA	16,900	EST

Tabela 8 : Relação dos 100 genes mais expressos na análise com membrana GDA 1.2 e misturas de 9 tumores coloretiais (Nic1).

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	R77592	Hs.5093	999,999	ESTs, Weakly similar to HSM-2 [H.sapiens]
2.	H44733	Hs.90408	999,999	Neogenin (chicken) homolog 1
3.	H20266	Hs.91426	999,999	ESTs, Weakly similar to coded for by C. elegans cDNA yk34a10.3 [C.elegans]
4.	R44113	Hs.90005	938,310	Homo sapiens mRNA for silencer element, complete cds
5.	R41373	Hs.6728	921,620	ESTs
6.	R55439	Hs.91778	880,988	ESTs
7.	H12754	NA	767,330	
8.	R39960	Hs.21536	715,230	ESTs, Weakly similar to C16C10.5 [C.elegans]
9.	R59491	Hs.23514	619,240	ESTs
10.	H45010	NA	603,560	
11.	R01904	Hs.17569	566,940	ESTs
12.	T99721	Hs.125190	557,686	ESTs
13.	N35332	Hs.77839	506,710	H.sapiens mRNA for glycogenin
14.	R85374	NA	499,230	EST
15.	H04790	NA	492,120	EST
16.	R61691	Hs.9004	462,340	H.sapiens mRNA for melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)
17.	W35211	Hs.54801	458,780	ESTs
18.	AA034387	Hs.20144	445,850	Homo sapiens MIP-1 delta mRNA, complete cds
19.	H20548	Hs.24837	417,850	Homo sapiens sodium/myo-inositol cotransporter (SLC5A3) gene, complete cds
20.	AA039985	Hs.7076	414,230	ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY J WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]
21.	R60986	Hs.86347	409,530	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 44.2 KD PROTEIN IN SCO2-MRF1 INTERGENIC REGION [Saccharomyces cerevisiae]
22.	H19472	Hs.31653	400,310	ESTs
23.	AA136072	Hs.75970	393,720	Edg-2
24.	H68724	Hs.118053	391,550	ESTs
25.	AA046445	Hs.62935	382,960	ESTs
26.	H66480	Hs.7354	368,782	Human zinc finger/leucine zipper protein (AF10) mRNA, complete cds
27.	H46136	Hs.103833	367,400	ESTs, Weakly similar to F35G2.2 [C.elegans]
28.	N54530	Hs.22344	364,540	ESTs
29.	R76214	Hs.9658	363,230	ESTs
30.	N29887	Hs.102480	362,850	ESTs
31.	H62905	NA	360,750	EST
32.	N48869	Hs.46542	354,870	ESTs
33.	H80642	NA	353,250	EST
34.	H19830	Hs.7973	338,870	ESTs
35.	AA034525	NA	338,810	EST
36.	R40503	Hs.3843	333,840	ESTs
37.	R99923	Hs.108047	326,640	ESTs
38.	H78808	Hs.77101	323,117	Human DEAD-box protein p72 (P72) mRNA, complete cds
39.	R59976	Hs.26714	314,610	ESTs
40.	W57903	Hs.36565	313,280	ESTs

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
41.	H05539	Hs.13882	310,930	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 94.2 KD PROTEIN C38D4.5 IN CHROMOSOME III [Caenorhabditis elegans]
42.	AA150837	Hs.99914	306,490	Human mRNA for HBp15/L22, complete cds
43.	W31553	Hs.118632	304,990	Chromosome 22q13 BAC Clone CIT987SK-384D8 complete sequence
44.	R37758	Hs.6385	299,120	ESTs, Weakly similar to p82 [H.sapiens]
45.	H05502	Hs.107375	293,640	ESTs
46.	H39830	Hs.2499	286,000	Human lipid-activated protein kinase PRK1 mRNA, complete cds
47.	R42004	Hs.74947	284,540	ESTs
48.	H06826	Hs.23920	283,674	ESTs
49.	H06205	Hs.75110	282,135	Cannabinoid receptor 1 (brain)
50.	H38063	NA	278,630	EST
51.	H05051	NA	268,380	EST
52.	AA136856	Hs.33033	268,240	ESTs
53.	R54933	Hs.73947	267,250	Peptidase D
54.	N31747	Hs.75362	266,925	H.sapiens DAP-3 mRNA
55.	N49293	Hs.46932	266,312	ESTs
56.	N32764	NA	263,150	EST
57.	AA069271	Hs.8024	261,870	IK
58.	H44435	Hs.95870	258,700	ESTs
59.	H70584	NA	249,998	EST
60.	R41832	Hs.6666	247,810	ESTs
61.	R98042	Hs.81022	245,690	ESTs
62.	H05462	Hs.75337	242,249	Human mRNA for KIAA0035 gene, partial cds
63.	H99202	Hs.42643	241,300	ESTs, Weakly similar to C34C12.5 [C.elegans]
64.	H99855	Hs.42748	235,980	ESTs
65.	R92176	Hs.34494	234,260	ESTs
66.	AA046800	Hs.20225	233,779	Human mRNA expressed in HC/HCC livers and MolT-4 proliferating cells, partial sequence
67.	R50468	Hs.76422	228,723	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
68.	H45987	Hs.4975	228,013	Homo sapiens mRNA for voltage gated potassium channel
69.	AA028112	Hs.61469	227,720	ESTs
70.	AA156612	Hs.3620	225,620	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
71.	AA099404	Hs.69307	225,620	ESTs
72.	R60029	NA	224,840	EST
73.	N62572	Hs.48561	224,200	ESTs
74.	AA203654	NA	221,910	EST
75.	N49728	Hs.38316	218,673	ESTs, Weakly similar to coded for by C. elegans cDNA yk34a10.3 [C.elegans]
76.	H20164	Hs.31025	215,541	ESTs
77.	W95466	Hs.108080	213,980	CYSTEINE-RICH PROTEIN
78.	AA031330	Hs.1027	210,450	Human Rad mRNA, complete cds
79.	R16884	Hs.20097	209,838	ESTs
80.	R50511	Hs.85279	209,130	ESTRADIOL 17 BETA-DEHYDROGENASE 1

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
81.	H28339	Hs.31889	205,860	ESTs
82.	H84293	Hs.21413	205,350	Human clone 23586 mRNA sequence
83.	H16759	Hs.21572	205,020	ESTs
84.	H19771	NA	204,120	EST
85.	H57134	Hs.75350	203,920	Vinculin
86.	W04515	Hs.100837	203,870	Human mRNA for KIAA0374 gene, complete cds
87.	R22054	Hs.129669	202,810	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY J WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]
88.	R87333	Hs.3807	202,550	ESTs, Weakly similar to SODIUM/POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE GAMMA CHAIN [Mus musculus]
89.	N28396	Hs.58726	201,479	ESTs
90.	N95807	Hs.1516	200,981	Insulin-like growth factor-binding protein 4
91.	W68453	Hs.48855	200,520	ESTs
92.	N31931	Hs.101555	198,390	Human RNA polymerase III subunit (RPC39) mRNA, complete cds
93.	AA194238	NA	196,250	EST
94.	R60317	Hs.74635	193,920	Dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate dehydrogenase complex, 2-oxo-glutarate complex, branched chain keto acid dehydrogenase complex)
95.	N31840	Hs.69081	193,790	ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY SQ WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]
96.	R51179	Hs.18921	193,440	Human NAD ⁺ -specific isocitrate dehydrogenase beta subunit precursor, mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds
97.	H16791	Hs.31445	193,430	ESTs
98.	R32377	Hs.82240	192,890	Human syntaxin 3 mRNA, complete cds
99.	R60490	Hs.101074	189,633	ESTs
100.	H20055	Hs.31677	187,850	ESTs, Highly similar to GLUTAMATE RECEPTOR 4 PRECURSOR [Rattus norvegicus]

Tabela 9 : Relação dos 100 genes com maior decréscimo de expressão na análise com membrana GDA 1.3 e misturas de 3 tumores coloretiais (Noa9). NA: sem entrada no Unigene.

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	H70732	Hs.269821	954,870	EST
2.	R22088	Hs.23331	793,610	ESTs
3.	H59180	Hs.20766	764,990	ESTs
4.	AA147847	Hs.2064	736,090	Vimentin
5.	H11144	Hs.106686	709,740	ESTs
6.	R08306	Hs.9754	681,910	ESTs
7.	N21031	Hs.42930	657,500	ESTs
8.	W19403	Hs.38176	655,450	Homo sapiens mRNA for KIAA0606 protein, partial cds
9.	R26941	Hs.22393	644,670	Density-regulated protein
10.	N41670	Hs.301444	639,120	EST
11.	AA156919	Hs.76607	622,620	ESTs
12.	R27089	Hs.24122	605,370	ESTs
13.	AA151396	NA	551,080	
14.	AA057839	Hs.29390	543,850	ESTs
15.	R23999	Hs.75578	531,950	Human heparan sulfate proteoglycan (HSPG2) mRNA, complete cds
16.	W39701	Hs.10247	511,810	Activated leucocyte cell adhesion molecule
17.	AA187828	Hs.3069	508,810	MITOCHONDRIAL STRESS-70 PROTEIN PRECURSOR
18.	T67106	Hs.13040	492,510	ESTs
19.	H10341	Hs.6087	469,200	ESTs
20.	R72787	Hs.32225	466,190	IG ALPHA-2 CHAIN C REGION
21.	T80918	Hs.14801	435,970	ESTs
22.	AA126385	Hs.19736	423,190	ESTs, Weakly similar to HYPOTHETICAL 36.7 KD PROTEIN C2F7.02C IN CHROMOSOME I [Schizosaccharomyces pombe]
23.	N90461	Hs.80738	420,620	Sialophorin (gpL115, leukosialin, CD43)
24.	W24178	Hs.78880	411,960	Human acetolactate synthase homolog mRNA, complete cds
25.	R33943	Hs.47554	409,040	ESTs
26.	W02896	Hs.21321	405,350	ESTs
27.	AA131718	Hs.72044	403,460	ESTs
28.	AA053564	Hs.125850	395,800	ESTs, Highly similar to SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE SULU [Caenorhabditis elegans]

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
29.	H99999	Hs.42736	390,140	ESTs
30.	R35700	Hs.79008	383,590	Human nuclear protein Skip mRNA, complete cds
31.	H58444	Hs.112255	383,490	Human nucleoporin 98 (NUP98) mRNA, complete cds
32.	W20270	Hs.5801	382,860	ESTs
33.	H16544	Hs.80731	381,310	Autocrine motility factor receptor
34.	H62028	Hs.38018	375,790	Homo sapiens mRNA for protein kinase, Dyrk3
35.	H08918	Hs.90363	373,400	ESTs
36.	AA187163	Hs.108761	373,160	Ribosomal protein L37
37.	N57190	Hs.6487	366,850	ESTs, Moderately similar to unknown [H.sapiens]
38.	W16614	Hs.74362	364,380	H.sapiens mRNA for CLPP
39.	N46105	Hs.118145	362,980	ESTs
40.	T97062	Hs.115789	359,120	ESTs, Moderately similar to ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [Simian retrovirus srv-1]
41.	N27992	Hs.86870	350,390	H.sapiens mRNA for Arg protein tyrosine kinase- binding protein
42.	AA167017	Hs.118772	350,330	Tropomyosin beta chain (skeletal muscle)
43.	T92085	NA	350,070	EST
44.	R14288	Hs.79334	344,915	H.sapiens E4BP4 gene
45.	AA115819	Hs.69707	340,070	ESTs
46.	AA002234	NA	339,640	EST
47.	N28729	Hs.43322	335,040	ESTs
48.	R10563	Hs.63920	334,200	ESTs
49.	R69695	Hs.117553	334,111	ESTs
50.	T49869	Hs.29113	330,990	U1 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A
51.	AA112166	Hs.119370	325,160	ESTs
52.	R05957	Hs.76317	316,625	Ribosomal protein L31
53.	N50278	Hs.46912	306,500	ESTs
54.	H02088	NA	305,710	EST
55.	H15879	Hs.13209	302,440	ESTs, Weakly similar to APK1 antigen [H.sapiens]
56.	T71479	Hs.111572	295,740	Human rearranged immunoglobulin lambda light chain mRNA
57.	H39033	NA	294,320	EST

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
58.	R33892	Hs.89558	288,930	Homeo box B5 (2.1 protein)
59.	AA042993	NA	282,515	EST
60.	H60213	Hs.12126	276,622	ESTs
61.	R81755	Hs.80510	276,360	Human arginine-rich nuclear protein mRNA, complete cds
62.	T95693	Hs.17614	275,330	ESTs
63.	H57195	Hs.75116	274,780	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog
64.	H44723	Hs.32296	271,760	ESTs
65.	N76908	Hs.37593	268,750	ESTs
66.	H30869	Hs.90391	268,370	Human beta-tubulin class III isotype (beta-3) mRNA, complete cds
67.	R25994	Hs.89499	266,160	Arachidonate 5-lipoxygenase
68.	AA195311	Hs.79372	265,270	H.sapiens mRNA for MHC class I promoter binding protein
69.	N90956	Hs.17230	265,190	ESTs
70.	H15967	Hs.79101	262,420	H.sapiens mRNA for cyclin G1
71.	R88880	Hs.107823	257,380	ESTs, Moderately similar to zinc finger protein [M.musculus]
72.	R70292	Hs.1717	254,190	IG KAPPA CHAIN C REGION
73.	N55039	Hs.7567	252,140	ESTs
74.	H51540	NA	251,940	EST
75.	AA151209	Hs.42397	248,427	ESTs
76.	H63824	Hs.22271	243,020	Human mRNA for KIAA0033 gene, partial cds
77.	R22665	NA	240,780	EST
78.	N28522	Hs.8935	239,850	Homo sapiens mRNA for quinolinate phosphoribosyl transferase, complete cds
79.	R25476	Hs.23881	237,390	KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 7
80.	R26013	Hs.6075	236,230	ESTs
81.	N77679	NA	227,040	EST
82.	AA039960	Hs.89887	226,630	Thromboxane A2 receptor
83.	R10430	NA	225,210	EST
84.	W17157	Hs.25732	224,600	Homo sapiens eIF4GII mRNA, complete cds

Colocação	Gbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
85.	T92612	Hs.16864	224,310	ESTs
86.	W42512	Hs.55841	220,960	Homo sapiens mad protein homolog (hMAD-3) mRNA, complete cds
87.	AA131647	Hs.24587	219,840	Homo sapiens mRNA for Efs1, complete cds
88.	H48676	NA	219,200	EST
89.	H43499	NA	218,440	EST
90.	W07170	Hs.80464	217,290	Homo sapiens hepatitis B virus X interacting protein (XIP) mRNA, complete cds
91.	N50594	Hs.36829	215,920	ESTs
92.	W04705	Hs.64783	215,200	ESTs, Weakly similar to ZC518.3 [C.elegans]
93.	H11135	Hs.12887	212,730	ESTs, Highly similar to ACTIN-LIKE PROTEIN [Bos taurus]
94.	R89536	Hs.22024	212,530	Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)
95.	T40289	Hs.8416	211,540	ESTs
96.	N63192	Hs.1892	211,020	Phenylethanolamine N-methyltransferase
97.	W79016	Hs.58440	208,480	ESTs
98.	T40473	Hs.111572	208,460	Human rearranged immunoglobulin lambda light chain mRNA
99.	R06513	Hs.52002	207,880	Human scavenger receptor cysteine rich Sp alpha mRNA, complete cds
100.	H63368	Hs.114004	207,711	ESTs, Highly similar to HEAT SHOCK COGNATE 71 KD PROTEIN [H.sapiens]

Tabela 10 : Relação dos 100 genes com maior decréscimo de expressão na análise com membrana GDA 1.2 e misturas de 3 tumores coloreticais (Nican). NA: sem entrada no Unigene.

Colocação	Genbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
1.	R72787	Hs.32225	148,300	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Gm marker)
2.	H45793	Hs.32225	117,700	Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA, complete cds
3.	R23999	Hs.75578	106,300	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)
4.	H65712	Hs.146106	76,800	EST
5.	AA057839	Hs.29390	60,500	insulin-degrading enzyme
6.	AA187399	Hs.75969	41,900	proline-rich protein with nuclear targeting signal
7.	H70732	Hs.269821	30,800	ESTs
8.	H12682	Hs.71790	26,200	Homo sapiens unknown mRNA, sequence
9.	R73050	Hs.129760	25,900	ciliary neurotrophic factor receptor
10.	H49310	Hs.126451	25,500	ESTs
11.	T58851	Hs.9669	24,100	na
12.	H49884	Hs.115285	20,500	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)
13.	H18883	NA	19,500	EST
14.	N57249	Hs.78596	19,200	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type
15.	R21064	Hs.184627	18,700	KIAA0118 protein
16.	N72527	Hs.23044	18,100	RAD51 (S. cerevisiae) homolog (E coli RecA homolog)
17.	H81786	Hs.256309	17,800	accessory proteins BAP31/BAP29
18.	N42806	Hs.44317	17,700	SRY (sex determining region Y)-box 10
19.	H04131	Hs.104315	17,400	suppressor of clear, C. elegans, homolog of
20.	H62088	Hs.181125	17,000	immunoglobulin lambda locus
21.	R73766	NA	16,900	EST

Colocação	Genbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
22.	W07826	Hs.48441	16,700	ESTs, Weakly similar to F25H5.6 [C.elegans]
23.	H95331	Hs.102333	16,700	ESTs
24.	R54688	Hs.6272	16,400	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761P0114 (from clone DKFZp761P0114)
25.	H45128	Hs.283305	16,200	Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA, complete cds
26.	R55158	Hs.250811	15,800	v-rat simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)
27.	N29155	Hs.179943	15,800	ribosomal protein L11
28.	H16160	Hs.31388	15,800	ESTs
29.	H45355	Hs.24853	15,700	ESTs
30.	H27034	Hs.286115	15,700	Human active IgK chain from GM 607, V-kappa-2 region
31.	R18900	Hs.22571	15,400	
32.	R71741	Hs.283305	15,300	Homo sapiens SNC73 protein mRNA, complete cds
33.	H23933	Hs.8109	15,300	EST
34.	W17249	Hs.121529	15,100	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
35.	H47146	Hs.59544	15,100	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
36.	H46054	Hs.57988	15,000	Homo sapiens cDNA: FLJ22357 fis, clone HRC06404
37.	T80683	Hs.41997	14,600	alpha-1-B glycoprotein
38.	H46382	Hs.57856	14,600	PFTAIRE protein kinase 1
39.	N30964	Hs.239934	14,500	CGI-96 protein
40.	T96795	Hs.99491	14,400	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)

Colocação	Genbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
41.	R84635	NA	14,400	EST
42.	N29162	Hs.42832	14,400	na
43.	H90247	Hs.285013	14,400	putative human HLA class II associated protein I
44.	R34193	NA	14,300	EST
45.	AA058898	Hs.285204	14,300	ESTs
46.	R26320	Hs.81008	14,200	filamin B, beta (actin-binding protein-278)
47.	N35682	Hs.259743	14,200	ESTs
48.	H26580	Hs.248756	14,100	H.sapiens rearranged gene for kappa immunoglobulin subgroup V kappa IV
49.	AA029349	Hs.79876	14,100	steroid sulfatase (microsomal), arylsulfatase C, isozyme S
50.	W78057	Hs.125819	14,000	putative dimethyladenosine transferase
51.	R93527	Hs.2667	14,000	metallothionein 1H
52.	N30471	Hs.112423	14,000	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586I1420 (from clone DKFZp586I1420); partial cds
53.	H84204	Hs.21537	14,000	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
54.	H25521	NA	14,000	EST
55.	T85558	NA	13,900	EST
56.	H44733	Hs.90408	13,900	neogenin (chicken) homolog 1
57.	H44888	Hs.57483	13,800	Homo sapiens cDNA FLJ14294 fis, clone PLACE1008181
58.	R23635	Hs.4295	13,600	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12
59.	N28396	Hs.58726	13,500	Homo sapiens cDNA FLJ13903 fis, clone THYRO1001854
60.	R87886	Hs.179735	13,400	ras homolog gene family, member C
61.	R87352	Hs.78950	13,400	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide (maple syrup urine disease)

Colocação	Genbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
62.	AA150237	Hs.279799	13,400	putative zinc finger protein NY-REN-34 antigen
63.	R94457	Hs.5398	13,300	guanine monphosphate synthetase
64.	R25798	Hs.16622	13,300	zinc finger protein 185 (LIM domain)
65.	AA196575	Hs.211577	13,300	kinectin 1 (kinesin receptor)
66.	R66687	Hs.750	13,200	fibrillin 1 (Marfan syndrome)
67.	H51993	Hs.15514	13,200	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547C224 (from clone DKFZp547C224)
68.	H19297	Hs.129764	13,200	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
69.	R81578		13,100	na
70.	H43746	Hs.6685	13,100	thyroid hormone receptor interactor 8
71.	W24097	Hs.91065	13,000	hypothetical protein DKFZp761B2423
72.	R87923	Hs.6755	13,000	RaP2 interacting protein 8
73.	H12952	Hs.146550	13,000	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
74.	W21392	Hs.200317	12,900	KIAA1404 protein
75.	N33752	Hs.43546	12,900	EST
76.	W38961	Hs.278276	12,800	oculocerebrorenal syndrome of Lowe
77.	T62983	NA	12,800	EST
78.	R77028	Hs.1116	12,800	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
79.	H12075	Hs.285396	12,800	ESTs, Weakly similar to unnamed protein product [H.sapiens]
80.	R84749	Hs.29700	12,700	hypothetical protein FLJ20094
81.	N42072	Hs.100194	12,700	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
82.	H86672	NA	12,700	EST
83.	AA054211	Hs.193320	12,700	ESTs
84.	R84724	Hs.26630	12,500	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3

Colocação	Genbank	UNIGENE	Razão	Nome do Gene
85.	R25090	NA	12,500	EST
86.	H52350	Hs.140	12,500	immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Gm marker)
87.	R31243	Hs.250594	12,400	ESTs
88.	H25625	Hs.286115	12,400	Human active IgK chain from GM 607, V-kappa-2 region
89.	AA181061	Hs.180255	12,400	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
90.	R31471	NA	12,300	EST
91.	N42002	Hs.265317	12,300	ESTs, Moderately similar to ALU7_HUMAN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY [H.sapiens]
92.	N23808	Hs.256309	12,300	accessory proteins BAP31/BAP29
93.	R31317	NA	12,200	EST
94.	N24477	Hs.251397	12,200	immunoglobulin lambda-like polypeptide 3
95.	H44664	Hs.44566	12,200	KIAA1641 protein
96.	H16193	Hs.248960	12,200	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
97.	R73197	Hs.250161	12,100	ESTs
98.	T56791	Hs.97616	12,000	SH3-domain GRB2-like 1
99.	R55439	Hs.91778	12,000	na
100	R49895	NA	12,000	EST

Tabela 11: Relação dos 100 genes com maior decréscimo de expressão na análise com membrana GDA 1.2 e misturas de 9 tumores coloretais (Nic2). NA: sem entrada no Unigene.

Com a Ajuda do laboratório de bioinformática desta instituição, nos foi possível dividir por categorias do metabolismo celular, os genes diferencialmente expressos entre as três análises. Esta análise pode-se dizer que foi um tanto grosseira ou falha, pois não consegue abranger todos os genes analisados, devido a usar palavras chaves em sua busca e também pelo fato de alguns dos clones diferencialmente expressos obtidos por nós, não possuírem anotação em alguns casos.

Para cada categoria foram selecionadas cerca de 5 a 8 palavras chaves em alguns casos. Mas mesmo assim é possível ter uma boa idéia das categorias gênicas que aparecem com ganho de expressão na tabela 13 e figura 25 ou perda de expressão na tabela 14 e figura 26. A tabela abaixo relaciona as palavras chaves utilizadas para cada categoria gênica:

Categorias	Subcategorias	Palavras Chaves
Metabolismo do DNA	A) Estrutura cromossômica	Motilidade celular, histonas, centrômeros, nucleossomo e protamina
	B) Recombinação	Recombinação
	C) Reparo	Reparo de DNA, dano ao DNA, topoisomerase, DNA simples fita, complexo T, tautomerase, Xeroderma Pigmentosum, endonuclease.
	D) Replicação	Replicação, proteína ativadora, helicase de DNA, Polimerase de DNA e primase
Metabolismo de RNA	A) Síntese	Polimerase de RNA
	B) Processamento	Helicase de RNA, poliadenilação, Ligação ao RNA, ribonucleoproteína, poli(A), poliadenilase, processamento, edição, "RNA capping", espliceossomo
	C) Fatores de transcrição	Transcrição, "enhancer", homeotico, interativo, transcriptase, transcricional, zinc-finger
Metabolismo de Proteínas	A) Modificação e alvos proteicos	Chaperoninas, Ciclofilinas, KDEL, Reconhecimento de sinal, Ubiquitina
	B) Turnover	Protease, peptidase, catépsina, quimotripsina, colagenase, cisteína, elastase, calicreína, metaloproteínase, proteossomo
	C) Ribossomal	Ribossomal
	D) Tradução	Tradução, elongação, fator de iniciação, traducional
Motilidade celular e estrutura	A) Estrutura	Adaptin, caveolina, clatrina, citoquinesi, proteína de membrana, glicoforina, laminina, lisossomal, mielina, poro, plectina, sinapto, neurotensina, proteína de junção fina, proteína de junção GAP.
	B) Citoesqueleto	Actina, activina, adducing, ankyrin, cofilina, centrim, collapsing, conectin, coronin, crystallin, demantim, gephyrin, queratina, miosina, nebulin, neurofilamentos, proteolipideos, radixin, restin, espectrina, sinapsina, sintrofina, talin, titin, tropo, tubulin, vilin, vimentina e vinculina.
	C) Matriz extracelular	Agrecan, bigican, matriz, condro, colágeno, elastina, fibrilina, fibrinogênio, proteoglicana,
	D) Proteína motora	Calponina, dynein, dinamina, kinesin, associada a microtubulos.

Ciclo celular	A) Geral	Bcl-2, supressor de tumor, disc large protein, Notch, oncogene, prohibitin.
	B) Apoptose	Apoptose, apoptótico, morte celular, bcl-X, réquiem, caspase.
	C) Ciclo celular	Ciclo celular, divisão celular, ciclina, MAC, mitótico, plastina, proliferação celular, Fase M.
Resposta de defesa/Hom eostase	Antioxidante, catalase, complemento, coagulação, citocromo P450, peroxidase, glutathione, proteína de choque térmico, metalotioneína, superóxido dismutase, transferina, estresse, imunoglobulina, interferon, interleucina, sistema imune, defensina, citocinas.	
Comunicação celular	A) Adesão	Caderina, integrina, mucina e selectina.
	B) Transporte	Transporte, Cnal, Porina, exchanger, pump, carreador.
	C) Efetores e moduladores	Sinal, ciclase, ribosilação, ligação a cálcio, calmodulina, gelsolin, fosfolipase.
	D) Hormônios, fatores de cresc. Receptores.	Hormônios, fatores de crescimento, receptores, esteróides
	E) Tradutores	GDP dissociation, GTPase, nucleotídeo guanina, sinuclein, transducin.
Metabolismo	Transferase, sulfatase, deacetilase, glucosaminidase, colinesterase, esterase, liase, tiolase, oxidase, isomerase, deidrogenase, sintase, redutase, dioxigenase, amidase, decarboxilase, hidroxilase, succinato, glutaminase, arginase, hidrolase, sintetase, desidratase, aconitase, ATPase, citocromo, elétron, ubiquinona, coenzima-A, desaturase, colesterol, apolipoproteína, lipase, hidratase, mutase, nucleotidase, deaminase, aldolase, amilase, galactosidase, glucosidase, fucosidase, manosidase, frutose, glucose, manose, glicogênio.	

Tabela 12: Palavras chaves utilizadas no programa para distribuição dos genes diferencialmente expressos por categorias gênicas do metabolismo celular.

Metabolismo do DNA	93	5.77%
Metabolismo do RNA	66	4.09%
Metabolismo de proteínas	211	13.09%
Motilidade celular	201	12.47%
Ciclo celular	118	7.32%
Resposta de defesa	102	6.33%
Comunicação celular	455	28.53%
Metabolismo	366	22.70%

Clusters com anotação categorizados: 1612 (16%)

Total de genes analisados: 10124

Tabela 13: Tabela da distribuição por categorias do metabolismo celular para genes com ganho de expressão em câncer colorretal entre as três análises com membranas GDA.

Genes com expressão elevada em câncer colo-retal
Divisão por categorias gênicas do metabolismo celular

Figura 25: Gráfico representativo para a análise da distribuição por categorias gênicas dos genes com ganho de expressão nas análises com membranas GDA.

Metabolismo do DNA	107	5.10%
Metabolismo do RNA	86	4.10%
Metabolismo de proteínas	252	12.02%
Motilidade celular	287	13.69%
Ciclo celular	146	6.97%
Resposta de defesa	146	6.97%
Comunicação celular	604	28.82%
Metabolismo	468	22.33%

Clusters com anotação categorizados: 2096 (15%)

Total de genes: 13631

Tabela 14: Gráfico da distribuição por categorias do metabolismo celular para genes com perda de expressão em câncer colorretal entre as análises com membranas GDA.

Figura 26: Gráfico representativo para a análise da distribuição por categorias gênicas para os genes com ganho de expressão nas análises com membranas GDA.

Uma análise de concordância entre as 3 análises com GDA em câncer colorretal foi realizada com o software Excell da Microsoft para os genes com ganho de expressão e para os genes com perda de expressão entre as três análises realizadas. Essa análise nos revelou 104 genes com concordância de expressão entre os genes com ganho de expressão entre as 3 análises; 328 genes entre as análises Nic1 e Nicbt, onde usamos a mesma membrana GDA 1.2 após lavagem e diferentes “pools” de tumores; 150 genes com concordância de expressão entre as análises Nic1 e Tub15, onde foram usados diferentes “pools” de tumores e diferente versão da membrana GDA; 324 genes concordantes entre as análises Nicbt e Tub5 com o mesmo pool de 3 tumores, mas membrana GDA de versão diferente.

Para os genes com perda de expressão encontramos 21 genes com concordância de expressão entre as 3 análises; 148 genes entre as análises Nic2 e Nicnan, onde usamos a mesma membrana GDA 1.2 depois de lavada e diferentes pools de tumores; 28 genes com concordância de expressão entre as análises Nic2 e NOA9, onde foram usados diferentes pools de tumores e diferente versão da membrana GDA; 215 genes concordantes entre as análises Nicnan e NOA9 com o mesmo pool de 3 tumores, mas membrana GDA de versão diferente. Tais resultados podem ser visualizados nas figuras 27e 28 e nas tabelas 15, 16 e 17.

O fato de certos clones não estarem presentes nas 3 análises de GDA, mas em apenas duas em alguns casos, não torna menos válidos tais resultados. Isto devido ao que comentamos a cerca da diluição de expressão ao usarmos o pool de 9 tecidos em uma de nossas análises com membranas GDA. Na tabela 18 estão listadas algumas ESTs encontradas entre as análises e que permanecem como simples ESTs perante aos bancos de dados, até o momento.

Figura 27: Diagrama representativo da sobreposição dos genes com ganho de expressão em tecido tumoral para as 3 análises com membranas GDA.

AA004291	H18350	H29076	H59563	N31362	N94798	R25698	R46282	R68198	R81942	T98990
AA004785	H18766	H38676	H70759	N34012	R01530	R27269	R48060	R70132	R82691	T99924
AA056159	H19230	H38881	H73503	N40437	R01799	R28090	R51699	R72548	R83233	W01226
AA057398	H21568	H39673	H79188	N41573	R01823	R31364	R51931	R74157	R85150	W01565
AA099647	H22476	H46055	H80401	N45505	R02198	R31747	R56663	R76298	R89521	W03386
AA152126	H26200	H47440	H87311	N46720	R02413	R32270	R59009	R77311	R89790	
H01674	H26870	H49744	H91761	N47284	R09668	R32757	R60831	R80064	R90884	
H14332	H27140	H50015	H91962	N48132	R19492	R34057	R62290	R80470	R98517	
H16042	H27334	H50385	H96724	N77560	R20019	R36499	R63498	R80719	T74740	
AA004291	H28503	H52746	N24337	N77703	R21806	R37898	R66025	R81839	T83076	

Tabela 15: Número de acesso ao Genbank para os 104 genes com expressão elevada que se mostraram concordantes entre as análises.

GenBank	UNIGENE	Ratiotub15 posição	Rationictb posição	Rationict1 posição	Nome	Características
AA004291	Hs.283559	13,184 - 4116	13,789 - 3776	16,000	ESTs	
AA004785	Hs.300711	16,963 - 3056	14,225 - 3689	13,500 - 192	annexin A5	PP4 é uma proteína anticoagulante is que atua como um inibidor indireto do complexo específico da tromboplastina, envolvido com a cascata de coagulação. Annexin V forma a voltagem-dependente do canal de Ca^{2+} na camada de fosfolípidos. Resíduos de aminiácidos chaves atuam como filtros seletivos e sensores de voltagem. Talvez regulando a permeabilidade dos poros do canal para o íon.
AA056159	Hs.247565	12,394 - 43169	10,398 - 4594	10,900 - 347	rhodopsin (retinitis pigmentosa 4, autosomal dominant)	O locus de Rho foi mapeado próximo ao locus para o protooncogene Raf-1 e do protooncogene Kras-2.
AA057398	Sem cluster	14,090 - 3839	12,289 - 4075	10,900 - 346	ESTs	
AA099647	Hs.234863	10,730 - 49900	15,729 - 3467	12,600 - 239	ESTs, Homo sapiens cDNA FLJ12082 fis, clone HEMBB100249 2	
AA152126	Hs.242894	13,130 - 4132	10,975 - 4423	13,600 - 189	ADP-ribosylation factor-like 1	
H01674	Hs.48527	12,586 - 4314	14,927 - 3571	20,800 - 47	ESTs	
H14332	Sem cluster	11,831 - 4576	11,596 - 4246	12,300 - 261	ESTs	

GenBank	UNIGENE	Rat10tub15 posição	Rat10nic1b posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
H16042	Hs.1717	11,857 - 4566	999,999 - 33	111,700 - 2	IG KAPPA CHAIN C REGION	Klein (1981) encontrou que células B derivadas de tumores (mouse myeloma and human Burkitt lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia) têm padrões anômalos de síntese de imunoglobulinas que se correlacionam com um tipo de aberração cromossomal.
AA004291	Hs.283559	13,184 - 4116	13,789 - 3776	16,000 - 121	ESTs	
H18350	Hs.278427	12,652 - 4285	14,244 - 3686	12,900 - 224	Human cerebellar degeneration-associated protein mRNA, complete cds	Anticorpos contra proteínas neurais têm sido identificados em pacientes com degeneração cerebelar que ocorre em associação com carcinoma de pequenas células de pulmão, neoplasmas de mama e ovário, e doença de Hodgkin. É predominantemente expresso em tecidos neuroectodermal normais e em certos tumores malignos.
H18766	Hs.86126	17,350 - 2975	999,999 - 31	60,200 - 5	ESTs	
H19230	Hs.194746	10,972 - 4842	12,680 - 3987	12,600 - 237	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit - CACNA1G	Canais de cálcio ativados podem ser distinguidos com base em sua dependência de voltagem, desativação e condutância em um único canal. Canais de cálcio de baixa voltagem, parecem ter função de "marcapasso".
H21568	Hs.141475	13,650 - 3970	66,071 - 1737	34,200 - 9	Homo sapiens, clone MGC:12617 IMAGE:296470 6, mRNA, complete cds	
H22476	Sem cluster	17,015 - 3042	10,595 - 4536	10,500 - 389	EST	
H26200	Hs.121001	13,266 - 4091	11,301 - 4321	10,200 - 425	Homo sapiens, clone IMAGE:346028 0, mRNA	

GenBank	UNIGENE	Rat10tub15 posição	Rat10nicbt posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
H26870	Sem cluster	11,411 - 4698	18,260 - 3167	13,700 - 186		
H27140	Hs.288658	11,467 - 4682	15,012 - 3556	13,000 - 219	Zinc finger protein 35 (clone HF.10)	<p>"Zinc fingers" são proteínas com domínios de ligação ao DNA que consistem de unidades de repetições de 28-30 amino acids contendo 2 cisteínas and 2 resíduos de histidinas em posições invariantes. São identificados em várias proteínas regulatórias eucarióticas e membros da família são relacionados a proliferação e diferenciação de células normais. Donti et al. (1990) mapearam no gene HF10 na posição 3p22-p21, uma região cromossômica freqüentemente envolvida em mudança cariotípica associada com câncer renal e de pulmão.</p>
H27334	Hs.75562	13,683 - 3966	10,370 - 4600	15,500 - 133	discoidin domain receptor family, member 1	<p>O receptor murino de Tirosina quinase (Rtk) chamado Nep (para neuroepitelial), ou Ptk3 (para proteína tirosina quinase-3), é amplamente expresso em tecidos fetais e adultos. O domínio do receptor humano de discoidin, divide 93% de identidade ao Nep e foi encontrado em super expresso em células de carcinoma mama (Johnson et al., 1993). Sakuma et al. (1996) mostraram que a região promotora do gene contém um sítio de ligação consenso para o supressor de tumor. A expressão de DDR é elevada pela proteína p53 em células de osteosarcoma humano. Shelling et al. (1995) isolaram uma proteína receptora de tirosina quinase de uma biblioteca de cDNA derivada de linhagem celular epitelial de câncer de ovário..</p>
H29076	Sem cluster	15,620 - 3368	12,145 - 4110	13,000 - 218	ESTs	

GenBank	UNIGEN E	Rat10tub15 posição	Rat10nicbt posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
H28503	Sem cluster	14,414 - 3722	22,884 - 2818	19,900 - 52	Homo sapiens cDNA FLJ11946 fis, clone HEMBB100070 9	
H38676	Hs.15164 1	11,612 - 4638	13,930 - 3743	19,800 - 54	H.sapiens garp gene mRNA, complete CDS glycoprotein A repetitions predominant	Na tentativa de isolar genes candidatos a possíveis oncogenes na região region 11q13.5-q14, Ollendorff et al. (1992) isolaram uma sequência designada D11S833E, contendo um gene chamado de GARP.
H38881	Hs.11045 7	28,242 - 1864	12,950 - 3930	17,100 - 96	Wolf- Hirschhorn syndrome candidate 1 WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome é uma malformação associada com deleção homozigota do braço curto do cromossomo 4 (4p16.3). A proteína codificada por WHSC1 está envolvida na heterogeneidade clínica de múltiplas translocações cromossômicas em mielomas envolvendo o locus da imunoglobulina de cadeia pesada (IGH) no cromossomo 14q32. O que representa um mecanismo comum de ativação oncogênica em doenças linfóides.
H39673	Hs.16400 1	10,576 - 4931	13,896 - 3748	12,800 - 226	ESTs	
H46055	Hs.26450	13,639 - 3973	22,064 - 2873	13,300 - 205	KIAA0725 protein	
H47440	Hs.89519	10,634 - 4917	10,620 - 4529	11,300 - 320	KIAA1046 protei n	
H49744	Hs.20977	11,669 - 4625	10,942 - 4432	13,900 - 178	Hypothetical protein MGC3129 similar to ganglioside- induced differentiation- associated protein	
H50015	Sem cluster	12,625 - 4296	11,879 - 4168	10,300 - 409	ESTs	
H70759	Sem cluster	10,939 - 4848	10,940 - 4433	10,900 - 342		
H91761	Hs.15365 2	15,871 - 3293	19,611 - 3052	23,300 - 123	ESTs	Chromosome X

GenBank	UNIGENE	Ratitub15 posição	Rationictb posição	Rationict1 posição	Nome	Características
H50385	Hs.13228	13,160 - 4124	10,933 - 4435	14,000	Calsenilin, presenilin- binding protein, EF hand transcription factors	Mutações em Presenilin produzem aumento de formações beta-amyloid (Abeta) e apoptose em muitos sistemas experimentais. Presenilins selvagens e mutantes na apoptose e na formação Abeta. calsenilin liga cálcio e presenilin. Fluxo de cálcio intracelular são importantes determinantes da expressão gênica.
H52746	Hs.11320 5	21,390 - 2386	16,693 - 3331	25,700 - 24	Cytochrome c oxidase subunit IV	Cytochrome c oxidase (COX; EC 1.9.3.1), é a enzima terminal do complexo da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria.
H59563	Hs.5353	10,331 - 4964	15,527 - 3485	10,500	Human apoptotic cysteine protease Mch4 (Mch4) mRNA, complete cds; Homo sapiens caspase-10/c mRNA, complete cds	Uma cascata de reações de proteases parece ser responsável para as mudanças apoptóticas em células de mamíferos submetidas a morte celular programada.
H73503	Hs.93223	12,928 - 4186	22,658 - 2830	13,800 - 181	Glycophorin E	Glycophorin A (GPA) e glycophorin B (GPB) são as principais sialoglicoproteínas de membrana de células vermelhas humanas e carreador do grupo MN do sangue e antígeno Ss.
H79188	Hs.99987	17,019 - 3041	999,999 - 28	67,100 - 4	excision repair cross- complementing rodent repair deficiency, complementati on group 2 (xeroderma pigmentosum D)	Siciliano et al. (1985) descreveu um gene no cromossomo 19 humano que complementa um defeito de reparo de DNA em células de ovário de Chinese hamster (CHO) chamado EM9. Flejter et al. (1992) demonstrou que o gene ERCC2 corrige a sensibilidade a radiação UV e reparo de excisão de nucleotídeos em células de xeroderma pigmentosum de complementação de grupo D.
H91962	Hs.17326 9	15,098 - 3508	14,580 - 3628	23,300 - 129	ESTs	Chromosome 7
N34012	Sem cluster	11,560 - 4649	10,904 - 4445	23,300 - 114		

GenBank	UNIGENE	Rat10tub15 posição	Rat10nicbt posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
N46720	Sem cluster	16,666 - 3132	30,370 - 2476	11,800 - 287		
H80401	Hs.19414 8	19,816 - 2563	11,958 - 4152	13,000 - 217	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	O oncogene YES é homologa ao gene do "Yamaguchi sarcoma vírus". O produto desse gene associado com a atividade da tirosina quinase e sua sequência de aminoácidos mostram uma alto grau de homologia com o do produto do gene do Rous sarcoma virus.
H87311	Hs.59544	16,459 - 3173	19,415 - 3075	23,300 - 30	Excision repair cross- complementing rodent repair deficiency, complementati on group 1 (includes overlapping antisense sequence)	Siciliano et al. (1985) descreveu no cromossomo 19, dois genes complementam mutações de reparo de DNA em células de ovário de Chinese hamster (CHO). ERCC1 complementa deficiência da mutação chamada UV20; o locus humano foi chamado de ERCC1 (Thompson et al., 1985). O outro chamado de EM9, diferem com relação aos agentes para os quais ele é mais sensível e aumenta a troca de cromátides (Thompson et al., 1982) como na síndrome de Bloom; o locus humano foi chamado de ERCC2. ERCC1 tem alta similaridade de sequência a proteína de excisão de reparo de levedura RAD10.
H96724	Hs.81988	15,235 - 3476	10,218 - 4648	23,300 - 128	Human mitogen- responsive phosphoprotein (DOC-2) mRNA, complete cds	Mok et al. (1994) identificou genes expressos em câncer de ovário. Dois cDNAs, denominados de DOC1 e DOC2 por eles em câncer de ovário foram encontrados expressos em tecido de ovário normal. Mas com baixa expressão ou ausentes em. Mok et al. (1998) mostraram que quando DOC2 era transfectado em linhagem celular de carcinoma de ovário, o transfectante estável mostrava uma significativa redução da taxa de crescimento e habilidade para transformar tumores em camundongo nude.

GenBank	UNIGENE	Rat10tub15 posição	Rat10nic1b posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
N24337	Hs.57649 Hs.16961 0	10,999 - 4830	12,229 - 4091	23,300 - 408	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44 é uma glicoproteína integral da membrana celular com um papel na ativação de linfócitos na matriz de adesão e linfonodos. Variantes de CD44 pode estar associado com metástase e pode ser útil na detecção precoce de potencial metastático em espécime de biopsia cirúrgica, assim como no diagnóstico precoce de câncer em programas de "screening", acessar doenças remanescentes, uma detecção precoce de recorrência .(Matsumura and Tarin, 1992). Mayer et al. (1993) mostrou que a expressão de CD44, não é encontrada em mucosa gástrica normal e é encontrada em somente 49% de tumor primário. Foi associado com metástases a distância, ao tempo de diagnóstico e com recorrência de tumores e aumento da mortalidade do câncer gástrico.
N31362	Hs.93207	14,063 - 3850	19,823 - 3032	23,300 - 204	Neurofibromin 1 (neurofibromat osis, von Recklinghause n disease, Watson disease)	Neurofibromatose do intestino leva ao sangramento gastrointestinal em pacientes e mudanças de pele impressionantes. Basu et al. (1992) apresentou evidências para a hipótese que NF1 é um gene supressor de tumor cujos produtos atuam "upstream" de RAS.
N40437	Hs.4113	22,807 - 2258	13,774 - 3778	15,000 - 144	S- adenosylhomoc ysteine hydrolase-like 1	
N47284	Sem cluster	12,132 - 4474	11,678 - 4223	10,200 - 420		
N77560	Sem cluster	12,884 - 4204	12,063 - 4133	11,900 - 283		
T74740	Sem cluster	12,129 - 4476	13,591 - 3812	12,500 - 242		
N94798	Sem cluster	13,230 - 4102	10,274 - 4636	15,000 - 143		

GenBank	UNIGENE	Rat10tub15 posição	Rat10nicbt posição	Rat10nic1 posição	Nome	Características
N41573	Hs.23255	13,495 - 4021	30,417 - 2475	20,300 - 49	nucleoporin 155kD	Em invertebrados, o complexo poro nuclear compreende de 50 a 100 proteínas denominadas de nucleoporins (Nup). Uma nucleoporin de 88-kD (Nup88) tem sido clonada e caracterizada e associada em um subcomplexo dinâmico com o nucleoporin oncogênico CAN/Nup 214. Pode ser achado como marcador de proliferação de significante potencial na avaliação histológica.
N45505	Hs.11623 7	10,271 - 4971	11,192 - 4352	10,200	vav 1 oncogene	O produto do proto-oncogene vav participa na via de sinalização ativada por vários receptores na superfície celular incluindo o receptor tipo IFN I. Na ligação ao receptor tipo IFN I, p95vav é fosforilado nos resíduos de tirosina.
N48132	Hs.3797	16,175 - 3226	10,742 - 4491	15,200 - 137	RAB26, member RAS oncogene family	Membros da família da proteína RAB são importantes reguladores de fusão vesicular e tráfico. A família RAB de pequenas proteínas G regula o tráfego das vesículas intercelular, incluindo exocitose, endocitose, and reciclagem.
N77703	Hs.95631	11,032 - 4820	14,525 - 3641	14,300 - 167	Homo sapiens cDNA: FLJ22033 fis, clone HEP08810, highly similar to HSU43374 Human normal keratinocyte mRNA	
R82691	Hs.33473 3	15,508 - 3395	11,042 - 4406	13,700 - 184	Hypothetical protein DKFZp434P14 4	
R68198	Hs.56044				EST	
T83076	Hs.17380 9	16,033 - 3263	10,861 - 4458	13,000 - 215	ESTs	
R89521	Sem cluster	13,850 - 3917	13,850 - 3414	12,000 - 274	PLACENTAL PROTEIN 11 PRECURSOR	

GenBank	UNIGENE	Ratitub15 posição	Rationict posição	Rationict posição	Nome	Características
R81942	Hs.12882 4	999,999 - 1	14,155 - 3698	11,100 - 333	oligophrenin 1	Biennu et al. (1997) identificou ua mulher com uma translocação balanceada em X;12 associado com um leve retardo mental. oligophrenin-1 contem um típico domínio de uma proteína Rho-GTPase-activating (rhoGAP), e seu domínio amino terminalé similar a uma proteína altamente conservada de função desconhecida identificada em C. elegans, camundongo e humanos.
R83233	Hs.14112 5	18,317 - 2804	10,549 - 4555	13,900 - 177	ESTs, Weakly similar to ALU8_HUMAN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMINATI ON WARNING ENTRY [H.sapiens]	
R85150	Hs.3796	13,596 - 3984	10,629 - 4525	13,000 - 216	Homo sapiens mRNA for Eph-family protein, complete cds (EphB6) HUMAN KINASE-DEFECTIVE Eph-FAMILY RECEPTOR PROTEIN; HEP	A proteína EPHB6 tem similaridades estruturais aos receptores tirosina quinase da família Eph, mas não possuem rtesíduos essenciais aatividade de tirosina. O EPHB6 foi fortemente expresso no cérebro e pancreas. Associação com estágio do tumor RB em pacientes de acordo com a idade.
R89790	Hs.33327 7	12,610 - 4302	12,255 - 4084	12,100 - 270	ESTs, Highly similar to AF137372 1 ras-related protein RAB18 [H.sapiens]	
R90884	Hs.77443	11,747 - 4606	12,278 - 4079	18,300 - 71	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	
R98517	Hs.7644	13,090 - 4139	16,334 - 3385	11,600	HISTONE H1D family, member 2	Histonas são as proteínas nucleares básicas responsáveis pela estrutura nucleossomica dentro da fibra cromossomalem eucariotos

GenBank	UNIGENE	Ratitub15 posição	Rationict posição	Rationict1 posição	Nome	Características
R70132	Hs.30362 7	11,184 - 4778	16,626 - 3343	10,300 - 399	Heterogeneous nuclear ribonucleoprote in D (AU-rich element RNA- binding protein 1, 37kD)	Telomerase é uma ribonucleoproteína que sintetiza DNA telomérica em pontas cromossômicas. Para investigar o papel da telomerase no câncer de próstata ao nível celular, a expressão de uma dos complexos de ribonucleoproteínas, o RNA componente de telomerase humano (hTR), se estudou em tecidos de próstata normal, preneoplásica e canceroso.
R72548	Hs.22410	11,400 - 4701	12,338 - 4066	12,000 - 275	ESTs, Weakly similar to A54849 collagen alpha 1(VII) chain precursor [H.sapiens]	
R76298	Hs.1499	11,175 - 4780	10,841 - 4464	10,100 - 428	heat shock transcription factor 1	
R77311	HS.9295	10,818 - 4878	11,580 - 4247	13,800 - 179	Elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams- Beuren syndrome)	Elastin é composta grandemente de glicina, prolina e outros resíduos hidrofóbicos e contém múltiplos derivados cross-ligados de lisina tais como desmosinas. Demonstrado em alguns tipos de carcinomas.
R80064	Hs.62399	12,328 - 4694	12,966 - 3928	13,600 - 188	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	T200 glycoprotein, também conhecida como "leukocyte- common antigen" (LCA), ou CD45, é o principal leucócito de alto peso molecular. É uma proteína fosfatase tirosina integral da membrana. Pode ser usado como um marcador antigênico com o qual tumores hematopoiéticos indiferenciados podem ser identificados.
R80470	Hs.75929	14,194 - 3791	18,510 - 3144	10,800 - 358	Cadherin 11, type 2, OB- cadherin (osteoblast)	Caderinas são um grupo de glicoproteínas da superfície celular que medeia a adesão célula-célula dependente de Ca (2+)

Tabela 16: Detalhes de 68 genes dos 104 com expressão elevada que se mostraram concordantes entre as 3 análises de câncer colorectal em membranas GDA.

Figura 28: Diagrama representativo da sobreposição dos genes com perda de expressão em tecido tumoral para as 3 análises com membranas GDA.

GenBank	UNIGENE	rationoa9/ posição	rationicnan/ posição	rationic2/ posição	Nome	Características
H12075	Hs.29585 0	12.826 - 7764°	14.421 - 3285°	12.800 - 79°	ESTs, Weakly similar to T50633 hypothetical protein DKFZp762F1811.1 [H.sapiens]	
H12682	Hs.12968 3	17.842 - 5516°	23.835 - 2.048°	26.200 - 8°	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (homologous to yeast UBC4/5)	A modificação de proteínas com ubiquitina é um importante mecanismo celular para ter como alvo proteínas de vida curta ou anormais para a degradação por 26 S proteassomo.
H44733	Hs.90408	999.999 - 2.0°	12.107 - 3.854°	13.900 - 56.0°	Neogenin (chicken) homolog 1	Uma proteína com aproximadamente 50% de identidade de aminoác. a DCC (120470); foi demonstrado um padrão dinâmico de expressão no desenvolvimento do sist. nervoso e gastrointestinal de galinhas. Induzida em diferenciação terminal.
H44888	Hs.57483	19.121 - 5.138°	16.365 - 2.941°	13.800 - 57.0°	Homo sapiens cDNA FLJ14294 fis, clone PLACE1008181	
H47146	Hs.59544	10.396 - 8851°	18,174 - 2655°	15,100 - 35°	Excision repair cross- complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	Conservado em camundongo e em leveduras. ERCC1 homologo, RAD10, sugere uma importante função biológica. Cleaver (1994), apontou que o gene ERCC1 não tem sido encontrado associado com qualquer doença humana específica e foi somente indiretamente dito ser essencial.
H50774	Hs.8088	11,685 - 8393°	10,697 - 4285°	10,400 - 192°	Similar to S. cerevisiae Sec6p and R. norvegicus rsec6	
H84844	Sem cluster	12,570 - 7905°	10,376 - 4391°	10,100 - 211°		
H27777	Hs.32417 8	16,597 - 5938°	Hs.6660 - 3733°	11,300 - 132°	Hypothetical protein MGC2745	

GenBank	UNIGENE	rationoa9 /posição	rationicnan/ posição	rationic2/ posição	Nome	Características
N28396	Hs.12892 7	201,479 - 89°	15,016 - 3162°	13,500 - 59°	Homo sapiens cDNA FLJ13903 fis, clone THYRO1001854	
N30471	Hs.11242 3	12,299 - 8053°	10,843 - 4254°	14,000 - 52°	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp58611420 (from clone DKFZp58611420); partial cds	
N57249	Hs.78596	14,647 - 67273°	19,652 - 24255°	19,200 - 14°	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	Proteasomes é o complexo proteolítico responsável pelo complexo que histocompatibilidade principal (MHC) de classe I- restrito a apresentação do antígeno.
R22272	Hs.86022	12,779 - 7783°	12,098 - 3857°	10,600 - 179°	ESTs	
R26320	Hs.81008	52,720 - 1778°	52,720 - 3355°	14,200 - 46°	Filamin B, beta (actin- binding protein-278)	O complexo platelet GpIb medeia a aderência de plaquetas ao sítio injúria vascular através da ligação de GpIb-alpha ao fator subendotelial von Willebrand.
R31243	Hs.25059 4	11,639 - 8418°	13,085 - 3595°	12,400 - 87°	ESTs, Weakly similar to 1207289A reverse transcriptase related protein [H.sapiens]	
R55439	Sem cluster	880,988 - 6°	14,818 - 3201°	12,000 - 99°		
R66687	Hs.750	69,510 - 1200°	12,125 - 3847°	13,200 - 66°	Fibrillin 1 (Marfan syndrome)	Fibrillin é o principal elemento constitutivo das microfibrilas extracelulares e tem ampla distribuição nos tecidos conectivos elásticos e não elásticos por todo o corpo.
R77028	Hs.1116	21,934 - 4420°	12,629 - 3310°	12,800 - 78°	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	Crowe et al. (1994) demonstrou que proteínas relacionadas ao receptor do fator de necrose tumoral, (TNF), é o receptor humano para heterodímeros de lymphotoxin-alpha e lymphotoxin-beta.
T87017	Sem cluster	10,658 - 8787°	10,085 - 4490°	10,000 - 220°		

GenBank	UNIGENE	rationoa9 /posição	rationicnan/ posição	rationic2/ posição	Nome	Características
R87886	Hs.17973 5	28,612 - 3337°	25,433 - 1909°	13,400 - 60°	Ras homolog gene family, member C;APLYSIA RAS-RELATED HOMOLOG 9; ARH9 ONCOGENE RHO H9; RHOH9 RHOC	<p>A superfamília Ras de pequenas proteínas de ligação a GTP compreende um grande grupo de proteínas envolvidas em tradução de sinal, proliferação, vesicle trafficking, e regulação do citoesqueleto de actina. Madaule and Axel (1985) identificaram uma nova família de genes Ras genes, o gene Rho, relacionado a um gene originalmente identificado em Aplysia.</p> <p>Proteínas Rho foram relacionadas a regulação de múltiplos processos de tradução de sinal. Alguns dos membros desta família incluindo o gene rho de Aplysia californica e genes humanos (rhoA, rhoB and rac-1), são proto-oncogenes desde que propriamente mutados. Eles podem induzir a transformação celular e gerar células transformadas por rho. São tumorigenic quando inoculadas em camundongos. Além disso, para a sua atividade tumorigenica, há evidências sugerindo que proteínas Rho podem contribuir para o fenótipo metastático.</p>
W17249	Hs.12152 9	10,842 - 8737°	10,520 - 4337°	15,100 - 34°	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	<p>A família desse gene codifica um grupo de proteínas que funciona como fatores de transcrição sob condições fisiológicas e, se for expressa aberrantemente pode causar transformação celular.</p>

Tabela 17: Número de acesso ao Genbank para os 21 genes com decréscimo de expressão que se mostraram concordantes entre as 3 análises com membranas GDA.

NIC1	NIC2	NICBT	NICNAN	TUB15	NOA9
W 01911	H65712	T74081	H70732	R63530	H44733
AA100388	H70732	T52737	R22088	H03287	H20266
H18766	H49310	R92111	H59180	W 60704	R41373
H21568	H18883	R88553	H11144	H05491	R55439
T93230	R21064	R60600	R08306	AA040149	H12754
R20135	R73766	R48921	N21031	H16830	R39960
H50023	W07826	R47867	W 19403	R54660	R59491
R80342	H95331	R35191	R26941	H58671	H45010
T78546	R54688	R18265	N41670	AA054571	R01904
W 90692	H16160	R14667	AA156919	N68286	T99721
AA069031	H45355	R00411	R27089	R60329	R85374
AA070426	R18900	N92090	AA151396	AA059242	H04790
H66198	H23933	N80091	AA057839	N35025	W 35211
R53678	R84635	N78169	T67106	AA213651	AA039985
AA112466	N29162	N64116	H10341	T90202	R60986
H70584	R34193	N59240	T80918	AA035437	H19472
N50965	AA058898	H79188	AA126385	T85061	H68724
H70162	N35682	H78732	R33943	AA033621	AA046445
AA078915	N30471	H45010	W 02896	R40307	H46136
AA071099	H25521	H18766	AA131718	R02394	N54530

Tabela 18: Alguns clones que permanecem como apenas ESTs nos bancos de dados e estão presentes nas análises com membranas GDA.

C – ANÁLISE CONTRA BANCOS DE DADOS

1 – COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS E PÚBLICADOS PELA TÉCNICA DE AFFYMETRIX EM TECIDO DE CÓLON NORMAL E TUMORAL.

Os resultados obtidos com membranas GDA, neste trabalho, foram comparados por análises de similaridades de sequência aos padrões encontrados por Alon e col.(1999), os quais usaram arranjos de oligonucleotídeos complementares para mais que 6.500 genes humanos de tumor e tecido normal de cólon. Os autores desse trabalho estudaram o padrão da expressão em 40 tumores de cólon e 22 tecidos normais de cólon. 2000 genes foram selecionados por eles com a mais alta intensidade mínima através das amostras. Os pesquisadores analisaram a expressão para “clusters” gênicos, e isto revelou que existem grupos de genes cuja expressão está correlacionada com o tipo de tecido. Como por exemplo, 48 ESTs (seqüências de etiquetas expressas) homólogas a proteínas ribossomais estão presentes nesse conjunto de 2000 genes diferencialmente expressos. A maioria dos genes está no mesmo grupo, como esperado para genes que são regulados coordenadamente. A intensidade dos genes para as proteínas ribossomais, encontradas por eles, é relativamente baixa nos tecidos normais de cólon e alta no tecido tumoral de cólon. E esses achados estão de acordo com obsevações de outros pesquisadores (Pogue-Geile *et al.*, 1991). Encontramos consistência para nossas análises através dessas comparações, desde que à semelhança da publicação de Alon e col., identificamos um grande agrupamento de proteínas ribossomais com relativa baixa expressão em tecido de cólon normal e alta expressão em tecido tumoral de cólon (dados não mostrados). Da mesma forma, outros genes foram diferencialmente expressos em ambas as análises e serão discutidos posteriormente.

Da comparação de nossos prévios resultados com Alon e cols., através de programas desenhados no sistema UNIX (Figura 29), 443 genes com similaridades de sequência apresentaram-se diferencialmente expressos em ambas as análises usando membranas GDA e com membranas Affymetrix. Duzentos e oitenta genes em tumor de cólon e 163 genes em tecido de cólon normal. A grande maioria desses genes corresponde a ESTs. Dentre os oligonucleotídeos descritos em material e métodos estão

genes encontrados em ambas as análises e que foram testados através de RT-PCR. Além de uma grande quantidade deles que ainda estão constantemente sob análise frente aos bancos de dados, desde que é notório o avanço diário com relação ao sequenciamento do genoma e conseqüente atualização dos bancos de dados. De forma que uma EST, que hoje não possui qualquer outra informação a seu respeito, amanhã já pode ser devidamente localizada em um determinado cromossomo e fornecer mais subsídios para sua possível caracterização.

2 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM MEMBRANAS GDA VERSUS DADOS PUBLICADOS PARA ANÁLISES EM AFFYMETRIX E SAGE.

Ao compararmos os dados obtidos na análise das membranas GDA versus dados de Affymetrix e esses contrastados a Homepage de SAGE obtivemos os seguintes resultados: na comparação dos genes com aumento de expressão em tumores foram encontrados 73 clones. Dos 73 clones encontrados, 39 clones correspondiam a genes já descritos nos bancos de dados (genes conhecidos); 34 eram conhecidas como ESTs nos dados de GDA e após as comparações com Affymetrix e SAGE, 17 se mostraram similares a genes conhecidos, sendo que desses dezesse, 15 estavam presentes em pelo menos 1 análise de GDA, e 2 presentes em pelo menos 2 análises de GDA; dos 34 clones conhecidos como ESTs, 17 permaneceram como ESTs, sendo que 13 estavam presentes em pelo menos 1 das análises de GDA e 4 clones presentes em pelo menos 2 análises GDA (tabelas 19).

Alguns exemplos de genes encontrados com expressão elevada em 3 análises de GDA e também presentes nas análises de Affymetrix e SAGE encontram-se dispostos na tabela 20.

A tabela 21 apresenta os genes com expressão elevada em tumores e que encontramos presentes em pelo menos duas análises de GDA e também estavam presentes nas análises de Affymetrix e SAGE.

Entre os genes com perda de expressão em tumores nós encontramos 10 clones presentes em 3 análises de GDA, e também Affymetrix e SAGE; 26 clones presentes em pelo menos 2 análises de GDA, Affymetrix e SAGE e 6 clones presentes em pelo menos 1 análise de GDA, Affymetrix e SAGE, totalizando 42 clones consistentes entre as

análises GDA, Affymetrix e SAGE. Desses 42 clones encontrados, 31 deles eram similares a genes conhecidos, 11 deles correspondiam a ESTs para GDA e após as comparações com Affymetrix e SAGE, 10 desses clones se mostraram similares a genes conhecidos, sendo que 6 clones presentes em pelo menos 3 análises de GDA e 4 presentes pelo menos em 1 análise de GDA; 1 desses clones permaneceu como EST e está presente em pelo menos 3 análises de GDA (tabelas 22). A tabela 23 mostra alguns genes com expressão diminuída em tumores e que encontramos presentes em pelo menos 3 análises de GDA e também estavam presentes nas análises de Affymetrix e SAGE.

Alguns desses genes estão sendo testados por RT-PCR para a confirmação de sua expressão diferencial.

Algumas ESTs encontradas por nós até o momento não possuem qualquer informação mais relevante com relação as suas seqüências. Mas, no entanto mostram um nível de expressão considerável frente aos resultados obtidos através dos northern virtuais de SAGE onde aparecem expressos em diferentes bibliotecas de Câncer coloretal e também em bibliotecas de outros tipos tumorais (dados não mostrados). Existe assim a necessidade de sempre estarmos utilizando o programa Blast /NCBI para averiguarmos as possíveis informações depositadas para tais seqüências e assim decidirmos se existem formas de trabalharmos com elas e chegarmos a um bom resultado, desde que possamos localizá-las dentro de regiões informativas em algum cromossomo seqüenciado ou mesmo dentro de um clone maior com possibilidades de desenhos de oligonucleotídeos para a identificação das mesmas, por exemplo.

Figura 29: esquema geral das comparações entre as diferentes análises e sumário de alguns dos resultados obtidos. Um total de 1109 genes com diminuído nível de expressão e 5006 com aumento do nível de expressão foram utilizados na comparação através do programa de comparação de seqüências do sistema UNIX.

ANÁLISES	GENES/ESTS
1 análise GDA x Affy x SAGE	44
2 análises GDA x Affy x SAGE	18
3 análises GDA x Affy x SAGE	11
TOTAL	73

Tabela 19: Resumo dos resultados obtidos nas comparações entre as análises com GDA, Affymetrix e SAGE para os genes com expressão elevada em tumores coloretais.

GENBANK	UNIGENE	NOME	FUNÇÃO
R81942	Hs.128824	oligophrenin 1	Retardo mental ligado ao X
R88818	Hs.278633	Human glutathione transferase M2 Muscle (GSTM2) mRNA, complete cds	Enzimas responsáveis pelo metabolismo de ampla variedade de xenobioticos e carcinógenos
H66120	Hs.75573	centromere protein E (312kD) (Homo sapiens)	Transição de metáfase pr a anáfase
AA054151	Hs.119135	H.sapiens OXA1Hs mRNA	Complexo enzimático do metabolismo celular. Transferência de elétrons do citocromo reduzido para a molécula de oxigênio.
R59009	Hs.278608	Homo sapiens mRNA for KIAA0052 protein, partial cds	Expresso em diversos carcinomas
H52746	Hs.113205	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE IV PRECURSOR (HUMAN) – COX4	Enzima terminal do complexo da cadeia transportadora de elétrons
H79188	Hs.99987	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (includes overlapping antisense sequence) –ERCC2	'Excision repair complementing defective repair in Chinese hamster
R70249	Hs.1717	IG KAPPA CHAIN PRECURSOR V-III REGION (HUMAN);.	Expresso em diferentes tecidos normais e tumorais
N30932	Hs.108914	Plasminogen activator inhibitor, type I	Altos níveis provocam oclusões venosas – autossômicas dominantes
T83076	Hs.173809	EST	Encontrado somente em bibliotecas Soares fetal liver spleen 1NFLS- SAGE – (ca) de próstata
N20890	Hs.269040	EST	Super expresso em SAGE Tu98 e Tu102

Tabela 20: 11 Clones presentes em 3 análise de GDAs x Affymetrix x Sage para genes com ganho de expressão em tumores coloretais

GENBANK	UNIGENE	NOME	FUNÇÃO
R49824	Hs.77768	Human heat shock protein, E. coli DnaJ homologue mRNA,	Atua em "protein folding" e dissociação de complexos de proteínas
H70359	Hs.119662	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1	Função desconhecida. Pertence ao subgrupo do CEA (antígeno carcino embrionário)
H83983	Hs.83477	Human non-histone chromosomal protein HMG-14 mRNAs	A proteína HMG14 liga-se ao lado interno do DNA nucleossomal alterando a interação entre o DNA e o octâmero de histonas; pode estar envolvida no processo que mantém genes transcritos em uma única formação de cromatina
R43315	Hs.159161	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Pertence a super família-RAS: codifica o fator de troca (GTP/GDP) factors. Super-expressão of ARHGDIB em cel. de mamíferos causa sua captura e rompimento do citoesqueleto de actina, semelhante a inativação das proteínas Rho.
R23999	Hs.194019	Attractin	Attractin é uma glicoproteína humana do soro, que é rapidamente expressa em atividades de células T e é liberado extracelularmente após 48 a 72 horas.
R80286	Hs.173609	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7	Função desconhecida e é localizada em subgrupo do CEA
R62721	Hs.101854	Human endothelial-monocyte activating polypeptide II mRNA, complete cds.	Indutor do fator procoagulante em células endoteliais. "Characterization of a novel tumor-derived cytokine: endothelial-monocyte activating polypeptide II". <i>J. Biol. Chem.</i> 269: 25106-25119, 1994

Tabela 21: Clones presentes em 2 análises de GDAs x Affymetrix x Sage para genes com ganho de expressão em tumores coloretais.

ANÁLISES	GENES/ESTS
1 análise GDA x Affy x SAGE	6
2 análises GDA x Affy x SAGE	26
3 análises GDA x Affy x SAGE	10
TOTAL	42

Tabela 22: Resumo dos resultados obtidos nas comparações entre as análises com genes com perda de expressão em análises GDA, Affymetrix e SAGE.

GENBANK	UNIGENE	NOME	FUNÇÃO
N29018	Hs.2287 / Hs.167503	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription (STAT5) mRNA, complete cds.	STATs são proteínas que servem para dupla função de sinal de transdução e ativadores de transcrição em células expostas a sinalização por polipeptídeos. Foram identificadas e purificadas de proteínas Stat humanas ativadas em respostas a interleucina-2. "Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts". Br J Cancer. 1995 Apr; 71(4):840-4. Watson CJ, Miller WR.
R71741	Hs.32225	IG GAMMA-1 CHAIN C REGION (HUMAN);.	IgA é uma classe de imunoglobulina predominante em secreções do corpo, tais como saliva, lágrimas, secreções bronquiais, da mucosa nasal, fluido prostático, secreções vaginais e mucosa do pequeno intestino.
N30471	Hs.112423	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586I1420 (from clone DKFZp586I1420)	Produto: proteína hipotética
AA181061	Hs.73508 / Hs.180255	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC): são proteínas heterodiméricas alfa/beta da superfície celular cuja função é apresentar antígenos estranhos processados para as células.
N24477	Hs.251397	M27749 IMMUNOGLOBULIN-RELATED 14.1 PROTEIN PRECURSOR (HUMAN);, mRNA sequence	Transporte de proteínas da membrana plasmática de plantas.
R87886	Hs.179735	Ras homolog gene family, member C	A superfamília Ras de pequenas proteínas "GTP-binding" compreendem um grande grupo de proteínas envolvidos em sinal de transdução, proliferação, tráfico vesicular e regulação do citoesqueleto de actina.
H51983	Hs.272620	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	As "human pregnancy-specific glycoproteins (PSGs)" são um grupo de moléculas que são principalmente produzidas pela placenta durante a gravidez e fazem parte da família do antígeno(CEA), que pertence a superfamília de imunoglobulinas.
N56656	Hs.151236	Homo sapiens D13S106 mRNA for a highly charged amino acid sequence	D13S106E : uma proteína altamente carregada.

Tabela 23: Clones presentes em 3 análises de GDAs x Affymetrix x Sage para genes com perda de expressão em tumores coloriais.

D - VALIDAÇÃO COM A TÉCNICA DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

I - MICRODISSECÇÃO E VALIDAÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS.

Após as amostras de tumor de cólon descritas em Material e Métodos para os experimentos de RT-PCR semiquantitativa serem selecionadas em cirurgia, procederam-se as microdissecções (como descrito em material e métodos) Todo o procedimento foi realizado por um patologista do Hospital do Câncer – A.C. Camargo, o Dr. Fernando Soares, que nos deu a confiabilidade de haver na peça acima de 85% de tecido tumoral.

Em nossos experimentos testamos todos os oligos desenhados inicialmente para este propósito (pelo menos uma vez) e observamos que a diferença de expressão entre tecido normal e tumoral a princípio não se comprovava. Isto devido inicialmente a contaminação por DNA genômico e posteriormente devido a ciclagem utilizada nos experimentos. Com diferentes testes de ciclagem da reação de PCR, observamos que existia para cada par de oligonucleotídeos e amostras trabalhadas, um número de ciclo ideal onde não se dava a saturação do material amplificado das amostras na reação de PCR e então as diferenças de expressão na RT-PCR semiquantitativa começaram a aparecer. Esse período de testes foi bastante longo e laborioso, e aqui estaremos colocando alguns exemplos ilustrativos.

A figura 30 nos mostra o esquema representativo do desenho experimental montado para os testes com RT. As figuras 31, 32 e 33 mostram os resultados de validação das amostras utilizadas. As amostras que não apresentaram contaminação por DNA genômico foram utilizadas nos experimentos. Aquelas que apresentaram indícios de contaminação foram submetidas novamente a tratamento com DNase-I, como no exemplo da canaleta 9 na figura 31-B.

Figura 30: Esquema ilustrativo para as etapas efetuadas durante o preparo das amostras e experimentos de RT-PCR para os clones diferencialmente expressos em nossas análises.

Figura 31: A) Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, onde foi resolvida a reação de PCR para o fragmento compreendido entre os introns 5-6 do gene p53. Da esquerda para a direita estão as amostras pareadas de carcinoma de cólon e tecido normal tratadas (+) e não tratadas (-) com DNase-RNase free. PM (100bp-GIBCO-BRL), peso molecular; nas duas primeiras canaletas estão os controles com e sem DNase. B) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, onde foram resolvidos os produtos da reação de PCR para os exons 2-4 do gene p53. (+) corresponde ao controle positivo para amplificação (cDNA de RNA não tratado), de 1-11, amostras de carcinoma coloretal e tecido normal coloretal tratadas com DNase, (-) controle negativo para amplificação; na canaleta 9 um exemplo de amostra com contaminação com DNA genômico.

Figura 32: Autoradiogramas da técnica de Southern-blot realizada para validação das amostras com sondas para o gene mitocondrial *D-loop*. A) southern-blot de amostras não tratadas com DNase-RNase-free; B) southern-blot após o tratamento das amostras com DNase-RNase-free; C, corresponde ao controle positivo da reação (cDNA de RNA não tratado).

Figura 33: A) gel de formaldeído 1,5% corado por brometo de etídeo, com as amostras de RNA total de amostras coloretais escolhidas para as análises com RT-PCR. B) Autoradiograma da hibridização com sonda para o gene constitutivo *GAPDH*, das amostras coloretais escolhidas para as análises com RT-PCR.

2 – RT-PCR SEMIQUANTITATIVA PARA OS CLONES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS ANÁLISES DE TUMOR COLORETAL EM MEMBRANAS GDA.

A tabela 24 dispõe os clones diferencialmente expressos confirmados por RT-PCR semiquantitativa.

O primeiro clone testado por nós foi a **EST H70732** que apresentou expressão diminuída em tumores coloretais e ocupa o primeiro lugar na análise NICNAN e o sétimo lugar na análise NIC2. Na Figura 34 (A) podemos ver os resultados obtidos na RT-PCR semiquantitativa quando foram utilizados 25 ciclos, a **EST H70732** e o gene constitutivo **GAPDH**, usado para a normalização das amostras; em (B) observamos os resultados obtidos quando usamos 20 ciclos na reação, é possível observar a perda de sensibilidade.

Com os experimentos referentes à localização citogenética dessa EST através da utilização de um painel de híbridos “Radiation Hybrids” (Research Genetics) nós localizamos esta EST exatamente no marcador SHGC-56723(D), com um “Lod score” de 19.40 e distância zero no braço longo do cromossomo 9 (9q21-22) (figura 35, 36 e 37).

Através de uma pesquisa pelo programa Blast-HTGs (NCBI) pudemos comprovar a presença desse segmento dentro do cromosso 9 e sua presença dentro de 2 clones: AL160268 e AL160278. Ao localizarmos nossa seqüência dentro do clone AL160278 tomamos uma grande região deste local caminhando de 3’a 5’ dentro deste clone e a analisamos em programas para determinação de regiões codificadoras. Para isto usamos 3 programas diferentes, e apenas em um deles, o **GrailEXP v3.0 Exon Candidates**, foi possível encontrar uma região para um possível exon e nenhuma região promotora ou poly A (dado não mostrado).

GBACC	UNIGENE	NOME DO GENE
H70732	Hs.269821	<i>EST</i>
R81942	Hs.128824	<i>Oligophrenin-1</i>
H79188	Hs.99987	<i>ERCC2</i>
N93218	Hs.180919	<i>DNA-Binding Protein Inhibitor ID-2</i>
R63530	Hs.28426	<i>EST</i>
H05902	Hs.87908	<i>Snf2-related CBP activator protein</i>
H45773	Hs.181062	<i>serum amyloid A1</i>
W60704	Hs.7862	<i>hypothetical protein FLJ20312</i>

Tabela 24: Lista dos clones diferencialmente expressos confirmados por RT-PCR semiquantitativa.

Figura 34: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidas os produtos das RT-PCRs para a EST H70732, utilizando as amostras pareadas de tumor colorectal. A) Amplificação por RT-PCR para H70732 e GAPDH com 25 ciclos e B) amplificação das mesmas seqüências com 20 ciclos. PM, peso molecular 100bp (GIBCO-BRL); amplificação para H70732 na altura de 273 pares de bases.

Figura 35: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, onde foram resolvidos os produtos das amplificações dos controles dos painéis de híbridos. 1- G3A3 – célula de hamster não irradiado; 2- G3RM – linhagem celular linfoblástico humana; 3 -HFL - humano; 4- A23 - hamster; 5- controle sem DNA (No DNA). Peso molecular usado é o 100bp (GIBCO-BRL).

Figura 36: Produtos da amplificação do painel de híbridos com os pares de oligonucleotídeos para a EST H70732 , resolvidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Cada banda resolvida foi codificada com o número 1 e os produtos que não mostraram amplificação foram representados com o número zero, Por esse código era possível identificar o marcador correspondente ao gene. O peso molecular usado é o 100bp (GIBCO-BRL).

Figura 37: Esquema ilustrativo da localização da EST H70732 no cromossomo 9 (9q21-22). No esquema é possível se localizar os marcadores SHGC-56723 e SHGC-30306 e algumas doenças relacionadas a outros marcadores que se encontram muito próximos a eles.

Outro gene identificado como diferencialmente expresso por GDA e confirmado por RT-PCR semiquantitativa como altamente expresso em carcinoma colorretal é o gene “Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)”. Este é o 28º clone mais expresso em Nicbt e o 4º clone mais expresso Nic1 e ocupa o 3041º na análise Tub15. A figura 38 (a) nos mostra o resultado de uma RT-PCR correspondente ao gene *ERCC2* (H79188) resolvida em um gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, onde utilizamos as amostras de escolhidas para a RT-PCR. Pudemos observar uma diferença bem visível entre os tecidos normais e tumorais testados. Através da ferramenta “northern” virtual (SAGE -Homepage www.sagenet.org) para o clone H79188(Unigene Hs.99987) o encontramos expresso na biblioteca SAGECaco2 , SageSW837, SAGE RKO (tumores de cólon) e SAGE TSU (tumor de próstata). A Figura 39 mostra o clone N93218 (UNIGENE Hs. 180919) diferencialmente expresso através da técnica RT-PCR, referente ao gene “inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein”. A figura mostra a amplificação por RT-PCR deste clone com 28 e 23 ciclos de reação. Este é o segundo 2º mais expresso na análise Tub15 e se encontra expresso nas bibliotecas SAGEOVP-5 (tumor de ovário) e SAGELN-1 (tumor de próstata) Esta proteína Id (inibidor de ligação ao DNA) regula a transcrição durante o desenvolvimento pela interação com fatores de transcrição. Três genes humanos, os ID1, ID2 e ID3 foram identificados e pertencem a essa família de reguladores de transcrição.

Na Figura 40 podemos ver a EST R63530, que por RT-PCR apresentou um elevado nível de expressão em tumores, aparecendo como o 3º clone mais expresso na análise Tub15. As fotos das RT-PCRs mostram as amplificações para este clone com 23 ciclos de reação e para o gene constitutivo *GAPDH*.

Na figura 41 está a RT-PCR para o gene constitutivo *GAPDH* e para o clone H05902 (Hs.87908) correspondente ao gene que codifica para “Snf2-related CBP activator protein”, que apresentou expressão elevada em tumores colorretais quando comparados aos tecidos normais colorretais, sendo o 11º clone com ganho de expressão em Tub15.

A figura 42 mostra a RT-PCR para o clone H45773 (Hs.181062) correspondente a proteína “serum amyloid A1” utilizando amostras de tumor colorretal e respectivos

tecidos. Este é o 8º clone mais expresso em Nic1. A análise de RT-PCR para o clone W60704 (Hs.7862) correspondente à proteína Hipotética FLJ20312, que ocupa o quinto lugar entre os mais expressos na análise Tub15, é mostrada sua na figura 43. Outro clone que comprovamos através da RT-PCR foi o correspondente ao gene “*Oligophrenin-1*” (acesso R81942 no GeneBank). Este gene apresentou uma elevada expressão nas 3 análises GDAs individuais e também nas análises com os 6 pares de tumores individuais testados por RT-PCR. “*Oligophrenin-1*” (Gene Bank access R81942 and Unigene Hs.128824) foi o mais altamente expresso em uma das análises de GDA (Tub15) (razão =99.9999) e foi também, encontrado como o 333º mais expresso em NIC 1 (razão =11.100) e ocupa o 3699º na análise NICBT (razão = 14.155). Nessas membranas, qualquer ponto com uma medida de razão(ponto/ponto) maior que 5 vezes deve ser considerado significante.

Na figura 44 podemos ver a diferença de expressão encontrada para o gene “*Oligophrenin-1*” em tumores coloretais individuais. Uma típica digitalização por Phosphorimager de um dos experimentos com o pool de 3 tumores em comparação ao seu respectivo tecido normal pode ser vista na figura 45. A imagem digitalizada demonstra alteração na expressão do cDNA *Oligophrenin-1* (indicado na marcação feita pelos círculos no gene correspondente).

Nós testamos a expressão do gene “*oligophrenin-1*” através da técnica de RT-PCR semiquantitativa em pares de tecidos normais e tumorais de mama, estômago, pulmão, laringe, tireóide e próstata. O resultado das RT-PCRs para “*oligophrenin-1*”, com estas amostras mostrou uma perda de expressão para este gene em tumor de mama, pulmão e estômago. Nenhuma diferença foi vista em tumor de laringe e uma leve diferença pôde ser observada em tumor de tireóide e próstata. O produto desta RT-PCR resolvido em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata pode ser visto na figura 46. A expressão de *Oligophrenin-1* pelo que nossos resultados nos levam a crer parece ser mais inerente aos tumores de cólon, onde a diferença de expressão é mais acentuada.

Dados de comparação a SAGE mostraram uma forte expressão deste gene em biblioteca de carcinoma de próstata SAGE CPDR LNCaP-T (prostate carcinoma cell line).

Figura 38: RT-PCR para o clone H79188 correspondente ao gene ERCC2 - "Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2" (xeroderma pigmentosum D). Gel de poliacrilamida 6% coradas pela prata onde se encontram resolvidos os produtos das RT-PCRs para o clone H79188, utilizando as amostras pareadas de tecido coloretal. Este é o 40° clone com ganho de expressão em GDA1.2-pool de 9 tecidos tumorais (Nic1) de cólon x mistura de 9 tecidos normais e em 28° GDA 1.2-mistura de 3 tecidos tumorais de cólon x pool de 3 tecidos normais (Nicbt) e o 3041° em GDA 1.3-pool de 3 tecidos x pool de 3 tecidos normais coloretais. PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL).

Figura 39: RT-PCR para o clone N93218 (Unigene Hs. 180919 H. sapiens: - "DNA-BINDING PROTEIN INHIBITOR ID-2"). A) Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidas os produtos das RT-PCRs para o clone N93218, utilizando amostras de tumor coloretal e respectivos tecidos normais. Este é o 2º clone com ganho de expressão em GDA1.3 com mistura de 3 tecidos tumorais de cólon x misturas de 3 tecidos normais. PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL).

Figura 40: RT-PCR clone R63530 correspondente ao a EST. A) Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidas os produtos das RT-PCRs com 23 ciclos para o clone R63530 (~110pb), utilizando amostras de tumor de cólon e respectivos tecidos. Este é o 3º clone com ganho de expressão em GDA1.3-e mistura de 3 tecidos tumorais de cólon x pool de 3 tecidos normais. . PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL).

Figura 41: RT-PCR clone H05902 (Hs. 87908) correspondente ao gene que codifica para a "Snf2-related CBP activator protein". A) Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidos os produtos das RT-PCRs com 22 ciclos para o clone H05902 (~110pb), utilizando amostras de tumor de cólon e respectivos tecidos. Este é o 11º clone com ganho de expressão em GDA1.3 e mistura de 3 tecidos tumorais x mistura de 3 tecidos normais coloretais. . PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL).

Figura 42: Reação de RT-PCR para o clone H45773 - Hs.181062 correspondente à proteína "serum amyloid A1". Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidos os produtos das RT-PCRs com 22 ciclos para o clone H45773 (~110pb), utilizando amostras de tumor de cólon e respectivos tecidos; e o produto da RT-PCR para o gene constitutivo *GAPDH*. Este é o 8º clone com ganho de expressão em GDA1.2 e mistura de 9 tecidos tumorais de cólon x mistura de 9 tecidos normais. . PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL)

Figura 43: Reação de RT-PCR para o clone W60704 - Hs.7862 correspondente à proteína "hypothetical protein FLJ20312" -. A) Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidos os produtos das RT-PCRs com 22 ciclos para o clone W60704 (~110pb), utilizando amostras de tumores coloretiais e respectivos tecidos normais e RT-PCR para o gene constitutivo *GAPDH*. Este é 5º clone com ganho de expressão em GDA1.3-com mistura de 3 tecidos tumorais de cólon x misturas de 3 tecidos normais. PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL)

Figura 44: Reação de RT-PCR para o gene "*oligophrenin-1*". Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata onde se encontram resolvidos os produtos das RT-PCRs com 28 ciclos para o clone R81942 (~273pb), utilizando amostras de tumor de cólon e respectivos tecidos normais. e a amplificação do gene constitutivo *GAPDH* usado como controle interno para normalização, amplificação obtida com 23 ciclos. PM, peso molecular 100bp (Gibco-BRL)

GBACC	R81942		
UNIGENE	Hs.128824		
ANALISES/GDA	NIC1	NICBT	TUB15
COLOCAÇÃO	333	3699	1
RAZÃO	11.100	14.155	99.9999

Tabela 25: Resultados das análises de GDA para o gene "*oligophrenin-1*".

Figure 45. Imagem digitalizada produzida em phosphorimager para uma análise de cDNA microarrays (GDA) usando amostras de tumor coloretais. A imagem foi alinhada para mostrar as mudanças visualmente aparentes na expressão gênica. (A) membrana GDA sondada com uma mistura de 3 tecidos normais de cólon e (B) membrana sondada com mistura de 3 tumores de cólon. O círculo indica o gene "*oligophrenin-1*", que mostrou aumento da expressão em amostra tumoral de cólon.

Figura 46: RT-PCR semiquantitativa para o gene “*oligophrenin-1*” em diferentes tecidos tumorais.

A) RT-PCR para o gene “*oligophrenin-1*” usando diferentes tipos tumorais: da esquerda para a direita pares de tumores e tecidos normais de mama, pulmão, laringe, estômago, tireóide, próstata. Para este resultado foram usados 28 e 23 ciclos na RT-PCR; produto aplicado de cerca de 273 pares de bases; B) RT-PCR para o gene GAPDH usando diferentes tipos tumorais. Para este resultado foram usados 23 ciclos na reação de RT-PCR; o produto amplificado possui cerca de 195 pares de bases.

Da mesma forma que foi realizado para o gene “*oligophrenin-1*”, testamos a expressão de *ERCC2* em amostras de diferentes tipos tumorais. O resultado da RT-PCR revelou este gene diferencialmente expresso nas amostras de câncer de mama, estômago, pulmão, laringe, próstata e tireóide (dado não mostrado).

Usando o “Virtual Northern Tool” da SAGE “homepage” (<http://www.ncbi.nih.gov/SAGE>) nós comparamos os resultados do gene *ERCC2* com informações de outras bibliotecas. Este instrumento extrai possíveis “SAGE tags” e sinal de orientação (“poly A signal e tail”) de qualquer entrada de seqüências de mRNA/cDNA. A mais provável etiqueta (“tag”) para esta seqüência pode então ser selecionada baseado na orientação. Esta etiqueta é ligada ao instrumento que exibe as etiquetas expressas, o qual entre outras coisas exibe a absoluta e a relativa abundância das tags em questão e mantém os dados de experimental.

Nossos resultados mostraram concordância com os dados de SAGE. O gene *ERCC2* estava expresso em bibliotecas de cólon como SAGE Caco2, SAGE SW837, SAGE RKO, e bibliotecas como SAGE TSU (Prostata cell line), SAGE OVT-6 (primary ovarian tumour), e em outras bibliotecas no banco de dados de SAGE (Gene to Tag Mapping). Nós analisamos a expressão deste gene no banco de dados ORESTES e nós o encontramos presente em bibliotecas de carcinoma de estômago (RC1-ST0196-081099-011-b10 emb/H79188/Hs.188226 – score 115 7e-24 – identities = 98%) e tumor de cólon (PMO-CT0263-051199-005-F06 emb/H79188/Hs.188226 – score 46 0.005 – identities 96%).

E – HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA MULTIPLE TISSUE EXPRESSION ARRAY (CLONTECH), COM SONDAS PARA O GENE “*OLIGOPHRENIN-1*”.

Na figura 47 esta resolvido em gel de agarose 1%, o produto da amplificação do gene “*Oligophrenin-1*” com os oligonucleotídeos PHERv and PHEFw em tecidos de cólon normais.

Com o objetivo de testar a expressão de “*Oligophrenin-1*” em diferentes tecidos e linhagens celulares tumorais, utilizamos o sistema “Multiple tissue expression assay” da Clontech-Inc. Utilizamos um produto amplificado de “*Oligophrenin-1*” de aproximadamente 900pb marcada com o isótopo radioativo α -dCTP³², como sonda para este experimento. A figura 48 mostra a membrana digitalizada após a hibridização e exposição em phosphorimager.

Figura 47: A) Produto da amplificação do gene “*Oligophrenin-1*” com oligonucleotídeos iniciadores PHERv and PHEFw resolvido em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; B) produto amplificado após purificação em lâ de vidro. O marcador molecular utilizado neste gel foi o 100bp (GIBCO-BRL), a banda de interesse está em torno de 900pb.

Figura 48: Hibridização com *oligophrenin-1* em membranas "Multiple tissue expression array" (Clontech). O arranjo foi hibridizado por toda a noite com produto de PCR marcado randomicamente usado como sonda e com a solução de hibridização Express Hybridization Solution (Clontech). A membrana foi lavada com 2xSSC, 1%SDS a 65°C, e 0.1xSSC, 0.5% SDS at 55 °C, exposta em phosphorimager. A identidade de alguns dos tecidos com círculos coloridos e números são: 1-Lung, 2- Putamen, 3- Spleen, 4- Peripheral blood lymphocyte, 5- Trachea, 6- Pituitary, 7- Kidney, 8-Prostata, 9- Hela53, 10-Placenta, os números correspondem ao "score" da expressão de *Oligophrenin-1* nesses tecidos da membrana. O quadrado azul mostra a expressão de *oligophrenin-1* na única linhagem celular de câncer de cólon presente nesta membrana (75°). A, B e C são DNAs controles.

DISCUSSÃO

A intenção deste estudo foi encontrar genes diferencialmente expressos em câncer colorectal, quando comparados ao tecido normal correspondente. Tais genes com ganho ou perda de expressão na tumorigenese deste tipo de câncer podem ser candidatos a possíveis marcadores tumorais, e assim úteis em testes de diagnóstico precoce, prognóstico e detecção de recidivas para este tipo de câncer. Tais resultados podem também ser explorados no sentido de desenhar vias importantes de expressão gênica para esta carcinogênese, como também no descobrimento de novos genes a partir do término da sequência de ESTs que se mostraram diferencialmente expressas. Como também os genes que se mostraram com ganho de expressão podem potencialmente servir como alvos de medicamentos convencionais. Como já acontece no desenvolvimento da droga STI571 (Glivec) inibidora do oncogene bcr-abl (tirosina quinase) em tratamentos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (Gorre et al., 2001). E também no uso da droga Herceptina (Trastuzumab), um anticorpo usado contra o oncogene HER-2, encontrado altamente expresso em câncer de mama e outros carcinomas (Field et al., 2001).

Potenciais terapias podem ser preconizados com base em inibição desses genes altamente expressos; na inibição da função do produto gênico gerado por tais genes e na imunomodulação.

Como descrito na literatura, o desenvolvimento e progressão do câncer e a reversão experimental da tumorigenicidade são acompanhadas por mudanças no padrão de expressão gênica (Vogelstein & Kinzler, 1992; Levine, 1993).

Para as análises com a técnica de D.D., optamos pela extração de RNA baseada no método de RNazol, o qual nos forneceu um rendimento mensurável ainda que tenhamos tido que adaptar passos de extração para essas amostras que foram microdissecadas e que por isso mesmo forneceram muito pouco tecido para a extração. Os mRNAs extraídos apresentavam um rendimento suficiente para os testes iniciais de tentativa de padronização dos perfis de bandas pela técnica de D.D., mas a reprodutibilidade de bandas entre os perfis gerados com os conjuntos de oligonucleotídeos testados se mostrou crítica desde o início dos experimentos. Contudo, uma seleção de bandas candidatas a genes diferencialmente

expressos foi possível para a condução de um experimento piloto. Os rastros observados nas canaletas dos géis (Figura 12) foram sensivelmente diminuídas em experimentos seguintes onde se optou por diminuir a concentração do oligo-dT usado para a síntese do cDNA em cerca de 10 vezes, isto é, passamos a usar a concentração de 2,5 μ M de cada oligo-dT utilizado, bem como diminuímos a concentração do mRNA usado (foto 13). A amplificação com os oligos Ldd2 e Ltk3 foi trabalhada e mostraram-se razoáveis, embora permanecessem os problemas de reprodutibilidades.

Detectamos problemas de reprodutibilidade de bandas nos tecidos normais, onde encontramos expressão do tipo "tudo ou nada", quando comparadas às bandas dos tecidos tumorais que foram analisados em paralelo. Diferentes amostras normais foram testadas para tentar amenizar o problema e assim nos possibilitar escolher os melhores perfis de bandas gerados, mas o problema persistiu. Isto nos revelou que ainda um pequeno nível de degradação é suficiente para conturbar a reprodutibilidade entre as bandas e fornecer resultados pouco confiáveis, com grande possibilidade de obtenção de artefato. A qualidade do tecido foi testada através de gel de formaldeído corado com brometo de etídeo, e foi observado um nível razoável de degradação de RNA para essas amostras que apresentavam rastros característicos de degradação de RNA (dado não mostrado).

Os resultados preliminares das análises das seqüências geradas com a técnica D.D. mostraram uma alta semelhança com seqüências repetitivas, o que nos levou a coletar novos clones bacterianos com um prévio "screening" das colônias através de reações de PCR usando oligonucleotídeos iniciadores para o vetor de clonagem pUC (franqueadores da região de clonagem dos fragmentos). Obtivemos resultados de sequenciamento de 15 genes clonados durante as análises das amostras por D.D., com os oligonucleotídeos testados. Desses 15 genes seqüenciados foram obtidas 50 seqüências de boa qualidade para a análise de similaridades no GenBank. Para esse "screening" tomamos 5 colônias de cada placa bacteriana para a PCR e em gel de poliacrilamida corado pela prata detectamos as bandas de altura esperada para cada clone e procedemos ao sequenciamento dos clones positivos para essa reação de PCR.

Apesar de tais clones, coletados de um mesmo plaqueamento apresentarem, aparentemente, o mesmo peso molecular (Figura 17), as seqüências provenientes das bandas amplificadas se mostraram completamente diferentes umas das outras. Ao

observarmos os resultados de similaridade em “Blast” apresentados na Tabela 5 onde podemos ter uma idéia das disparidades de seqüências conseguidas. Acreditamos que muito dificilmente coletamos as bandas erradas, pois isso foi monitorado através da re-exposição do gel contra um filme de raios-X (Figura 14), após a coleta das bandas de interesse. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que haja bandas co-migrando com as bandas de interesse, e que em uma reação de PCR essas tomem alguma vantagem, proporcionando uma grande quantidade de artefatos prejudiciais à análise e confiabilidade dos resultados obtidos com essa técnica. A literatura sobre D.D. mostra algumas possibilidades de se amenizar esse tipo de problema, contudo são laboriosas e pouco eficientes (Tokuyama *et al.*, 1995; Ayala *et al.*, 1995).

Com relação ao padrão de reprodutibilidade e similaridade de bandas entre as amostras, o que podemos concluir é que tecidos tumorais (em contraste com células de cultura normalmente usadas na literatura) apresentam dificuldades devido a pobre qualidade do RNA e especificamente com relação ao estado de degradação do tecido, seja tumoral ou normal, este influencia fortemente na reprodutibilidade e similaridade de bandas alcançada entre os experimentos. Tal observação foi de grande relevância no sentido de nortear os procedimentos de coleta e armazenagem para o banco de tumores desta instituição. Agora, os cuidados são redobrados e o processo todo monitorado desde o momento de coleta da peça no ato cirúrgico até seu rápido congelamento em nitrogênio líquido, com o mínimo de manipulação possível, visto que outros projetos utilizam as peças provenientes deste mesmo banco de tumores.

As dificuldades encontradas com a técnica de RAP-PCR inicialmente usada neste trabalho, muito provavelmente possam ser explicadas, em partes, pela qualidade das amostras usadas, de forma semelhante ao descrito para D.D.(dados não mostrados). Esta técnica mostra problemas de reprodutibilidade quando aplicada em análises de grande número de amostras heterogêneas. Estudos em tecidos patológicos humanos, como câncer, apresentam várias dificuldades devido a pobre qualidade das amostras (incluindo pureza e degradação), heterogeneidade, contaminação por células não neoplásicas, e em alguns casos, baixa quantidade de moldes (Tórtola *et al.*, 1998). Já a técnica de Differential Display embora pareça teoricamente simples, a busca por bandas no gel que sejam positivas para um clone pode ser traiçoeiro. Os problemas críticos desta técnica são: o alto número de

falsos positivos, a questionável capacidade desta técnica em identificar mRNAs abundantes e raros, regiões codificantes dos mRNAs são normalmente não clonados e o processo de verificação é bastante trabalhoso e demorado e requer uma quantidade razoável de RNA. Como discutido anteriormente, muitos desses problemas foram encontrados no início deste projeto.

A expressão gênica progressivamente tem se tornado uma das principais áreas de pesquisa do câncer. Genes exibindo expressão alterada em associação com a doença são os principais alvos para investigações farmacológicas e clínicas. Várias são as técnicas disponíveis para a detecção e quantificação dos níveis da expressão gênica, como já citado anteriormente. A tecnologia de “microarray” fornece um instrumento versátil para compreender as alterações de expressão gênica, pois permite estudar os níveis de expressão em paralelo provendo informação estática sobre a expressão do gene (em qual tecido o gene está expresso) e dinâmica (como a expressão de um gene se relaciona com a de outros genes). Embora, até o momento, os “microarrays” estejam sendo usados somente para a comparação da expressão do mesmo gene em várias amostras e não para a comparação entre genes. A tecnologia de “microarray” tem se mostrado como uma técnica promissora e revolucionária. Esta é uma das últimas em uma linha de técnicas a explorar de forma simples e elegante a potente característica do DNA duplex, que se baseia na complementaridade do DNA dupla fita. O “microarray” é o método de escolha quando as seqüências de DNAs expressos são disponíveis e se intenciona avaliar a expressão de muitos genes ao mesmo tempo. Talvez, a principal vantagem desta técnica seja a de eliminar o ineficiente processo de examinar todos os mRNAs/cDNAs expressos para encontrar aqueles que se alteram e a cada tempo uma nova comparação ser necessária. Mas, da mesma forma que outros métodos envolve a necessidade de confirmação e caracterização funcional da seqüência isolada. As membranas de “microarray” comerciais têm a vantagem de serem relativamente confortáveis para trabalhar e não necessitam de nenhum equipamento especial para usá-los, embora equipamentos como “phosphorimager” sejam requeridos. A maior desvantagem, na verdade, é o fato de que a comparação de expressão entre duas amostras requer a hibridização de cada amostra em membranas separadas, ou a necessidade de reutilização das mesmas para hibridizações seqüenciais. O que não ocorre com os “arrays” em vidro, onde se pode usar dois corantes diferentes e se eliminar esse

problema. A sensibilidade dos “arrays” de colônias lisadas é limitada pela alta e média abundância de genes, ao passo que hibridização com ácido nucléico marcado por fluorescência em lâminas de “array” ou “Gene Chips” pode detectar genes de baixa abundância.

No decorrer dos experimentos para detecção de genes diferencialmente expressos em câncer colorretal optou-se por usar o Sistema de membranas de “microarray” comerciais, “Gene Discovery Array” (GDA) da Incyte genomics, Inc. e testá-las em outras amostras de câncer colorretal.

Uma grande quantidade e qualidade de resultados foram obtidas em muito pouco tempo.

A princípio a idéia era obter resultados com tumores em diferentes estágios da doença para assim de posse dos resultados tentarmos desenhar uma possível linha de expressão baseada no nível de expressão desses genes, observando possíveis variações individuais em diferentes estágios do tumor. Contudo devido à dificuldade de obtenção de tumores com quantidade suficiente de tecido para microdissecção e extração do mRNA, trabalhamos com os tumores que tínhamos disponíveis no banco de tumores desta instituição e descritos no item material e métodos.

A técnica de microdissecção dos tumores escolhida foi feita com a ajuda de um patologista do hospital A.C. Camargo (Dr. Fernando Soares) e mostrou resultados adequados na obtenção de somente áreas tumorais livres de contaminações com tecidos normais adjacentes ao tumor (mucosa normal, musculatura, etc...) que poderiam interferir nas análises dos resultados da D.D (Differential Display) e posteriormente nos experimentos de “microarray”. Uma estimativa é de cerca de 85% de tecido tumoral após a microdissecção.

Muitos estudos são feitos comparando a expressão gênica em tumor e tecido normal, entretanto não se sabe como muitos genes são expressos diferencialmente nas células normais em comparação as células tumorais. Se o conjunto dessas diferenças é característica das células ou ao contrário dependem do microambiente do tumor, e se a maioria das diferenças são células tipo específicas ou específicas do tumor. Essas novas tecnologias, tais como “microarray”, tornam possível responder essas questões. Os “microarrays” de DNA fornecem um poderoso instrumento para estudar esses fenômenos

aparentemente tão complexos (Skena, *et al.*, 1996) . Esta metodologia apresenta a possibilidade de estudar um tumor individual ou de centenas de espécimes de pacientes em diferentes estágios da doença para assim se poder estabelecer o diagnóstico, prognóstico e importância de cada gene emergente candidato a gene envolvido em processos neoplásicos. Cerca de 60,000 alvos seriam necessários para o monitoramento de todo o genoma humano, sendo provável que um menor número de alvos, tais como 10,000, seriam adequados para a maioria dos tecidos.

Neste trabalho foram usados arranjos que abrangem um número de 18,376 clones alvos para a análise de expressão gênica em câncer coloretal. Esse número é suficiente para que se possa ter uma ampla idéia dos processos gênicos envolvidos no desenvolvimento dessa neoplasia.

A quantidade de mRNA poli-A necessária para uma ótima hibridização com os filtros GDA (Gene Discovery Array) foi de 2,5µg, uma quantidade relativamente grande para ser conseguida em uma única amostra tumoral, com raras exceções. Visto isso, e também o fato de estarmos trabalhando com tumores em estágios próximos de desenvolvimento o que talvez nos desse uma maior representatividade gênica, e teoricamente muito “semelhantes”, compreendemos a utilidade de se trabalhar com misturas de tumores coloretais. O uso de misturas tem uma tendência em identificar os genes que são freqüentemente alterados e não simplesmente as alterações que acontecem somente em tumores individuais. Dessa forma foi realizado um primeiro experimento utilizando uma mistura de 9 tumores coloretais, onde observamos um relativo baixo número de genes diferencialmente expressos e uma razão relativamente baixa para os genes com diferença de expressão entre as misturas normais e tumorais (Figura 19, 23-A e tabelas 8 e 11). Neste experimento encontramos 432 genes com ganho de expressão contra 223 genes com perda de expressão. Isto nos levou a indagar sobre a validade da utilização de misturas muito grandes de amostras, sugerindo um certo mascaramento de expressão gênica, ou melhor, uma diluição da expressão de genes que possuem uma alta expressão diferencial, mas encontra-se em menor representatividade dentro da mistura de tecidos. Isto é, com um menor número de cópias em relação a outros com maior números de cópias, mas com baixa expressão.

Dessa forma procedemos a outros experimentos nos quais foram usadas misturas de 3 tumores coloretais e seus correspondentes tecidos normais também em forma de misturas. Em outro experimento foi usado um único tumor para hibridizar uma das membranas e o seu tecido normal correspondente para a hibridizar a outra membrana. Infelizmente, os resultados do último experimento citado não puderam ser analisados pela GSI, devido a problemas na captação da imagem, contudo visualmente as membranas apresentavam um maior número de clones hibridizados. Já o experimento com o pool de 3 tumores em membranas GDA 1.3 (Tub15/Noa9) nos confirmou as desconfiças com relação à diluição de expressão gênica (Figuras 21, 23-C e tabelas 6 e 9). Muitos mais genes revelaram-se diferencialmente expressos e com uma razão mais elevada, como pode ser visto ao compararmos as tabelas relativas a esses 3 experimentos (tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11), as razões mostram valores bem mais elevados. Quatro mil novecentos e oitenta e quatro genes apresentaram ganho de expressão e 8886 genes apresentaram perda de expressão nessa análise. A mesma mistura de 3 tumores também foi usada para testar a reutilização das membranas GDA 1.2, e nos mostrou que um certo número de clones é realmente perdido pelas lavagens das mesmas e isso afeta em partes os valores de razão obtidos. A perda total parece não exceder 10% dos clones ao final de 3 lavagens das membranas, número divulgado pela própria Incyte genomics para a reutilização dessas.

Os experimentos acima discutidos mostram a possibilidade de reutilização das membranas GDA e a visível diluição da expressão gênica na mistura de 9 tumores. Como também revela a existência de características individuais presentes nos tumores e a necessidade de grande atenção nos ensaios conduzidos com misturas tumorais.

Através da análise do gráfico de dispersão feito para as três análises individuais, podemos ter uma idéia da distribuição dos genes encontrados como diferencialmente expressos (Figura 23). A análise realizada com a mistura de 9 tecidos tumorais em membranas GDA 1.2 apresenta um gráfico onde os pontos correspondentes aos genes apresentam-se mais concentrados em uma razão média (Figura 23-A). De forma diferente é o comportamento dos gráficos representativos das 2 outras análises, onde o tamanho das misturas foi reduzido e assim as diferenças individuais preservadas em cada amostra tumoral participante da mistura (Figura 23 B e C). Para esses gráficos usamos valores de razão acima de 10,0 para cada experimento. Podemos observar que a grande maioria dos

genes, como seria de se esperar, concentra-se numa razão média de expressão, sendo poucos os genes que se sobressaem com uma razão de diferença elevada, seja com relação à expressão em tumores (ganho de expressão) ou tecidos normais (perda de expressão).

Os genes foram classificados por categorias gênicas, mediante o uso de um programa de certa forma limitante, mas ainda assim útil para esse propósito. Agrupamos os genes das três análises que apresentaram ganho de expressão e perda de expressão e distribuímos nas categorias do programa. Para os genes com ganho de expressão em câncer colorectal encontramos 28,53% deles concentrados na categoria de genes envolvidos em comunicação celular, seguidos de 22,70% na categoria de genes envolvidos no metabolismo, 13,09% para os genes do metabolismo de proteínas, 12,47% na categoria de mobilidade celular, 6,33% dos genes fazem parte de resposta de defesa celular 7,32% envolvidos no ciclo celular, 5,77% relacionados com metabolismo de DNA e 4,09% para genes do metabolismo de RNA (Tabela 13 e figura 25) Para os genes com perda de expressão nas análises agrupadas, também foram preponderantes os genes envolvidos em comunicação celular, com 28,82%; genes envolvidos no metabolismo com 22,33%, 13,69% dos genes categorizados em motilidade celular, 12,02% envolvidos em metabolismo de proteínas, 6,97% para os genes envolvidos em ciclo celular e resposta de defesa celular, 5,10% dos genes agruparam-se em metabolismo de DNA e 4,10% em metabolismo de RNA. Como colocado anteriormente, este programa nos pareceu um tanto falho pelo fato de excluir muitos genes da análise. Apenas 15% (2096 de 13631) de todos os genes com perda de expressão submetidos à análise foram usados pelo programa. E 16% (1612 de 10124) dos genes com ganho de expressão puderam ser analisados pelo programa. O fato de termos valores altos para a mesma categoria gênica ganhando expressão ou perdendo expressão, a primeira vista pode parecer em desacordo. Mas não necessariamente os mesmos genes envolvidos em comunicação celular, ou metabolismo de proteínas, estão presentes. Ou mesmo isto apenas reflita o fato de ser esta a maior categoria gênica presente. Em uma análise de concordância realizada por nós entre as 3 análises realizadas com membranas GDA em câncer colorectal foram encontrados 21 genes com perda de expressão e outros 104 com ganho de expressão. Tal número é explicável pelo fato de estarmos trabalhando com algumas variáveis entre os experimentos realizados. Variáveis como o uso de 2 tipos de versões diferentes de membranas GDA, que embora possuam os mesmos

clones fixados a elas, possuem confecção diferente, o que possibilita uma melhor hibridização e análise para a versão GDA 1.3. Além do fato de termos trabalhado com tamanhos diferentes de misturas. Dessa forma os genes que se apresentaram expressos apenas em 2 ou mesmo em uma das análises não devem ser desprezados, pois podem ter a sua importância em tumores individuais caso testados. Na verdade, mostramos entre nossos resultados alguns clones nessa situação que foram confirmados por RT-PCR semiquantitativa. Como é o caso da EST R63530, do gene que codifica para proteína “*serum amyloid A1*” (Tabela 8) e do clone N93218 (Tabela 6), referente ao gene “*inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein*”, a proteína Id (inibidor de ligação ao DNA) e que serão discutidos mais adiante.

A análise de concordância foi realizada através do programa Excel da Microsoft cujos resultados podem ser vistos nas figuras 27 e 28 e nas tabelas 15, 16 e 17 dos resultados. Entre os 104 genes que encontramos concordantes com ganho de expressão entre as três análises, estão genes como o “*Rhodopsin*”, que foi mapeado próximo ao locus para o proto-oncogene *Raf-1* e *Kras-2*. O gene que codifica para a proteína denominada de “*Cerebellar degeneration-related protein-CDR-1*” de 34kD, para a qual alguns anticorpos foram identificados em pacientes com Degeneração Cerebelar. Esta proteína foi também encontrada relacionada com carcinoma de pequenas células de pulmão, neoplasma de pulmão, ovário e doença de Hodgkin. Tal proteína parece ser predominantemente expressa em tecidos neuroectodermis normais e em certos tumores malignos. (Furueux *et al.* 1990).

O gene “*Discoidin Domain Receptor-family member 1*” (DDR), é um dos 104 genes com expressão elevada e concordante entre nossas análises. Tal gene foi identificado com expressão aumentada em células de carcinoma de mama. Um outro estudo mostra que este mesmo gene, o DDR-1, possui uma sequência consenso para o sítio de ligação ao supressor de tumor *p53* em sua região promotora e tem sua expressão elevada pela proteína *p53* em células de osteosarcoma humano. (Shelling *et al.*, 1995; Johnson *et al.*; 1993.) (Sakuma *et al.* 1996).

O gene *GARP* foi encontrado concordante em nossas análises entre os genes que mostraram ganho de expressão. Este gene foi isolado em estudo que visava identificar novos oncogenes em câncer de mama na região cromossomal 11q13-11q14 que é envolvida em várias doenças em quais muitos dos genes chaves permanecem por ser identificados.

(Ollendorff *et al.*, 1992). A sequência identificada e denominada de D11S833E, codifica um novo gene, provisoriamente chamado de *GARP*. A banda q13 do cromossomo 11 é frequentemente encontrada amplificada em tumores de mama humanos.

O gene para a molécula de adesão celular E-caderina foi encontrada com ganho de expressão em nossas três análises. A literatura tem mostrado que perda de expressão da molécula de adesão celular E-caderina esta associada com grau, estágio e prognóstico em muitos carcinomas, como próstata. A importância de mudanças nas interações célula-célula é critica e bem conhecida no processo de progressão do câncer. Como bem se sabe por dados da literatura, a expressão anormal de moléculas de adesão, tais como E-caderina, pode ser um fator de contribuição para o aumento da invasibilidade e potencial metastático. Especialmente mudanças na expressão de genes que codificam para N-caderina e caderina-11 podem ter importância na progressão do câncer de próstata. (Bussemakers *et al.*, 2000). Metástase de fígado é o mais sério evento para o tratamento médico e cirúrgico em pacientes com câncer colorretal. Como descrito em material e métodos, a grande maioria dos tumores estudados por nós encontra-se nos estágios mais avançados da doença, com possível existência de processo metastático.

A pesquisa básica aponta para alguns candidatos a genes associados à metástase de fígado , como *DCC*, *CDC25B*, *CD44* a própria E-Cadherin e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros. Contudo, o sistema E-cadherin-catenin, selectina, e variante CD44 têm atuação conhecida na migração celular de lesões primárias, adesão de células tumorais a células endoteliais e motilidade celular. Uma estratégia bem elaborada de terapia tendo como alvo esses genes podem ajudar no combate as metástases de fígado no futuro. (Nippon Geka Gakkai Zasshi *et al.*, 2001). Desses genes citados pela literatura, *CD44* e o gene para E-Cadherin apresentaram aumento do nível de expressão e foram concordantes em nossas três análises.

Há uma forte possibilidade de que algumas outras causas importantes para as metástases do fígado devam existir além das causas já estabelecidas para o câncer colorretal e aquelas de invasão venosa por células cancerosas, Estes são apenas alguns entre os 104 genes concordantes das 3 análises com GDA em câncer colorretal, mas muitos outros merecem um estudo mais minucioso.

A identificação de vários genes envolvidos no câncer colorretal aumenta o cabedal de informações moleculares. Gradativamente ao serem incorporados ao padrão de análises histopatológicas do câncer colorretal podem ser usados para a caracterização de tumores primários. Os parâmetros moleculares podem ajudar a definir subgrupos de câncer colorretal diferindo no prognóstico e requerimento de tratamento individual. Possibilidades interessantes são esperadas para respostas a quimioterapia ou radioterapia a um nível molecular, e a pesquisa de metástases na procura por marcadores moleculares em linfonodos ou sangue circulante. Tais abordagens terão um impacto significativo no manuseio ou controle clínico do câncer colorretal (Bosman *et al.*, 1999; Graziano *et al.*, 2001).

Com relação aos 21 genes concordantes em perda de expressão entre as três análises encontramos genes como o *DCC*, um gene supressor de tumor. A literatura nos mostra que a região 18q21 é freqüentemente alterada em tumores gastrointestinais. Três genes candidatos a supressores de tumor foram identificados nela: *DCC*, *Smad4/DPC4* e *Smad2*; os mecanismos envolvendo sua inativação não foram totalmente elucidados (Barbera *et al.*, 2000)

A redução ou perda da expressão das proteínas codificadas pelos genes *APC* e *DCC* foi estudada em 27 espécimes cirúrgicas de câncer de mama primário com métodos de imunohistoquímica. A redução ou perda da expressão foi identificada em 11 das 27 amostras (40,7%) para o gene *APC* e 15 das 27 amostras (55,6%) para o gene *DCC*. (Ho *et al.*, 1999)

O gene “*fibrillin-1*” foi um dos 21 genes encontrados concordantes em nossas análises, mostrando perda de expressão. A expressão do gene “*fibrillin-1*” e a sua distribuição foram estudadas em amostras de fígado humano patológico e normal. Em HCC (Câncer de células hepáticas), a proteína “*fibrillin-1*” estava presente entre hepatócitos tumorais; a região estromal ao redor dos tumores continha tanto *fibrillin-1* e elastina. “*Fibrillin-1*” estava associada com elastina na parede de vasos e mesenquima de fígado normal, ao redor de nódulos cirróticos, mas sozinho no espaço perisinusoidal. O gene para proteína elastina mostrou-se com ganho de expressão entre nossas análises. O papel funcional para a elevada expressão de “*fibrillin-1*” em tecidos não elásticos, tais como

figado, permanece a ser elucidado.(Dubuisson *et al.*, 2001). Assim como seu papel no câncer colorretal, onde o encontramos com perda de expressão.

O gene que codifica para o receptor da linfotóxina-beta (*LtbetaR*) é outro gene presente entre os 21 genes concordantes que apresentaram perda de expressão entre nossas análises. Crowe *et al.*, (1994) demonstraram que proteínas relacionadas ao receptor do fator de necrose tumoral, (TNF), são os receptores humanos para heterodímeros de linfotóxina-alfa e linfotóxina-beta (*LtbetaR*). Estudos anteriores mostraram que placas colônicas, tecidos linforeticulares associados ao intestino (GALT) no cólon, se tornam muito mais pronunciados em colite murina induzida e isto estava associado com respostas a células T tipo Th2. O estudo concluiu que colite tipo Th2 é dependente da presença dessas placas colônicas. O efeito de LTbetaR-Ig foi visto através da prevenção da hipertrofia das placas colônicas na ausência de tratamento com IFN-gamma. Assim, LTbetaR-Ig parece oferecer um possível tratamento para a forma de colite Th2-dominante (Dohi *et al.*, 2001). Colite é um dos fatores de risco descritos para o desenvolvimento do câncer colorretal.

O gene para a *Enzima Conjugante de Ubiquitina -E2D 1* está entre os 21 genes concordantes para perda de expressão entre nossas três análises. A via de degradação de proteínas mediada por ubiquitina tem um papel crítico na degradação das proteínas celulares e no controle do ciclo celular. A desregulação da degradação de tais proteínas deve ter profundos efeitos no crescimento do tumor e submeter as células a apoptose. Um estudo realizado propôs avaliar essa via em câncer gástrico e seu potencial papel na inibição farmacológica de proteossomos na indução de apoptose em células de câncer gástrico. Como resultados encontraram que a inibição da função de proteossomo em células de câncer gástrico induz apoptose e que inibidores proteossomais têm uso potencial como nova droga anticâncer no modelo gástrico. E o gene para *Enzima Conjugante de Ubiquitina -E2D 1*, apresentou perda de expressão em câncer colorretal neste estudo (Fan *et al.*, 2001).

Anormalidades genéticas têm se mostrado úteis como marcadores para respostas terapêuticas, particularmente em câncer colorretal: como os níveis de mRNA de *ERCC1*, um dos genes concordantes entre os 21 com perda de expressão em nossas análises. Uma riqueza de dados indica que certas anormalidades genéticas podem ter como alvo drogas citotóxicas específicas e intervir a um passo precoce como um mecanismo de resistência no tratamento de câncer de pulmão. (Rosell *et al.*, 2001).

Um estudo com linhagens celulares em passagens precoces de câncer cervical verificou que níveis altos de mRNA pré-tratados podem ser preditivos de resistência a droga cisplatina, como já visto em vários outros tumores, incluindo tumores de cólon. Houve uma correlação significativa entre níveis de mRNA de *ERCC1* e resistência à cisplatina nessas linhagens celulares ($p \leq 0.011$). Entretanto, não foi tão óbvia a relação ao nível de proteínas. Dessa forma, essa associação entre altos níveis de mRNA de *ERCC1* e resistência à cisplatina pode ser um epifenômeno. O pré-tratamento de níveis de mRNA de *ERCC1* pode ser útil como marcador molecular para identificar tumores cervicais como refratários à cisplatina. A cisplatina é um valioso adjuvante a radioterapia para diversos tipos de câncer. A expressão de *ERCC1* funciona como um marcador molecular de resistência a cisplatina em células de tumor cervical humano. (Britten *et al.*, 2000). Mutações no gene para beta-tubulina, um outro gene com perda de expressão encontrado em uma de nossas análises, podem também conferir resistência a drogas usadas em pacientes. Estudos com quimioterápicos devem ajudar a validar a relevância desses genes candidatos a marcadores em câncer colorretal, assim como ocorre em outros tipos tumorais.

Segundo o fabricante, uma razão acima de 5,00 torna válido dizer que aquele gene é estatisticamente diferencialmente expresso pelas análises com membranas GDA. Em nossos testes contra os bancos de dados de SAGE, ORESTES e mesmo contra os dados publicados por Alon e col., nós usamos clones que apresentavam expressão acima de 10,000, visando uma confiabilidade ainda maior. Os dados encontrados contra o banco de dados ORESTES, num total de 585 clones similares nas diferentes bibliotecas, não foram utilizados no decorrer deste trabalho. Ao contrastarmos parte de nossos resultados verificamos que muitos genes encontrados como diferencialmente expressos em nossas análises obtiveram concordância e assim reforçaram a confiabilidade de nossos achados com esta técnica, o que pode ser visto nas tabelas 19 a 23. Alon e col. analisaram pela técnica de “Affymetrix Oligonucleotide Array”, a expressão gênica em 40 amostras de tecidos tumorais e 22 tecidos normais de cólon. Os autores encontraram complementaridade para mais que 2000 genes humanos, contra os quais testamos nossos resultados. Entre os genes que se apresentaram diferencialmente expressos em nossas análises e também em bibliotecas de tumor em SAGE, estão genes pertencentes ao

subgrupo de CEA (antígeno carcino embrionário), ainda muito utilizado para diagnóstico do câncer coloretal.

Muitos genes naturalmente não se encontram nas membranas usadas nos sistemas comparados, afinal são 6,500 genes na membrana “affymetrix”, contra 18,376 genes das membranas GDA. O que explica em parte o fato de muitos genes não se encontrarem concordantes entre elas.

Algumas ESTs também aparecem como diferencialmente expressas nessas análises (Affymetrix x SAGE x GDA), assim como a N20890 (Hs.269040) altamente expresso em nossas 3 análises por GDA e altamente expresso em bibliotecas de tumores e linhagem celular de tumor de cólon em SAGE e apresenta apenas duas entradas no UNIGENE. Entre esses genes constam também genes como *heparan sulfato*, o maior componente da membrana basal e já bastante conhecido por sua expressão acentuada em tumores induzidos experimentalmente por linhagem celular derivada de câncer de cólon. Esta molécula tem ação importante ao inibir a neovascularização do tumor, fato este muito importante no bloqueio da angiogênese e do crescimento da massa tumoral *in vivo*. O tratamento do câncer pode ser melhorado por intervenções terapêuticas tendo como alvo este modulador chave da progressão tumoral. (Vlodavsky *et al.*, 2000).

Ainda outro gene presente entre as análises é o “*Ras homolog gene family, member C*” (R87886-Hs. 179735), um gene pertencente à superfamília *Ras* de pequenas proteínas GTP-binding que compreendem um grande grupo de proteínas envolvidos em transdução de sinal. Outro gene encontrado por nós e publicado em artigo enviado na revista Cancer Letters-2001, é o “*Oligophren-1*” (Pinheiro *et al.*, 2001). Este apresenta expressão elevada em câncer coloretal e possui função sobre as proteínas Rho-GAP, inibindo sua expressão e será discutido mais adiante. O gene “*Neogenin (chicken) homolog 1*” codifica para uma proteína com aproximadamente 50% de identidade de aminoácidos com a DCC. Para esse gene foi demonstrado um padrão dinâmico de expressão no desenvolvimento do sistema nervoso e gastrointestinal de galinhas e é induzida em diferenciação terminal. Ao passo que a proteína supressora de tumor DCC, como já citado na introdução, é um gene grandemente envolvido em supressão tumoral. Esse gene de certa forma valida os experimentos, no momento em que se apresenta expresso em tecido normal e perde sua expressão no tecido tumoral. Outros genes como o “*citocromo oxidase C*”, que codifica para uma enzima

terminal do complexo da cadeia transportadora de elétrons, entre outros com funções conhecidas e ESTs. Na tabela 21 podemos observar genes como o “*Pregnancy specific beta-a-glycoprotein 1*”, que apesar de ter uma função ainda desconhecida, sabe-se que pertence a família do CEA (antígeno carcinoembrionário) que apesar de controvérsias clínicas, ainda é um importante marcador para avaliar carcinoma coloretal, mais especificamente em recidiva desse tipo de câncer;; um outro exemplo de gene que encontramos nessa mesma tabela é o “*Calgizzarin*”, com expressão comprovadamente elevada em câncer coloretal e outros tipos tumorais e mesmo metástases como no caso do câncer de mama (Moog-Lutz C *et al.*, 1995)

De posse das primeiras análises desenhamos oligonucleotídeos iniciadores para clones vistos persistirem em baixo nível de expressão em tumores coloretais como também três outros com alto nível de expressão entre as análises comparativas realizadas entre os experimentos NICOLON1/NICOLON2 e NICOLONAN/NICOLOBT e TUB15/NOA9 e para alguns genes que se mostraram mais expressos nas análises individuais. Com esses oligonucleotídeos iniciadores fizemos testes com 6 tumores individuais pareados com o tecido normal do mesmo paciente. Na busca de comprovar a diferença de expressão encontrada nos experimentos com membranas GDA e encontrar diferenças individuais na expressão gênica ocorrendo em tumores coloretais de diferentes pacientes.

No decorrer dos experimentos com a técnica de RT-PCR semiquantitativa foi necessário testar diferentes números de ciclos para os clones analisados. Isto precisou ser feito para evitar a saturação da reação de PCR e assim não prejudicar a detecção das diferenças de expressão entre tecidos tumorais e normais. A sensibilidade da RT-PCR semiquantitativa é um resultado de uma reação em cadeia, no qual o produto de um ciclo de amplificação serve como substrato para o próximo, resultando em um aumento exponencial no produto. Teoricamente a soma do produto dobra durante cada ciclo da PCR, mas na verdade, após um curto número de ciclos a eficiência da amplificação decresce com o aumento dos números de ciclos, resultando no efeito “Plateau”.

Nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa até o momento, foram testados 16 genes encontrados diferencialmente expressos pelas análises com membranas GDA. Destes confirmamos a diferença de expressão para 8 (Tabela 24), sendo 7 para ganho de expressão e 1 para perda de expressão em câncer coloretal. Os 6 genes restantes necessitam apenas de

mais testes no que diz respeito a números de ciclos adequados na reação de RT-PCR semiquantitativa para alguns pares tumorais. Em 2 casos há a necessidade de desenho de novos oligonucleotídeos iniciadores, pois ou não ocorreu amplificação dos produtos esperados ou não foi possível vislumbrar qualquer diferença entre os pares de tumores individuais testados. A reprodutibilidade encontrada mostrou-se adequada e promissora para o propósito de confirmação dos dados preliminares provenientes dos experimentos com membranas GDA.

Através da técnica de RT-PCR semiquantitativa (Figura 44) foi comprovado o ganho de expressão para o gene “*oligophrenin-1*” (acesso R81942 no GeneBank), que pode ser encontrado na tabela 20 (Pinheiro *et al.*, 2001). Este gene apresentou expressão diferencial entre as 3 análises feitas com GDA e mantém similaridade com sequência gênica encontrada nas análises pela técnica de “affymetrix”. Na Figura 44, correspondente a reação de RT-PCR para o gene “*oligophrenin-1*”, o produto específico da PCR parece conter duas bandas em algumas das amostras (canaletas 2,4 e 5). Contudo, esses mesmos produtos quando resolvidos em gel de agarose 1% mostram somente uma banda específica. Para assegurar que somente um produto estava presente, nós clonamos o produto de PCR mostrado na figura 44 e então sequenciamos 10 clones e em todos os casos o clone possui 100% de identidade com a sequência de “*oligophrenin-1*”. Através da análise de SAGE pudemos encontrá-lo altamente expresso em bibliotecas de câncer de próstata e também nas análises com os 6 pares de tumores individuais testados por RT-PCR. Uma análise feita pela técnica de RT-PCR em diferentes tumores (Figura 46), mostra este gene altamente expresso em tumores de mama, pulmão, laringe e próstata., não revelando grandes alterações para tumores de estômago e tireóide. Apenas um par de cada amostra tumoral foi usada nesta análise, portanto, não podemos fazer grandes comentários sobre este resultado para “*oligophrenin-1*”. Utilizamos também uma membrana comercial, a “Multiple tissue expression array” (Clontech), para testar a expressão para este gene em diferentes tecidos. Pudemos observar uma maior expressão do gene “*oligophrenin-1*” em tecidos de cérebro normal de forma semelhante ao encontrado na literatura.; e em alguns casos como pulmão, estômago, baço. A linhagem de adenocarcinoma de cólon usada nesta membrana, não mostra uma diferença expressiva. Deve-se salientar que se trata de uma membrana construída a partir de linhagens celulares (Figura49).

“*Oligophrenin-1*” possui 25 exons que se distribuem por pelo menos 500kb e encontra-se mapeado no cromossomo X, posição Xq12, sendo comumente relacionado ao retardo mental ligado ao X (Billuart *et al.*, 1998). A janela aberta de leitura (ORF) da *oligophrenin-1* possui 2,406 bases e começa com um códon de metionina precedido por uma sequência consenso de iniciação de tradução (ACCAUGG) (Kozak, 1996), que codifica uma proteína de 802 aminoácidos. *Oligophrenin-1* contém um domínio típico de uma proteína ativante Rho_GTPase (rhoGAP). Seu domínio amino terminal é similar a uma proteína altamente conservada de função desconhecida e que foi identificada em *C. elegans*, camundongo e humano.

Esse tipo de proteína ativante de GTPase reforça a atividade destas de forma similar a proteínas GAP, assim inativa pequenas proteínas Rho e Ras. A inativação de proteínas rhoGAP pode causar ativação constitutiva de seus alvos GTPase. Tal ativação é conhecida por afetar a migração celular e o “de novo” de exons e dendritos *in vivo* (Luo *et al.*, 1994; Zipkin *et al.*, 1997). Biluart *et al.*, 1998 usou hibridização *in situ* para examinar a expressão do gene homólogo durante o desenvolvimento de camundongo. Esse grupo mostrou que o transcrito de *Oligophrenin-1* foi o mais abundante em RNA de cérebro de feto. Este gene é expresso a muitos baixos níveis em todos os tecidos e em altos níveis em todas as partes do desenvolvimento neuroepitelial do tubo neural.

A proteína AKT2 é uma oncoproteína serina/treonina envolvida em câncer de ovário e pâncreas humano. Tal proteína é ativada por uma variedade de fatores de crescimento e insulina via fosfatidil-inositol 3- quinase (PI3K). Yuan *et al.*, (2000) demonstraram que a freqüente ativação de AKT2 em câncer humano primário e indução de apoptose por inibição da via de PI3-kinase/Akt. Mitsuuchi Y *et al.*, (1999) identificou um novo interator, ao qual chamaram de APPL, o qual contém um domínio de homologia (PH), um domínio de ligação fosfotirosina (PTB) e um zipper de leucina, motivos esses definidos em moléculas de sinalização como domínios de interação funcional com alvos específicos. O domínio PH de APPL mostra similaridades aos encontrados em proteínas como *Oligophrenin-1* e Graf. A APPL interage com a forma inativa de AKT2; além disso, APPL liga-se a subunidade catalítica de PI3k e controlar AKT2. A identificação de APPL pode facilitar futuras análises da atividade fisiológica e oncogênica dessa proteína. Nós podemos especular que *oligophrenin-1* possa estar atuando de forma similar a qual age APPL, devido

à similaridade de sequência encontrada entre os domínios de ativação PH, e pelo fato de observarmos em nossas análises o gene rho-GDP com expressão elevada em tumores de cólon. Tal achado pode ser explicado pelo fato de que a atividade GTP-ase reforçada força tal proteína a permanecer em seu estado inativo. Outro achado interessante é o fato de encontrarmos altos níveis do gene codificador da proteína quinase gamma C, proteína essa relacionada à proteína serina/treonina AKT2. Tais especulações podem ser ainda prematuras e carecer de mais investigações, contudo trata-se de um importante novo gene candidato a marcador tumoral, desde que não existe na literatura nenhuma descrição desse gene envolvido em tumorigênese de cólon

Ljubimova e cols. examinaram a expressão diferencial de genes com membranas GDA, RT-PCR e Northern-blot entre tecidos tumorais de cérebro e tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor. Através das análises de GDA, o gene *oligophrenin-1* obteve a mais alta razão quando comparado a outros genes em tecidos cerebrais adjacentes ao Glioblastoma multiforme (GBM) Vs. GBM. Por RT-PCR semiquantitativa, este gene foi encontrado expresso em tecidos tumorais e tecidos adjacentes ao tumor e não encontrados em meningiomas e corpo caloso (Ljubimova *et al.*, 2001).

Um clone que apresentou perda de expressão pelas análises de GDA e foi comprovada por RT-PCR semiquantitativa é a correspondente a EST H70732 (Figura 34). Esta EST possui apenas mais três entradas no UNIGENE. Devido a esse fato, desenhamos e construímos um “Contig” com as três sequências visando a tentativa de término desse sequenciamento (dados não mostrados). Uma publicação de Marion *e cols.*, 1999, descreve um novo gene, o qual é altamente expresso em 53 de 56 tumores de próstata e está mapeado no cromossomo 9q21-22. Nenhuma grande ou extensa janela aberta de leitura foi encontrada no gene que eles denominaram de *DD3*, o que sugere que ele possa funcionar como um RNA não codificante. Através de análises de similaridades identificamos a presença desse gene no mesmo clone (AL160268) onde está presente nossa EST H70732, porém não achamos similaridade entre *DD3* e H70732. Em experimentos com painéis de híbridos, localizamos a posição desse gene entre os marcadores SHGC-56723 e SHGC-30306 no cromossomo 9 (9q21-22) (Figura 37). Estamos analisando melhor essas sequências na busca de maiores informações.

O gene *ERCC2* (H79188-Hs.99987), diferencialmente expresso em nossas análises, faz parte do grupo 2 de complementação do defeito de reparo do DNA. Este gene mutante em *Xeroderma Pigmentosum tipo D*, é homólogo ao gene *RAD3*. Sua sequência de aminoácidos guarda 52% de identidade com a proteína de reparo e excisão de nucleotídeos *RAD3* de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *RAD3* é essencial para a viabilidade celular e codifica uma proteína ATPase dependente de DNA simples-fita e uma DNA helicase dependente de ATP (Weber *et al.*, 1990).

A similaridade de *ERCC2* e *RAD3* sugere um papel para ele tanto em viabilidade celular e reparo e nos fornece uns dos primeiros relatos na função bioquímica de um gene de reparo e excisão de nucleotídeos de mamífero. É bem conhecida a associação de helicases de DNA com múltiplas desordens neoplásicas hereditárias humanas como por exemplo, *Xeroderma Pigmentosum*, Cockayne's Syndrome, Bloom's Syndrome e Werner's Syndrome e o papel da subfamília *RAD3/ERCC2* na estabilidade genômica. Seu papel nesta neoplasia em estudo permanece a ser esclarecido, pois mostrou ganho de expressão nas análises Nicbt (28º clone expresso) e Nic1 (4º clone expresso) em tumores coloretais analisados por membranas GDA e teve seu ganho de expressão confirmado por RT-PCR semiquantitativa (Figura 38). Em outra análise semiquantitativa por RT-PCR o gene *ERCC2* mostrou-se diferencialmente expresso em câncer de mama, estômago, pulmão, laringe, próstata e tireóide (dados não mostrados). Bibliotecas de SAGE_TSU (Linhagem celular de carcinoma de próstata), SAGE_DUKE_H1126 (Tumor primário de cérebro – astrocitoma) e as bibliotecas SAGE_CACO2 (Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon) e Linhagens celulares de carcinoma de cólon SAGESW837, SAGE_RKO

A Figura 39 nos mostra outro clone que confirmamos com ganho de expressão em câncer coloretal através de RT-PCR. Trata-se do clone N93218 (UNIGENE Hs.180919), referente ao gene “*inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein*”, a proteína Id (inibidor de ligação ao DNA) regula a transcrição durante o desenvolvimento pela interação com fatores de transcrição. Três genes humanos, os *ID1*, *ID2* e *ID3* foram identificados e pertencem a essa família de reguladores de transcrição.

As proteínas Id inibitórias formam heterodímeros inativos com fatores de transcrição básicos “helix-loop-helix” por intermédio de seus “motifs” HLH. Da literatura sabemos que, durante a diferenciação de células B, as proteínas inibitórias ID,

particularmente ID1 e ID2 são expressas a altos níveis em células pro-B (Sun *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1991)

Hara e cols., (1994) mostrou que genes relacionados a Id são expressos transitoriamente durante a fase precoce e tardia da fase G1 e que fibroblastos diplóides senescentes humanos falham para expressar esses genes relacionados a Id em resposta a estímulos de soros. Esse grupo identificou dois genes humanos relacionados a Id, *ID1*, *ID2*. mRNAs de *ID1* e *ID2* foram escassamente detectáveis em passagens precoces de fibroblastos quiescentes; o soro coordenadamente induziu os dois mRNAs, observando-se dois picos de expressão, um em G1 precoce e outro em G1 tardio. Em células senescentes o soro induziu escassamente os mRNAs de *ID1* e *ID2*, apesar de os níveis de indução da expressão de *Myc* terem sido similares em passagens precoces e células senescentes.

As proteínas Id podem controlar a diferenciação do ciclo celular ao interferir com a ligação de DNA a fatores de transcrição. Lynden e cols. demonstraram que a interrupção dos alvos de Id1 e Id3 em camundongos resultou em uma prematura retirada de neuroblastos do ciclo celular e expressão de marcadores de diferenciação neurais específicos.(Lynden *et al.*, 1999)

Como a angiogênese de cérebro e tumores requer invasão de tecidos avasculares por células endoteliais, os autores examinaram camundongos “knock-out” para o gene *Id* em sua capacidade de manter o crescimento de tumor “xenografts”. Os autores observaram que 3 diferentes tumores falharam no crescimento e/ou metastatização em camundongos Id1 +/- Id3-/-, e qualquer crescimento de tumor presente mostrou pobre vascularização e necrose extensa. Dessa forma os genes Id são requeridos para manter o tempo certo de diferenciação no embrião e invasibilidade da vasculatura. Tais genes são muito pouco expressos em adultos, e assim tornam-se alvos atrativos para o desenvolvimento de drogas antiangiogênicas (Lynden *et al.*, 1999).

Na Figura 40 podemos ver os resultados obtidos para EST R63530, que por RT-PCR apresentou elevado nível de expressão em tumores. Tal EST permanece “no match” nos diferentes bancos de dados. A única informação que pode ser extraída em análises de Blast é em HTGs, no clone RP11-9302, onde se encontra a seqüência do cromossomo 2 humano (BAC sequence from the SPG4 candidate region at 2p21-2p22 BAC 854M03 of RPCI-11 library from chromosome 2 of Homo sapiens, complete sequence) e no banco de

Ests podemos encontrar 5 outras seqüências com nível de similaridades, entre elas seqüências pertencentes ao CGAP (National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project). Em SAGE pouca informação foi obtida.

O clone correspondente à seqüência de “*Snf2-relates CBP activator protein*” (SRCAP). (H05902-Hs.87908) mostrou ganho de expressão em nossas análises com membranas GDA 1.3 e mistura de 3 tumores coloretiais. Para esse mesmo gene confirmamos o ganho de expressão pela técnica de RT-PCR semiquantitativa em tumores coloretiais individuais (Figura 41). Membros da família SNF2 (Sucrose Non-Fermenter) de proteínas remodeladoras de cromatina funcionam em processos que variam de reparo de DNA a transcrição e metilação (Raabe *et al.*, 2001).

A capacidade de certas proteínas de ligação de se ligarem a proteínas que seinteragem a elementos responsivos a cAMP [cAMP response-element binding protein (CREB)-binding protein (CBP)] as permitem funcionar como co-ativadoras para vários fatores de transcrição e tal função parece ser mediada pela sua capacidade de atuar como histonas acetiltransferases e por suas interações com outras proteínas (fatores de transcrição em geral e outros co-ativadores). A CBP interage com uma nova ATPase denominada “Snf2-Related CBP Activator Protein” (SRCAP). SRCAP possui o domínio conservado encontrado em membros da família Snf2, o que é consistente com sua tividade. Experimentos de transfecção demonstram que SRCAP é capaz de ativar a transcrição quando expresso como uma quimera Gal-SRCAP e que SRCAP também reforça a capacidade de CBP ativar a transcrição. (Johnston *et al.*, 1999)

O gene para a proteína “Serum amyloid A1” (H45773 Hs.332053) foi detectada com elevada expressão em uma de nossas análises com membranas GDA e obteve sua expressão confirmada por RT-PCR semiquantitativa em tumores coloretiais individuais (Figura 42).

Amilóide é o termo genérico, usado para o depósito fibrilar formado pela precipitação de proteínas ou peptídeos normalmente solúveis, que por sofrerem uma alteração conformacional se tornam insolúveis (Jiménez *et al.*, 1999).

Amiloidose é um termo usado para descrever várias condições clínicas, onde proteínas ou fragmentos de proteínas convertem-se de sua forma normalmente solúvel em placas insolúveis, que se acumulam em um ou vários tecidos, levando à falência do órgão

afetado o que acontece por erros estruturais das proteínas (Dobson 1999). Podem envolver diferentes proteínas que adotam uma conformação não nativa, embora suas seqüências de aminoácidos não apresentem alterações.

Formam um grupo heterogêneo de doenças, que podem ser esporádicas ou hereditárias, podendo ocorrer primária ou secundariamente a outras doenças e os agregados protéicos são direta ou indiretamente a origem da condição patológica em questão (Dammacco 1991).

Tais depósitos são ricos em glicosaminoglicanas, na forma de heparan sulfato e dermatan sulfato, que se ligam de uma maneira não covalente às fibrilas amilóides (Woodrow *et al.*, 1999). A conversão da proteína solúvel em insolúvel pode depender de vários fatores: um processo natural de envelhecimento do organismo e morte celular, acelerado por mutações, inflamações crônicas e estado de estresse oxidativo (Koo *et al.*, 1999). Processos normalmente envolvidos em desenvolvimento tumorigênico. A amiloidose em pacientes com câncer é bem descrita em casos de carcinoma medular de tireóide (Bocker e Schroder 1990) e de outros carcinomas endócrinos (Miranda *et al.*, 1995), além de relatos em pacientes com mieloma múltiplo, linfomas Hodgkins e não-Hodgkins (Wolf *et al.*, 1986). Este gene é também encontrado com alto nível de expressão em bibliotecas de SAGE para Carcinoma ductal invasivo de mama (SAGE_95-347) e tumor de ovário primário.

O clone W60704 (Hs.7862) correspondente à seqüência que codifica para “Hypothetical protein FLJ20312”, ocupa o quinto lugar em ganho de expressão na análise com membrana GDA 1.3 e misturas de 3 tecidos tumorais (Tub15). A expressão deste gene foi confirmada pelas análises de RT-PCR semiquantitativa e pode ser vista na Figura 43. Trata-se de uma proteína rica em resíduos de prolina, cujo gene encontra-se mapeado no cromossomo 1, é também encontrado com nível alto de expressão nas bibliotecas de SAGE para câncer de mama (SAGE_PTEN) e de misturas de linhagens celulares de câncer de ovário (SAGE_OVP-5).

Uma análise mais acurada dos resultados obtidos com RT-PCR pode nos fornecer uma idéia sobre a expressão desses genes testados em cada paciente específico. Como por exemplo no caso da EST H70732, onde pouca diferença se pode observar entre os dois últimos pares de tumor analisados (Figura 34). Este par corresponde a um tumor

classificado dentro do estágio II, o que não lhe confere uma agressividade elevada quando comparada aos demais pares analisados.

As amostras utilizadas para RT-PCR estão bem coerentes com o que se espera para o acometimento deste tipo de câncer na população. A grande maioria dos pacientes estudados pertence a região sul-sudeste do país, com idade variando entre 50 e 75 anos, com apenas alguns casos dispare para com relação à idade. E, apesar de se poder concluir muito devido ao número pequeno de amostras, uma leve tendência de acometimento em homens, em relação às mulheres.

O que sabemos sobre o desenvolvimento e progressão do câncer podem ser de certa forma resumidos pelo fato de as células cancerosas possuírem defeitos nos circuitos regulatórios que governam a proliferação das células normais e homeostase. A literatura sugere que o vasto catalogo de genótipos celulares do câncer é uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento da doença: a auto suficiência em sinal de crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento celular, evasão do programa de morte celular (apoptose), potencial replicativo não limitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase.

A literatura sugere que haja pelo menos quatro vias que proporcionam as células normais progredirem para um câncer coloretal. A via patogênica típica foi primeiramente descrita por Hill e colegas (Moorson *et al.*, 1974; Hill *et al.*, 1978). Este processo é aceito como central para a maioria dos cânceres e um evento chave precoce é a mutação (germinativa ou somática) do gene APC. A perda ou mutação desse gene induz a formação de pólipos como um resultado da desordenação da replicação celular, adesão e migração celular. Essa via envolve β -cateninas (que se liga a E-caderina e ativa a transcrição) e Tcf (T-cell factor), um ativador de transcrição a “downstream”. Um mutante APC ou β -catenina tem como resultado uma falha da adesão e migração celular normal e transcrição de sinais proliferativos que podem atuar via o oncogene *c-MYC*. Vogelstein e colegas (1982) mostraram que os passos moleculares após a inativação de APC- β -catenina-Tcf envolve uma série de acúmulos de mudanças genéticas e cromossomais específicas que acompanham a transição da mucosa colônica normal para carcinoma metastático. Estes incluem mutações em *k-ras*, mudanças no padrão de metilação e mutações ou perdas de *p53*. Outra importante perda, como já comentado inclui DCC no cromossomo 18. A via que

se caracteriza em HNPCC, caracterizada pela perda de DNA mismatch repair (por mutação hereditária ou adquirida ou metilação) que resulta em instabilidade de microsátélites no tumor. A via da colite ulcerativa (inflamação da parede do intestino) parece envolver a seqüência displasia-carcinoma e contribui aumentando em cerca de 20% os riscos de desenvolvimento desse tipo de câncer. Outro dado importante é a perda dos pontos de checagem da mitose.

Toda esta discussão nos leva a admitir que a tumorigenese coloretal é realmente um processo em múltiplos passos, envolvendo a ativação e ou supressão de genes supressores de tumor. Isto leva a possibilidade de mudanças na expressão gênica global e no fenótipo celular e a necessidade de colaboração na descoberta dos passos complementares dessa via. Diversos pontos dessa via permanecem a serem correlacionados com diferentes expressões gênicas, sejam elas por ganho ou perda de expressão.

A identificação e possíveis caracterizações desses genes podem levar a um melhor entendimento dos mecanismos de tumorigenese e metástases. Além disso, esses genes podem conduzir ao desenvolvimento de marcadores para prognóstico e diagnóstico que pode ser usado no aprimoramento do tratamento do paciente. Os resultados encontrados neste trabalho asseguram a grande valia desse método, no sentido em que há confirmação de muitos de nossos achados por outras técnicas, como também muitos dos genes confirmados por RT-PCR apresentam implicação em algum tipo de processo tumorigênico ou proliferação celular. Isto dá suporte para investimentos mais confiantes nos demais genes encontrados como diferencialmente expressos entre as análises e ainda não confirmados por RT-PCR, na busca de marcadores para este tipo de tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYANA, S.K. *Cancer Metastasis Rev.* **14**: 173-189, 1996.
- ALON, U., Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D., Levine, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6745-6750, 1999
- ARBER, N., Hibhoosh, H., Moss, S.F., Sutter, T., Zhang, Y., Begg, M., Wang, S., Weinstein, I.B., and Holt, P.R. *Gastroenterology* **110**: 669-674, 1996.
- AYALA, M., Balint, R.F., Fernandez-de-Cóssio, M., E., Canaán-Haden, L., Larrick, J.W and Gavilondo, J.V. *BioTechniques* **18**: 842-850, 1995.
- BAKER, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K.V. & Vogelstein, B. *Science*. **249**, 912-915, 1990.
- BARAK, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. *The EMBO Journal* **12**: 461-468, 1993.
- BARBERA, V .M., Martin, M., Marinoso, L., Munne, A., Carrato A., Real FX, Fabre M. *Biochim Biophys Acta* **1502**(2):283-96, 2000.
- BASU, T. N.; Gutmann, D. H.; Fletcher, J. A.; Glover, T. W.; Collins, F. S. *Nature* **356**: 713-715, 1992.
- BIENVENU, T.; Der-Sarkissian, H.; Billuart, P.; Tissot, M.; Des Portes, V.; Bruls, T.; Chabrolle, J. P.; Chauveau, P.; Cherry, M.; Kahn, A.; Cohen, D.; Beldjord, C.; Chelly, J.; Cherif, D: *Europ. J. Hum. Genet.* **5**: 105-109, 1997.
- BILLUART, P.; Bienvenu, T.; Ronce, N.; des Portes, V.; Vinet, M. C.; Zemni, R.; Crollius, H. R.; Carrie, A.; Fauchereau, F.; Cherry, M.; Briault, S.; Hamel, B.; Fryns, J.-P.; Beldjord, C.; Kahn, A.; Moraine, C.; Chelly, J. *Nature* **392**: 823-826, 1998.
- BOCKER, W., Schroder S. *Recent Res Cancer Res.* **118**:41-6,1990.
- BOLETIM DO INCA - Ministério da Saúde-Registro Nacional de Patologia Tumoral-Diagnósticos de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da saúde, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYANA, S.K. *Cancer Metastasis Rev.* **14**: 173-189, 1996.
- ALON, U., Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D., Levine, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6745-6750, 1999
- ARBER, N., Hibhoosh, H., Moss, S.F., Sutter, T., Zhang, Y., Begg, M., Wang, S., Weinstein, I.B., and Holt, P.R. *Gastroenterology* **110**: 669-674, 1996.
- AYALA, M., Balint, R.F., Fernandez-de-Cóssio, M., E., Canaán-Haden, L., Larrick, J.W and Gavilondo, J.V. *BioTechniques* **18**: 842-850, 1995.
- BAKER, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K.V. & Vogelstein, B. *Science*. **249**, 912-915, 1990.
- BARAK, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. *The EMBO Journal* **12**: 461-468, 1993.
- BARBERA, V .M., Martin, M., Marinoso, L., Munne, A., Carrato A., Real FX, Fabre M. *Biochim Biophys Acta* **1502**(2):283-96, 2000.
- BASU, T. N.; Gutmann, D. H.; Fletcher, J. A.; Glover, T. W.; Collins, F. S. *Nature* **356**: 713-715, 1992.
- BIENVENU, T.; Der-Sarkissian, H.; Billuart, P.; Tissot, M.; Des Portes, V.; Bruls, T.; Chabrolle, J. P.; Chauveau, P.; Cherry, M.; Kahn, A.; Cohen, D.; Beldjord, C.; Chelly, J.; Cherif, D: *Europ. J. Hum. Genet.* **5**: 105-109, 1997.
- BILLUART, P.; Bienvenu, T.; Ronce, N.; des Portes, V.; Vinet, M. C.; Zemni, R.; Crollius, H. R.; Carrie, A.; Fauchereau, F.; Cherry, M.; Briault, S.; Hamel, B.; Fryns, J.-P.; Beldjord, C.; Kahn, A.; Moraine, C.; Chelly, J. *Nature* **392**: 823-826, 1998.
- BOCKER, W., Schroder S. *Recent Res Cancer Res.* **118**:41-6,1990.
- BOLETIM DO INCA - Ministério da Saúde-Registro Nacional de Patologia Tumoral-Diagnósticos de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da saúde, 2000.
- BOLETIM DO INCA - Ministério da Saúde-Registro Naciucional de Patologia Tumoral-Diagnósticos de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da saúde, 1998.

- BOSMAN, F. T. *Cell Genet.* **86**(2):112-7, 1999.
- BRITTEN, R.A., Liu, D., Tessier, A., Hutchison, M.J., Murray, D. *Int J Cancer* **89**(5): 453-7, 2000.
- BUSSEMAKERS, M.J., Van Bokhoven, A., Tomita, K., Jansen, C.F., Schalken, J.A. *Int J Cancer* **85**(3):446-50, 2000.
- CAMPISI, J. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59: 67-73, 1994.
- CARON, H., van Sluis, P., de Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater R, Westerveld, A., Voute, P.A., Versteeg, R. *New England Journal of Medicine* **334**(4):225-30, 1996.
- CHEE, M., Yang, R., Hubbell, E. *Science* **274**:610-614, 1996.
- CLEAVER, J. E: *Cell* **76**: 1-4, 1994.
- COX, D.R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S and Myers, R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8995-8999, 1990.
- CRONIN, M.T., Fucini, S.M.K., Masino, R.S., Wespi, R.M., Miyada, C.G. *Human. Mut.* **7**:244-255, 1996.
- CROWE, P. D.; VanArsdale, T. L.; Walter, B. N.; Ware, C. F.; Hession, C.;m Ehrenfels, B.; Browning, J. L.; Din, W. S.; Goodwin, R. G; Smith, C. A. *Science* **264**: 707-710, 1994.
- DAMMACCO, F. *Meprospects. Int.* **6**:107-16, 1991.
- MAYER, B., Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. *Lancet* **342**(8878):1019-22, 1993.
- DIAS NETO, E., Rahal, P., de Moura, R.R., Caballero, O., Villa, L.L. & Simpson, J.G. *Trends in Genetics* **12**:9, 375-376, 1996.
- DOBSON, C. M. *Trends Biochem Sci.* **24**:329-32, 1999.
- DOHI, T., Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawamura YI, Browning JL, McGhee JR. *J Immunol* **167**(5):2781-2790, 2001.
- DONTI, E.; Lanfranccone, L.; Huebner, K.; Pascucci, A.; Venti, G.; Pengue, G.; Grignani, F.; Croce, C. M.; Lania, L.; Pelicci, P. G. *Hum. Genet.* **84**: 391-395, 1990.
- DUBUISSON, L., Lepreux, S., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Costa, A. M., Rosenbaum, J., Desmouliere, A. *J Hepatol* **34**(4):514-22, 2001.

- ESTIMATIVA da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1996: Rio de Janeiro, Pro-Onco, 1996.p.19.
- FAN, X.M., Wong, B.C., Wang, W.P., Zhou, X.M., Cho, C.H., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Lin, M.C., Kung, H.F., Lam SK. *Int J Cancer* **93**(4):481-8, 2001.
- FEARON, E.R., Cho., K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppter, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K.W., Volgstein, B.. *Science* **247**: 49-56, 1990.
- FIELD, A.S., Chamberlain, N.L., Tran, D., Morey, A.L. *Pathology* **33**(3):278-282, 2001.
- FLEJTER, W. L.; McDaniel, L. D.; Johns, D.; Friedberg, E. C.; Schultz, R. A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**: 261-265, 1992.
- FODOR, S.P.A *Science* **277**: 393,1997.
- FURNEAUX, H.M., Rosenblum M.K., Dalmau, J., Wong, E., Woodruff, P., Graus, F., Posner, J.B. *Engl J Med.* **322**(26):1844-51, 1990.
- GIACOMINI, P., Gioda, E., Fraioli, R., Nicotra, M. R., Vitale, N., Setini, A., Delfino, L., Morabito, A., Benevolo, M., Venturo, I. *Cancer res.* **59** (11): 2657-67, 1999.
- GIANCOTTI, F.G & Ruoslahti, E. *Cell* **60**: 849-859, 1990.
- GONZALEZ-ZULETA, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M., and Jones, P. A. *Cancer Research* **55**: 4531-4535, 1995.
- GORRE, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., Sawyers, C.L. *Science* **293**(5531):876-880, 2001.
- GRAMMATICO, P., Rocella M., Catriacala C., Roccela F., Bucher S., Mordenti C., Amantea A., Di Rosa C., Del Porto G. *World J. Surg.* **19** (3): 350-1, 1995.
- GRAZIANO, F., Cascinu, S., Staccioli, M.P., Catalano, V., Rossi, M.C., Baldelli, A.M., Giordani, P., Mureto, P., Catalano, G. *BMC Cancer* **1**(1):9, 2001.
- HACIA, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., Colins, F.S. *Nat. Genetics* **14**: 441-447, 1996.
- HANAHAN, D. J. *Curr Top Cell Regul.* **33**:65-78, 1992.
- HANAHAN, D. *Cell* **86**:353-364, 1992.
- HANAWALT PC. *Science* **266**:1957-8, 1994.
- HANOWALT, P.C. *Science* **266**:1954-1956, 1994.

- HARA, E.; Yamaguchi, T.; Nojima, H.; Ide, T.; Campisi, J.; Okayama, H.; Oda, K. *J. Biol. Chem.* **269**: 2139-2145, 1994.
- HELLER, R.A., Chena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Wooley, D.E., and Davis, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**:2150-2155, 1997.
- Hill MJ, Morson, B.C., Bussey, H.J. *Lancet* 245-7, 1978.
- HIRANO, S. *Cell* **70**: 293-301, 1992.
- Ho, K.Y., Kalle, W.H., Lo, T.H., Lam, W.Y., Tang, C.Mr. *Histopathology*.**35**(3):249-56, 1999.
- HOLLSTEIN, M. Sidransky, D., Voglstein, B., & Harris, C.C. *Science* **253**: 49-53, 1991.
- Hunt, T & Scherr, C.J. *Curr. Opin. Cell.Biol.* **6**: 833-838, 1994.
- JIMÉNEZ, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M., Saibil, H. R. *EMBO Journal* **18**: 815-21, 1999.
- JOHNSON, J. D.; Edman, J. C.; Rutter, W. J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**: 5677-5681, 1993.
- JOHNSTON, H., Kneer, J., Chackalaparampil, I., Yaciuk, P., Chrivia, J. *J Biol Chem.* **274**(23):16370-6, 1999.
- KANE, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M. and Kolodner, R. *Cancer Res.* **57**: 808-811, 1997.
- KLEIN, G. *Personal Communication. Stockholm, Sweden*, 11/4/1981.
- KLIMPFINGER, M., Zisser, G., Ruhri, C., Putz, B., Steindorfer, P. and Hpfler, H. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **59**: 165-171, 1990.
- KOZAK, M. *Cell* **44**: 283-292, 1986.
- LEE, S.W., Tomasseto, C., Sager, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**:2825, 1991.
- LEVINE, A.J., Perry, M.E. *Current Opinion in Genetics and Developmen* **3**:50-54, 1993.
- LIANG, P. and Pardee, A.B. *Science* **257**: 967-971, 1992.
- LJUBIMOVA J Y., Khazenzon, Z., Chen, Y.I., Neyman, L., Turnar, M. S., Riedinger, K.L. *International Journal of Oncology* **18**: 287-295., 2001.
- LUO, W., Wang, H., Ruoff, R.S., Cioslowski, J., Phelps, S. *Phys Rev Lett.* **73**(1):186-188, 1994.

- LYNDEN, L. *Nature* **401**: 670-677, 1999.
- MCCLELLAND M, Mathieu-Daude F, Welsh J. *trends Genet.* **11** (6) 242-6. Review, 1995.
- MADAULE, P., Axel, R. *Cell* **41**: 31-40, 1985.
- MANIATIS, T, Goodbourn, S., Fisher, J.A. *Science* **236**: 1237, 1987.
- MARION, S. A., Agbayewa, M.O., Wiggins, S. *Can J Public Health* **90**(6): 418-22, 1999.
- MATSUMURA, Y.; Tarin, D. *Lancet* **340**: 1053-1058, 1992.
- MAYER, B.; Jauch, K. W.; Gunthert, U.; Figdor, C. G.; Schildberg, F. W.; Funke, I.; Johnson, J. P.: *Lancet* **342**: 1019-1022, 1993.
- MIRANDA, R. N., Wu, D., Nayak R N, Kragel P J, Medeiros J. Amyloid in adrenal gland pheochromocytomas. *Arch Pathol Lab Méd.* **119**: 827-30, 1995.
- MITSUUCHI, Y., Johnson, S.W., Sonoda, G., Tanno, S., Golemis, E.A., Testa, J.R. *Oncogene*. **18**(35):4891-8, 1999.
- MOK, S.C., Chan, W.Y., Wong, K.K., Cheung, K.K., Lau, C.C., Ng, S.W., Baldini, A., Colitti, C.V., Rock, C.O. *Oncogene* **16**(18):2381-7, 1998.
- MOK, S. C.; Wong, K.-K.; Chan, R. K. W.; Lau, C. C.; Tsao, S.-W.; Knapp, R. C.; Berkowitz, R. S.: *Gynecol. Oncol.* **52**: 247-252, 1994.
- MOOG-LUTZ, C., Bouillet, P., Regnier, C.H., Tomasetto, C., Mattei, M.G., Chenard, M.P., Anglard, P., Rio, M.C., Basset, P. *Int J Câncer* **63**(2):297-303, 1995.
- MORSON, B.C. *Proc R Soc Méd.* **67**:451-7, 1974.
- MULLER, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:205-209, 1995.
- OKUNO K, Yasutomi M. [Multidisciplinary treatment for liver metastasis using cytokines]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*; **102**(5):403-8, 2001.
- OLLENDORFF, V., Szepetowski, .P, Mattei, M.G., Gaudray, P., Birnbaum, D. *Mamm Genome*. **2**(3):195-200, 1992.
- PINHEIRO, N. A. Caballero, O. L., Soares, F., Simpson, A. J., G. *Câncer letters* **172**: 67-73
- POGUE-GEILE K, Geiser, J.R., Shu, M., Miller, C., Wool, I.G., Meisler, A.I., Pipas, J.M. *Mol Cell Biol.* **8**:3842-9, 1991.
- POTTER, J.D. *Encyclopedia of Cancer*. Vol.:I, pp:441-450, 1997.

- PRUITT RE, MEYEROWITZ EM. Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol.* **20**;187(2):169-83,1986.
- KOO E H, Lansbury Jr P T, Kelly J W. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:9989-90, 1999.
- RAABE, E.H., Abdurrahman, L., Behbehani, G., Arceci, R.J. *Dev Dyn.* **221**(1):92-105, 2001.
- REDDY, B.S. *Encyclopedia of Cancer, Vol.:I*, pp:432-440, 1997.
- ROSELL, R., Sanchez, J.M., Taron, M., O'Brate, A, Gutierrez, J.L., Monzo M, Felip E, Sanchez, J.J., Alberola, V. *Oncology (Huntingt)* **6**:52-60, 2001.
- SAGER, R., Anisowicz, A., Neveu, M., Liang, P. and Sotiropoulou, G. *FASEB J*, **7**: 964-970, 1993.
- SAKUMA, S.; Saya, H.; Tada, M.; Nakao, M.; Fujiwara, T.; Roth, J. A.; Sawamura, Y.; Shinohe, Y.; Abe, H. *FEBS Lett.* **398**: 165-169, 1996.
- SANCAR, A *Science* **266**, 1954-1956, 1994.
- SANGUINETTI, C.L., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. *Biotechniques* **17**: 915-918, 1994.
- SAPOLSKY, R., J. and Lipshutz, R.J. *Genomics.* **33**: 445, 1996.
- SCHENA, M., Shalon, D., Davis, R.W., & Brown, P.O. *Science.* **270**:467-470, 1995.
- SCHENA, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., & Davis, R.W. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **93**:10614-10619, 1996.
- SHELLING, A. N.; Butler, R.; Jones, T.; Laval, S.; Boyle, J. M.; Ganesan, T. S. *Genomics* **25**: 584-587, 1995.
- SICILIANO M., J., Carrano, A ., V. Thompson L.H. *Cytogenet. Cell Genet.***40**:744-745, 1985.
- STEWART, E., *Genome Reseacr h* . **7**: 422-433, 1997.
- STITLER-STEVENSON (1993) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**: 541-573.
- SUN, X.-H.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Baltimore, D. *Molec. Cell. Biol.* **11**: 5603-5611, 1991.
- SWISSHELM, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4472-4476, 1995.
- THOMPSON, L. H.; Brookman, K. W.; Dillehay, L. E.; Carrano, A. V.; Mazrimas, J. A.; Mooney, C. L.; Minkler, J. L. *Mutat. Res.* **95**: 427-440, 1982.

- THOMPSON, L.H., Mooney, C.L., Burkhart-Schultz, K. *Cell Molec. Genet.* **11**:87-92, 1985.
- TOKUYAMA, Y and Taked, J. *BioTechniques.* **18**, 424-425, 1995.
- TORTOLA S, Capella G, Marcuello E, Gunther K, Aiza G, Masramon L, Reymond MA, Peinado MA. *Lab Invest.* **78**(3):309-17, 1998.
- TSUSHIMA H, Kawata S, tamura S, et al., *Gastroenterology* **110**(2):375-82, 1996.
- VELCULESCU, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. *Science.* **270**(5235):484-7, 1995.
- VIDER, B. Z., Zimber A., Chastre, E., Prevot, S, Gespach, C., Estlein, D., Wolloch, Y., Tronick, R.S. et al. *Oncogene* **12**: 153-158, 1996.
- VLODAVSKY, I., Elkin, M., Pappo, O., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Aviv, A., Pecker, I., Friedmann, Y. *Isr Med Assoc J.* **2**:37-45, 2000.
- VOLGSTEIN, B & Kinzler, K.W. *Cell*, **70**:523-526, 1992.
- WANG, D G., Fan, J. B., Sião, C.J., Berno, A., Yong, P., Sapolsky, R. *Science*, **280**: 1077, 1998.
- WEBER CA. *The EMBO Journal.* **9**:1437-1447, 1990.
- WEINBERG, R.A. *Sci. Am.* **275**: 62-70, 1996.
- WEINER, T.M., Liu, E.T., Craven, R.J. and Cance, W.G. *Lancet* **342**: 1024-1025, 1993.
- WELSH, J. and McClelland, M. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5275-5279, 1991.
- WELSH, J., Chanada, K., S. Dalal, S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M *Nucleic Acids Res.* **20**: 4965-4970, 1992.
- WILSON, R. B.; Kiledjian, M.; Shen, C.-P.; Benezra, R.; Zwollo, P.; Dymecki, S. M.; Desiderio, S. V.; Kadesch, T. *Molec. Cell. Biol.* **11**: 6185-6191, 1991.
- WODICKA L., Dong, H., Mittman M, Ho, M-H and Lockhart, D.J *Nature Biotechnol.* **15** ; 1359, 1997.
- WOLF B C, Kumar A, Vera, J. C., Neimam, R. S. *Am J Clin Pathol.* **86**:84-8, 1986
- WOODMAN, A.C., Sugiyama, M., Yoshida, K., Sugino, T., Borgya, A., Goodison, S., Matsumara, Y and Tarin, D. *Amer. J. Pathol.* **149**: 1519-1530, 1996.
- WOODROW, S. I., Stewart, R. J., Kisilevsky, R., Gore, J., Young, I. D. **6**: 22-30, 1999.
- WYLLIE, A.H. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **5**:97-104, 1995.

YETMAN, T.J. & Mao, Y. *Nucleic Acids Res* **23** : 4007-4008, 1995.

YONISH-ROUACH, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M.
Nature **352**: 345-347, 1991.

YUAN J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM. *Cancer Res.* **60**(16):4372-6, 2000.

ZHANG, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Scott, E. K., Hruban, R.H., Hamilton, S.R.,
Volgestein, B., Kinzler, K.W. *Science.* **276**: 1268-1272, 1997.

ZIPKIN, I.D., Kindt, R.M., Kenyon, C.J. *Cell.* **90**(5):883-94, 1997.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO