

Renata Nascimento de Freitas

**Estudos moleculares de tecidos
normais e tumores malignos de
roedores tratados com samambaia
(*Pteridium aquilinum*)**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte – Minas Gerais
Março de 2001

**Estudos moleculares de tecidos
normais e tumores malignos de
roedores tratados com samambaia
(*Pteridium aquilinum*)**

Renata Nascimento de Freitas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio D. Junho Pena.

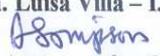


Universidade Federal de Minas Gerais -
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615

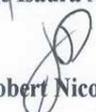


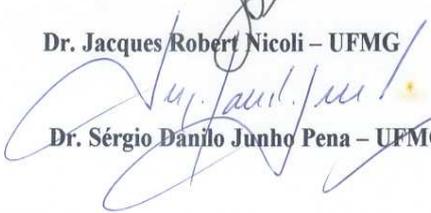
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RENATA NASCIMENTO FREITAS. Aos seis dias do mês de abril de 2001 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada pelo Colegiado do Curso em 6 de março de 2001, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudos Moleculares de Tecidos Normais e Tumores Malignos de Roedores Tratados com Samambaia (*Pteridium aquilinum*)", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Dr. Sérgio Danilo Junho Pena da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: - Dra. Luisa Villa, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, aprovada; - Dr. Andrew Simpson, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, aprovada; - Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; - Dr. Jacques Robert Nicoli da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; - Dr. Sérgio Danilo Junho Pena, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 6 de abril de 2001.

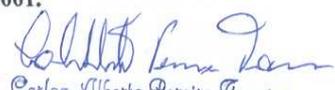

Dra. Luisa Villa - I. Ludwig/SP


Dr. Andrew John George Simpson - I. Ludwig/SP


Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - UFMG


Dr. Jacques Robert Nicoli - UFMG


Dr. Sérgio Danilo Junho Pena - UFMG


Prof. Carlos Alberto Petelca Cavates
Coordenador do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia ICB-UFMG

Ao Lúcio, pelo amor, dedicação e apoio ao longo de todos estes anos.

Ao Ryan, por ter me proporcionado a grande alegria de ser mãe.

“Só por fraqueza nos contentamos com o que outros e nós mesmos deparamos nessa caça ao saber; os mais aptos não se satisfazem e haverá sempre caminho a percorrer para quem vier depois, e até para nós se agirmos de outro modo.”

(Montaigne, *Ensaíos III, XII*)

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

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

Cancer Research Campaign (CRC) - UK

Paterson Institute for Cancer Research – Manchester - UK

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Sérgio D. J. Pena pela orientação correta e segura, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por seu exemplo de competência e critério científico.

Ao Professor Enio Cardillo Vieira por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança e amizade.

Ao Professor Geraldo Brasileiro-Filho da Faculdade de Medicina da UFMG pela colaboração, sugestões e valiosas discussões do trabalho.

Aos Dr. Peter O'Connor, Dr. Andrew C. Povey e Dr. Geoffrey Margison do *Paterson Institute for Cancer Research* pelo interesse, valiosas contribuições ao presente trabalho e também por terem me recebido com gentileza e atenção.

Aos Professores Marcelo Eustáquio Silva e Rinaldo Cardoso dos Santos da Escola de Nutrição da UFOP pela colaboração e interesse no trabalho com o broto de samambaia.

Às Professoras Andréa Mara Macedo, Élide Rabelo e Vânia Prado, amigas dos idos tempos de "Bases Moleculares da Estrutura e Função Celular" que mais uma vez se mostraram generosas, brilhantes e disponíveis para discutir os problemas e ajudar a encontrar soluções para as várias dificuldades enfrentadas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Glória Regina Franco, Fabrício dos Santos, Carlos Renato Machado e Annamaria Navarro pela amizade, gentileza, discussões enriquecedoras e preciosas sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Genética Bioquímica dos quais não vou me esquecer jamais, pela amizade, ajuda, apoio e por terem tornado mais fáceis os momentos difíceis, mais agradável o trabalho repetitivo e mais divertidos os momentos de descontração: Aléxia, Carlos Eduardo, Carlos Gustavo, Cláudia, Débora Aline, Débora,

Eduardo Tarazona, Flávia Parra, Jorge, Luciana Haddad, Luís, Magda, Patrícia Pessoa, Pedro, Renato, Riva, Rosane Sturzeneker, Simone e Túlio Marcos.

Agradeço especialmente aos queridos Andréia Vercesi pela amizade, pelas discussões, sugestões, companhia e ajuda nos trabalhos de clonagem e seqüenciamento; Analina pela ajuda na preparação das amostras para levar para a Inglaterra, pela paciência e disponibilidade em ajudar sempre; Charles pela paciência e ajuda na formatação da tese e montagem do seminário; Denise pela gentileza e amizade; Juliana Alves por ter me iniciado nos mistérios do ALF e nas análises dos seqüenciamentos; Juliana Pimenta pelo bom humor e espirituosidade que ajudaram muito a enfrentar as dificuldades; Luciana Andrade pela disponibilidade em ajudar sempre e discussões valiosas; Pacú pelas sugestões, discussões e ajuda nos experimentos de clonagem e ao “nobre e estimadíssimo” Rinaldo pela disponibilidade em ajudar sempre e principalmente pela consultoria em questões de informática mesmo enquanto estive na Inglaterra. Vou sentir muitas saudades de todos.

Às colegas Michelle, Kathy, Heba, Abir e Almeriane por terem tornado minha temporada no *Paterson Institute* tão prazerosa quanto produtiva. Saudades.

Às Professoras Leda Quércia Vieira, Jacqueline Alvarez Leite e Maria do Carmo Peluzio e a Ana Paula, Dirce e Ana Cristina do Laboratório de Gnotobiologia pelo convívio agradável e ajuda preciosa durante minha curta temporada no laboratório.

À Neuza Antunes Rodrigues, sempre amiga e disponível, cuja ajuda técnica foi muito importante para esta tese e cujo trabalho é essencial para o funcionamento do LGB.

À técnica Kátia Barroso pela confecção e corrida dos inúmeros géis de seqüenciamento que compuseram este trabalho, pela amizade e compreensão da urgência de obtenção dos resultados.

Às técnicas Miriam, do Laboratório de Genética e Bioquímica e Ronilda, do Laboratório de Gnotobiologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pelo cuidadoso trabalho de preparação do material essencial ao bom desenvolvimento deste trabalho e ao técnico Jair, do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de

Nutrição da UFOP, pelo cuidado com os animais, boa vontade e presteza sem os quais este trabalho teria sido muito mais árduo.

At last but not the least, ao Lúcio e Ryan; aos meus pais, Theobaldo e Jacira e irmãos Alexandre, Flávia e Ana Maria, pelo amor, carinho e por estarem sempre por perto quando preciso.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de tabelas	xiv
Lista de figuras	xv
1- Introdução	1
1.1 - A samambaia e o Câncer: a busca de marcadores moleculares	2
1.1.1- Toxicidade da samambaia	4
1.1.2- A samambaia e o câncer em humanos	8
1.2 - A iniciação: a carcinogênese química	11
1.2.1- Mecanismos da carcinogênese química	11
1.2.2- Detecção de adutos de DNA desconhecidos	16
1.3 - A promoção e a progressão: os eventos mutacionais	21
1.3.1 - Os genes de reparo	24
1.3.2 - Oncogenes: A família <i>ras</i>	27
1.3.3 - Gene p53: Um supressor de tumores	34
2 - Objetivos	39
2.1 - Objetivo Geral	40
2.2 - Objetivos específicos	40
3 - Material e Métodos	41
3.1 - Material	42
3.1.1 - Reagentes para os experimentos de detecção de adutos	42
3.1.2 - DNA modificado para ensaio de pós-marcação com ³² P	42
3.1.3 - Preparação das soluções de enzimas	43
3.1.4 - Tampões para extração de DNA	43

3.1.5 - Animais	44
3.1.6 - Samambaia	44
3.2- Métodos	44
3.2.1 - Obtenção das preparações de broto de samambaia	44
3.2.2 - Tratamento, sacrifício e coleta de tecidos dos ratos	46
3.2.3 - Estudos de adutos de DNA	47
3.2.3.a - Extração de DNA de tecidos	47
3.2.3.b - Diluição e quantificação das amostras de DNA	48
3.2.3.c - Pós marcação com ³² P	48
3.2.4 - Extração de DNA de tecidos normais e tumorais para PCR	54
3.2.5 - Quantificação das amostras de DNA em gel de agarose	55
3.2.6 - Polimorfismo Conformacional de Fita Simples de fragmentos amplificados por PCR (SSCP-PCR) dos exons 5,6,7,8 e 9 do gene <i>p53</i>	55
3.2.7 - Sequenciamento direto de produtos de PCR do gene <i>p53</i>	58
3.2.8 - Sequenciamento direto de produtos de PCR do gene <i>K-ras</i>	60
3.2.9 - Amplificação do gene <i>H-ras</i> para clonagem	60
3.2.10- Clonagem de produtos de PCR para sequenciamento	62
3.2.11 – Estudo de instabilidade de microssatélites	64
4 - Resultados	67
4.1 - Produção de tumores	68
4.2- Estudos de adutos de DNA	74
4.2.1 - Ratas tratadas com diferentes preparações de broto de samambaia por diferentes períodos de tempo	74
4.2.2 - Camundongos tratados com dose aguda de extrato ou esporos de samambaia	76
4.3 - Estudos de mutações	80
4.3.1 - SSCP-PCR e sequenciamento dos exons 5 a 9 do gene <i>p53</i>	80
4.3.2 - Sequenciamento dos genes <i>H</i> e <i>K-ras</i>	80
4.3.3 - Análise de microssatélites	81

5- Discussão	85
5.1 – Produção de tumores	86
5.2 – Estudos de adutos de DNA	87
5.3 – Estudos de mutações e instabilidade de microssatélites	91
6- Conclusões	98
7- Perspectivas	101
8- Referências Bibliográficas	104
9- Anexos	130
9.1 - Abstract	131
9.2 – Artigo 1	133
R.N. Freitas, P.J. O'Connor, A. S. Prakash, M. Shahin, and A. C. Povey. Bracken (<i>Pteridium aquilinum</i>)-Induced DNA Adducts in Mouse Tissues Are Different from the Adduct Induced by the Activated Form of the Bracken Carcinogen, Ptaquiloside. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 281 , 589-594 (2001).	
9.3 – Artigo 2	134
R. N. Freitas, G. Brasileiro-Filho, M.E. Silva, S. D. J. Pena. Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in <i>p53</i> , <i>H-ras</i> and <i>K-ras</i> and no microsatellite instability. <i>Mutation Research</i> 499 , 189-196 (2002).	

RESUMO

As propriedades tóxicas e carcinogênicas da samambaia (*Pteridium aquilinum*) têm sido extensivamente descritas em animais domésticos e experimentais. Alguns estudos epidemiológicos têm associado a exposição humana à samambaia e/ou suas toxinas com um aumento do risco de ocorrência de câncer de esôfago e estômago no Japão, Brasil, Costa Rica, Reino Unido e Venezuela. No entanto, estes estudos epidemiológicos não são suficientes para, inequivocadamente, estabelecer uma relação causal entre a samambaia e o surgimento destes cânceres em humanos. Assim, propusemo-nos no presente trabalho, a investigar a presença de marcadores moleculares da ação das toxinas da samambaia sobre o genoma de animais que, se encontrados, pudessem ser utilizados na avaliação do risco da exposição à samambaia para humanos. Investigamos inicialmente a formação de adutos de DNA em tecidos alvos normais de ratas tratadas via intragástrica com uma dose aguda única de extratos alcoólicos obtidos do broto de samambaia ou com diferentes preparações de broto de samambaia por médios e longos prazos. Utilizamos a metodologia de pós-marcação com ^{32}P para identificação de adutos de DNA. Nossos resultados indicam que adutos de DNA detectáveis por pós-marcação com ^{32}P não são formados em estômago e íleo de ratas tratadas com broto de samambaia via digestiva. Avaliamos a presença de adutos em amostras de DNA de tubos digestivos superior de camundongos tratados com dose aguda de extrato e esporos de samambaia e encontramos três adutos que já haviam sido descritos e ainda outros quatro adutos que não foram caracterizados. Nenhum destes adutos apresentou mobilidade cromatográfica similar ao único aduto obtido de DNA modificado *in vitro* com o ptaquilosídeo ativado (glicosídeo carcinogênico extraído da samambaia). Assim, concluímos que outras substâncias presentes na samambaia, além do ptaquilosídeo, são capazes de induzir a formação de adutos de DNA, podendo contribuir para a carcinogenicidade da samambaia em camundongos. Como parte da estratégia para identificação de marcadores moleculares da ação da samambaia sobre o genoma de ratos, e usando a carcinogênese de tumores colorretais humanos como modelo, examinamos oito tumores malignos induzidos pela samambaia em ratos para a presença de mutações nos genes associados com a “via clássica” para o câncer colorretal, *p53* e *ras* e também avaliamos a “via mutadora” estudando microssatélites. Os exons 5 – 9 do gene *p53* e os exons 1 e 2 dos genes *K-ras* e *H-ras* foram examinados por seqüenciamento de DNA e nenhuma mutação foi encontrada nos oito

tumores malignos. A amplificação de cinco locos de microssatélites previamente validados (um com repetição de mononucleotídeo, três com repetições de dinucleotídeos e um com repetições de tetranucleotídeos) nos tumores malignos e em tecido normal adjacente não revelou qualquer instabilidade. O envolvimento de mutações em outros genes supressores de tumor ou oncogenes da “via clássica” bem como em genes requeridos para a segregação cromossômica e eventos epigenéticos devem ser ainda investigados na pesquisa por marcadores moleculares de tumores induzidos pela samambaia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Alquilguanina
AT	Alquiltimina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
CTP	citidina 5'-trifosfato
GDP	guanosina 5' -bifosfato
GTP	guanosina 5' -trifosfato
Da	Dalton
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanina trifosfato
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HNPCC	Câncer de cólon familiar não poliposo
kDa	kiloDalton
MedG	metildesoxiguanina
MeG	metilguanina
MeT	metiltimina
µg	micrograma
µl	microlitro
MMR	Reparo de erros de pareamento
MSI	Instabilidade de microssatélites
pb	par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
SSCP-PCR	Polimorfismo conformacional de fita simples de produtos da reação em cadeia da polimerase
TAE	Tampão tris acetato EDTA

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela I: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos correspondentes aos exons 5 a 9 do gene <i>p53</i> amplificados de tumores e tecido normal de ratos tratados com samambaia	56
Tabela II: Iniciadores internos, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos correspondentes aos exons 5 a 8 do gene <i>p53</i> utilizados na segunda amplificação para o seqüenciamento direto de produtos de PCR	59
Tabela III: Iniciadores, tamanho dos fragmentos e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação dos exons 1 e 2 dos genes <i>K</i> e <i>H-ras</i> de amostras de tumor e tecido normal de ratos tratados com samambaia	61
Table IV: Localização dos locos, repetições, iniciadores e tamanho dos produtos de PCR usados para analisar instabilidade de microssatélites	66
Tabela V: Incidência e tipos histológicos de lesões proliferativas encontradas em ratos tratados com samambaia	69
Tabela VI: Distribuição das lesões entre ratos do grupo controle e tratados por longo tempo com samambaia	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Samambaia <i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>arachnoideum</i> subsp. <i>caudatum</i> encontrada na região de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	3
Figura 2: Estruturas do ptaquilosídeo, de seus metabólitos e sua reação com o DNA	6
Figura 3: Aspectos do consumo de samambaia por humanos em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	9
Figura 4: Esquema do ensaio de pós-marcação com ^{32}P para detecção de adutos de DNA	18
Figura 5: Regulação da ativação das proteínas Ras	32
Figura 6: Esquema da cromatografia de camada fina bidirecional para separação de adutos de DNA aromáticos	52
Figura 7: Aspecto macroscópico de tumores de bexiga e de íleo encontrados em ratas tratadas por longo prazo com samambaia	72
Figura 8: Cortes histológicos de lesões progressivas de íleo encontradas em ratas tratadas com broto de samambaia	73
Figura 9: Cromatogramas das análises de pós-marcação de DNA extraído de íleo de ratas tratadas com samambaia seca na ração	75
Figura 10:	77

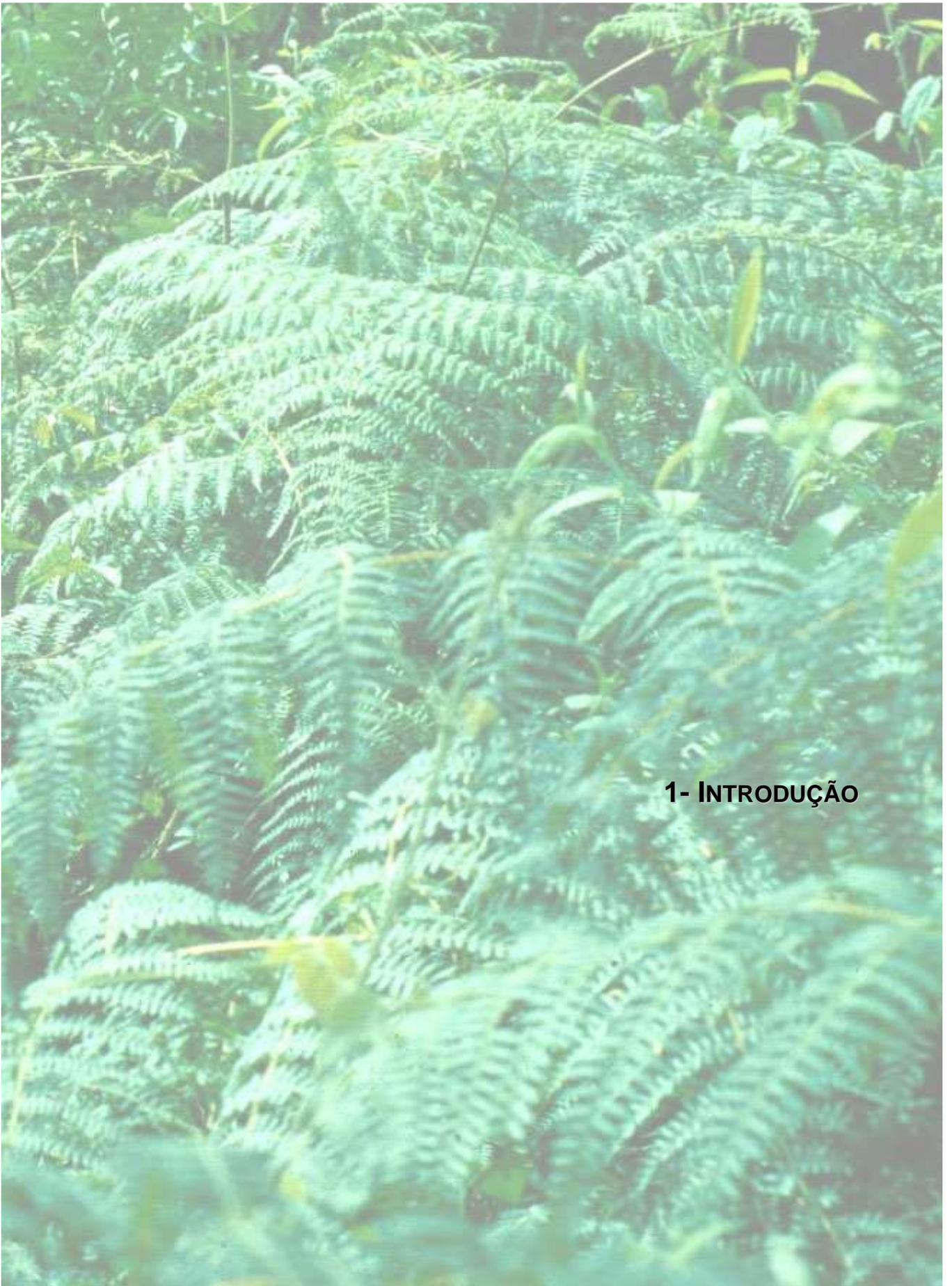
Cromatogramas das análises de pós-marcação de DNA extraído de íleo de ratas tratadas com uma dose intragástrica aguda de extrato de samambaia fresca

Figura 11: 79
Cromatogramas e co-cromatogramas da análise de pós-marcação de DNA extraído de tecido gastrointestinal superior de camundongos e DNA modificado *in vitro* com APT

Figura 12: 82
Fluorogramas relativos ao seqüenciamento automático da fita direta dos códons 50-54 de clones transformados com o exon 1 do gene *H-ras*

Figura 13: 83
Fluorogramas relativos ao seqüenciamento automático da fita direta dos códons 74-76 de clones transformados com o exon 2 do gene *H-ras*

Figura 14: 87
Análise da instabilidade de microssatélites para os locos PRLR e PBPC2



1- INTRODUÇÃO

1.1- A Samambaia e o Câncer: a busca de marcadores moleculares

Uma planta tão cosmopolita como a samambaia (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn, sin. *Pteris aquilina* L) dispensaria maiores introduções, já que cobre milhões de acres da superfície terrestre, sendo encontrada em todos os continentes do nível do mar até altitudes de 3000 metros. Pertence à família Pteridaceae que floresce na Terra desde o período Mesozóico médio, há aproximadamente 150 milhões de anos atrás. (Page, 1976; Rymer, 1976; Taylor 1980; Evans, 1984).

Suas grandes folhas triangulares podem crescer até 3 a 4 metros, sendo que sua reprodução se dá através da dispersão dos esporos presentes nas mesmas (Figura 1). Os esporos germinam para formar o protali, que contém os órgãos sexuais e, após a fertilização, os esporófitos jovens iniciam as novas colônias. O crescimento é lento, com a ramificação das raízes tipo rizomas, que produzem brotos curtos, cada um tornando-se uma única folha e brotos longos que estendem a colônia perifericamente. Aos rizomas é atribuída a grande resistência da samambaia aos programas de erradicação, como corte e queimada, já que estes crescem muitos centímetros abaixo da superfície da terra. Além disto, as folhas mortas, que se acumulam a cada inverno, protegem os rizomas, cobrindo-os. O crescimento de plantas competidoras é aparentemente inibido por fitotoxinas produzidas pela samambaia que são carregadas ao solo pela água da chuva. Estes compostos fitotóxicos ainda não foram bem identificadas e nem amplamente estudados (Gliessman, 1976; Watt, 1976).

O gênero *Pteridium aquilinum* é dividido geograficamente em duas subespécies: *aquilinum*, principalmente no hemisfério norte e África e *caudatum*, no hemisfério sul. Estas subespécies são divididas em 12 diferentes variedades (IARC, 1986), sendo que na América do Sul é encontrada principalmente a variedade *arachnoideum* da subespécie *caudatum*.

A samambaia é mais abundante em partes da Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia e sua proliferação tem causado problemas ambientais em partes da ex-URSS, România, Reino Unido, Brasil, Canadá e EUA, incluindo o Havaí (Taylor, 1980).



Figura 1 - Samambaia *Pteridium aquilinum* var. *arachnoideum* subsp. *caudatum* encontrada na região de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

O rápido desflorestamento, levando a perda do controle ambiental natural e o abandono de áreas de agricultura desgastadas, são os principais fatores para a proliferação (Rymer, 1976).

1.1.1- Toxicidade da samambaia:

Embora as propriedades tóxicas da samambaia *Pteridium aquilinum* sejam conhecidas desde o século XV, suas propriedades letais só foram cientificamente reconhecidas a partir de 1893, por causar no gado, quando ingerida, uma síndrome aguda, semelhante à síndrome decorrente de exposição a radiações ionizantes, conhecida agora como “envenenamento por samambaia”. A doença, quase sempre fatal, é caracterizada por hemorragia generalizada (perda massiva de sangue em alguns casos), anorexia, extensivo dano intestinal, ulceração de mucosa intestinal e severa hipertermia terminal (Evans, 1984). A morte ocorre em poucas semanas ou meses do início dos sintomas. Uma outra síndrome aguda, devido à ingestão da planta, observada em cavalos, resulta de lesões do sistema nervoso. Os eqüinos intoxicados apresentam, em geral, andar incerto, trôpego, posições anormais dos membros, incoordenação motora, podendo o quadro ser revertido pela terapia com tiamina. A presença de tiaminase na planta foi demonstrada por Evans e colaboradores (Evans *et al.*, 1950; Evans & Jones, 1952).

A primeira evidência da possível carcinogenicidade da samambaia foi descrita por Rosenberger e Heeschen em 1960 (Rosenberger & Heeschen, 1960), que descreveram hematúria e alterações de natureza poliposa na bexiga urinária de 5 bovinos alimentados com *P. aquilinum* verde ou seco na alimentação diária, durante 15 meses. Estas neoplasias, ocorrendo na bexiga urinária, seriam responsáveis pela “hematúria enzoótica dos bovinos” e, posteriormente, foi demonstrada também a ocorrência de neoplasias no trato digestivo superior destes animais (Pamukcu, 1955, 1963; Currial, 1965; Dobereiner *et al.*, 1967; Campos Neto *et al.*, 1975; Jarret, 1978). Estes trabalhos demonstraram que o “envenenamento por samambaia” e a “hematúria enzoótica bovina” representam diferentes expressões clínicas da exposição do gado à samambaia, dependentes do tempo e da quantidade ingerida. No entanto, a carcinogenicidade da samambaia pôde apenas ser firmemente estabelecida testando-se um número suficiente de animais experimentais. Assim, Evans e Mason em 1965,

utilizando ratos de ambos os sexos alimentados com samambaia seca incorporada à dieta normal a 33% (w/w), por 64 dias, observaram ocorrência de múltiplos adenocarcinomas da mucosa intestinal, predominantemente no íleo distal, em 100% dos ratos do grupo experimental, num prazo que variou de 7 meses a 1 ano. Nenhum tumor foi encontrado nos animais do grupo controle. Experimentos subsequentes, usando principalmente ratos, demonstraram a carcinogenicidade de *P. aquilinum* florescendo em diferentes partes do mundo e fornecidas aos animais em diferentes concentrações. Os resultados destes experimentos são bastante consistentes e observações interessantes emergem dos mesmos, como a diferença no grau de carcinogenicidade entre amostras de samambaia de diferentes áreas, sugerindo a influência de condições geográficas, a variação da toxicidade através da planta e variação na potência carcinogênica dependente da maturidade da samambaia (Evans, 1984).

Na tentativa de se identificar os princípios carcinogênicos e tóxicos da samambaia, muitos compostos foram isolados. Estes incluem taninos e ácidos orgânicos, pelo menos 5 flavonóides, aproximadamente 30 pterosinsesquiterpenos, e também polissacarídeos, glicosídeos, incluindo glicosídeos cianogênicos e ecdisonas. Astraglina e a isoquercetina (quercetina-3-glicosídeo) foram isolados do caule; catecolaminas e pteraquilina foram isoladas do rizoma. O conteúdo de alguns destes compostos pode sofrer variações sazonais e geográficas (IARC, 1986). Na década de 80, foi isolado o ptaquilosídeo (aquilídeo A), um glicosídeo norsesquiterpeno instável do tipo iludano, que foi caracterizado como o precursor metabólico das pterosinas (van der Hoeven *et al.*, 1983; Niwa *et al.*, 1983; Hirono *et al.*, 1984). Alguns autores creditam o efeito carcinogênico da samambaia à presença deste (Hirono *et al.*, 1984; 1987). O ptaquilosídeo é instável tanto em condições ácidas como básicas em temperatura ambiente e libera D-(+)-glicose (Figura 2), formando pterosinas não carcinogênicas e um conjugado instável, dienona (APT), que se acredita seja o princípio ativo (Ojika *et al.*, 1987). Este conjugado é extremamente instável em solução aquosa fracamente ácida, mas é estável em solução alcalina em temperatura ambiente por pelo menos 1 hora.

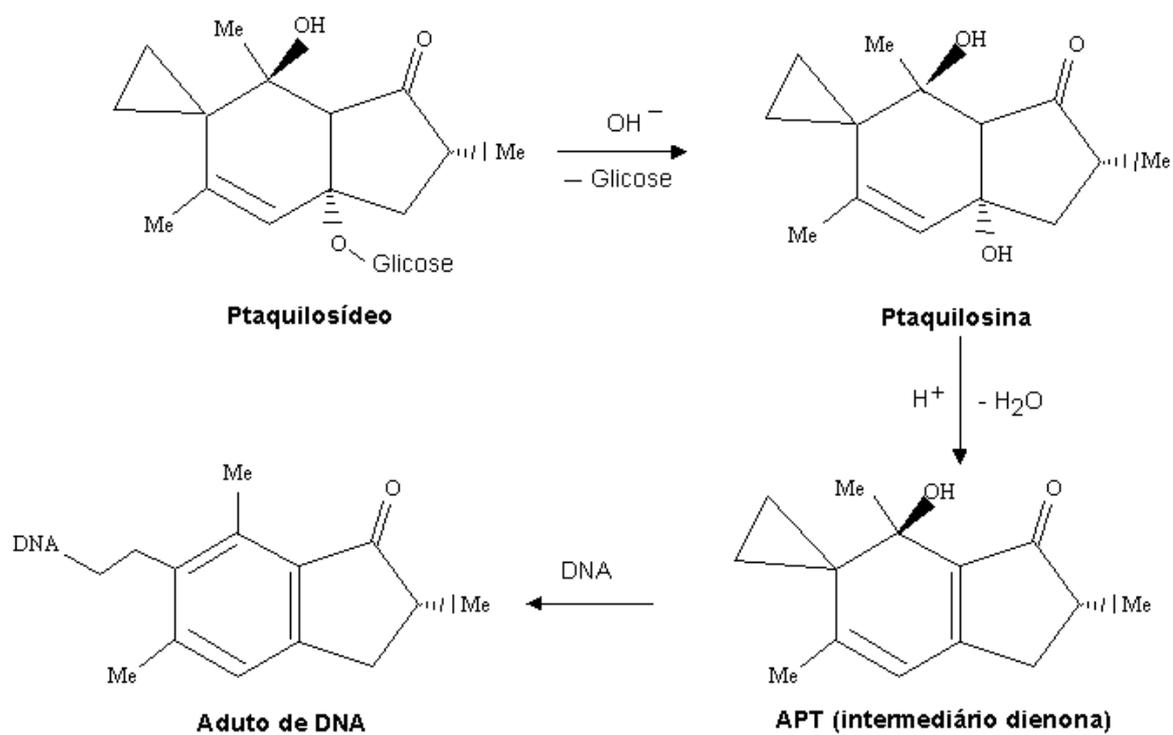


Figura 2 - Estruturas do ptaquilosídeo, de seus metabólitos e sua reação com o DNA.

Baseado em sua reatividade química tem sido proposto que a carcinogenicidade do PT é expressa via reação inicial com o DNA, levando a formação de adutos (Ojika *et al.*, 1989). Foi demonstrado que a dienona (APT) alquila N3 adenina via seu anel ciclopropil reativo e também forma adutos covalentes através de N7 guanina. Rompimento da fita de DNA também surge da clivagem espontânea de adutos em N3 adenina (principalmente), mas também em N7 guanina (Ojika *et al.*, 1989; Kushida *et al.*, 1994). Recentemente, outros glicosídeos sesquiterpenos (ptaquilosídeo Z, isoptaquilosídeo, caudatosídeo e pteridanosídeo) foram isolados da samambaia *Pteridium aquilinum* var. *caudatum* (Castillo *et al.*, 1997, 1998, 1999). Estes compostos são estruturalmente similares ao ptaquilosídeo, contendo tanto um anel ciclopropil ou um grupo ciclobutil e podem, portanto reagir com o DNA e serem carcinogênicos. Em um ensaio de toxicidade com camarão, o ptaquilosídeo Z exibiu uma toxicidade similar àquela apresentada pelo ptaquilosídeo isolado da mesma variedade de samambaia (Castillo *et al.*, 1998).

A quercetina, também isolada da samambaia (IARC, 1986), apresenta propriedades antioxidantes benéficas (Formica & Regelson, 1995). Tem sido proposto que a quercetina age como co-carcinógeno com o papiloma vírus bovino tipo 2 na indução de câncer de bexiga e com papiloma vírus bovino tipo 4 na indução de câncer de intestino em gado (Jackson *et al.*, 1993; Connolly *et al.*, 1998; Campo *et al.*, 2000). A quercetina forma aduto com DNA (Rahman *et al.*, 1990), induz mutações tanto em células procariotas (Bjieldanes & Chang, 1977; Maruta *et al.*, 1979) como eucariotas (Nakayasu *et al.*, 1986; Ishikawa *et al.*, 1987) e causa quebras cromossômicas (Ishidate, 1988). Ainda, a quercetina pode lesar células germinais de camundongos levando a anormalidades de espermatozóides (Rastogi & Levin, 1987). Foi também demonstrado que a quercetina causa tumores intestinais e de bexiga em ratos (Pamukcu *et al.*, 1980). Por outro lado, quercetina apresenta-se como um potente antioxidante *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1996; Cotelle *et al.*, 1996) e mostrou-se mutagênica mas não carcinogênica em ratos Fischer (Stoewsand *et al.*, 1984).

1.1.2- A samambaia e o câncer em humanos:

Muitos autores têm indicado diferentes possibilidades de risco humano por exposição indireta ao(s) carcinógeno(s) da samambaia: este(s) pode(m) ser transferido(s) através da placenta em camundongos (Evans *et al.*, 1972; Pamukcu *et al.*, 1978; Villa Lobos-Salazar *et al.*, 1990) ou pode(m) ser transmitido(s) via leite como foi demonstrado quando camundongos foram alimentados com dieta suplementada com leite de vacas às quais foi dada samambaia como alimento (Villalobos-Salazar *et al.*, 1990). Posteriormente, o produto de degradação do ptaquilosídeo, a pterosina B, foi isolado do leite de vacas alimentadas com samambaia (Alonso-Amelot *et al.* 1996). Outras possibilidades de exposição indireta do homem são a ingestão de carne de bovinos que ingeriram a samambaia, a ingestão de água contaminada pela planta através da lixiviação das folhas pela água da chuva, bem como a inalação dos esporos durante a primavera em áreas onde ela é muito freqüente (Evans, 1987; Trotter, 1990; Simán *et al.*, 2000).

A samambaia é cultivada comercialmente para o consumo humano no Japão, Canadá, Sibéria e nordeste dos EUA (Bryan & Pamukcu, 1982; Rymer, 1976). A samambaia é usada como salada verde e no Japão o broto de samambaia é popularmente servido como petisco. A samambaia fresca é preparada de duas maneiras: tanto por imersão em água fervente pura ou em água contendo bicarbonato de sódio ou cinzas de madeira, ou conservada em salmoura e imergida em água fervente logo antes do uso. No Brasil, na região de Ouro Preto, o broto da samambaia é amplamente consumido tanto pela população rural, devido à facilidade com que é coletado nos meses chuvosos, entre outubro e maio, quanto pela população urbana, sendo vendido nas feiras livres e comércio dos bairros. Na região de Ouro Preto, o broto de samambaia é usualmente preparado fervendo-se por três vezes em água com uma pitada de bicarbonato de sódio para diminuir o sabor amargo. O broto de samambaia costuma ser servido com carne e pode ser encontrado em alguns restaurantes da região de Ouro Preto e mesmo em Belo Horizonte, o broto de samambaia pode ser saboreado em pelo menos um restaurante e é encontrado para comércio no mercado central (Figura 3).

Quanto às evidências do risco da exposição humana à samambaia, a literatura apresenta quatro relatos epidemiológicos relacionando a exposição à samambaia ao



Figura 3- Aspectos do consumo de samambaia por humanos em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. À esquerda em cima, a parte comestível do vegetal (o broto) e embaixo, o broto de samambaia em exposição no comércio local. À direita de cima para baixo, a comercialização de broto de samambaia na feira livre e no comércio de rua dos bairros e o prato pronto para ser servido.

câncer do trato gastrintestinal superior em humanos. No Japão, a ingestão diária de samambaia tem sido associada com elevação do risco de câncer de esôfago de 2,1 vezes em homens e 3,7 vezes em mulheres (Hirayama, 1979). A elevada incidência de câncer gástrico observada no norte da Grã-Bretanha foi cuidadosamente analisada no distrito de Gwynedd onde uma elevação de 2,3 vezes do risco relativo foi associado com a exposição à samambaia em escolares das populações de pequenas comunidades rurais (Galpin *et al.*, 1990). Na Costa Rica, foi comparada a incidência de câncer gástrico entre habitantes de regiões montanhosas, onde a samambaia cresce abundantemente e habitantes de regiões baixas onde não se encontra samambaia. Neste trabalho, observou-se o aumento da incidência de câncer gástrico nas regiões montanhosas de 2-3 vezes em homens e por um fator de 6,3 em mulheres (Villalobos-Salazar, 1989). Um estudo de caso controle associando o consumo de samambaia com a incidência aumentada de câncer gástrico e de esôfago na região de Ouro Preto mostrou um aumento de 3,63 vezes do risco de desenvolvimento de câncer de esôfago e estômago (após correção dos valores para os fatores como sexo, idade, consumo de álcool e hábito de fumar) em indivíduos que consumiam broto de samambaia regularmente por mais de 40 anos (Marlière *et al.*, 1995). Recentemente Alonso-Amelot e Avendano (2001), a partir de um estudo epidemiológico realizado na Venezuela, concluíram que o consumo de leite contaminado com o ptaquilosídeo pode contribuir para a ocorrência de câncer gástrico em humanos que vivem nos estados andinos da Venezuela.

Apesar destas evidências, os estudos até agora realizados não são suficientes para demonstrar a relação inequívoca entre o consumo de samambaia ou a exposição a seus produtos com o surgimento de tumores na espécie humana, devido à exposição que o ser humano apresenta a um grande número de carcinógenos potenciais. De acordo com as conclusões do grupo de trabalho do IARC (1986) na Avaliação do Risco Carcinogênico de Químicos aos Humanos, “Existe *evidência suficiente* da carcinogenicidade da samambaia em animais experimentais”, mas “Existe *evidência inadequada* para a carcinogenicidade da samambaia para humanos”. Desta maneira, acreditamos que a determinação da(s) lesão(s) causadas(s) especificamente pelas toxinas da samambaia ao DNA *in vivo* seja necessária, antes que a exposição humana seja definitivamente demonstrada e acuradamente quantificada.

1.2- A iniciação: a carcinogênese química

1.2.1- Mecanismos da carcinogênese química:

O termo câncer não se refere a uma única doença, mas a um grupo de doenças heterogêneas que compartilham algumas características biológicas (em particular o crescimento celular clonal e a habilidade invasiva). Os cânceres são doenças bastante complexas que podem se desenvolver devido a uma multiplicidade de fatores ambientais, genéticos e metabólicos. Os fatores ambientais podem envolver as três classes gerais de agentes carcinogênicos: certas radiações ionizantes, certos vírus e certas substâncias químicas, bem como a combinação entre estes agentes. É bem estabelecido que a radiação solar UV em altas doses é responsável pela maioria dos cânceres de pele (Upton, 1977; Urbach et al, 1972). Da mesma forma, radiações ionizantes podem causar uma variedade de câncer em humanos (Upton, 1977). O papel das viroses na etiologia dos cânceres humanos é bem conhecido. Existem correlações positivas entre exposição ao Vírus da Hepatite B e câncer hepático humano (Berenblum, 1981), entre infecção pelo Vírus Papiloma Humano e câncer cervical e entre infecção pelo Vírus Epstein-Barr e linfoma de Burkitt (Ruddon, 1995).

A carcinogênese química foi primeiramente reconhecida em humanos há quase três séculos atrás em 1761, quando Hill encontrou um aumento na incidência de pólipos e câncer nasais com o uso prolongado e excessivo de rapé de tabaco (Redmond, 1970). Em 1775, Pott notou um câncer na pele do escroto característico de limpadores de chaminés no norte da Europa e correlacionou esta ocorrência à exposição destas pessoas por muitos anos à fuligem de carvão e ao alcatrão (Potter, 1963). Desde então, numerosas substâncias e misturas químicas têm sido identificadas como carcinogênicas e a elas é atribuída a causa de grande parte dos cânceres humanos (IARC, 1980). A exposição a agentes mutagênicos químicos pode ocorrer via constituintes naturais da dieta, através de químicos sintéticos (pesticidas, cosméticos, medicamentos, químicos industriais) e de misturas complexas (como fumaça de cigarro e contaminantes do ar e água) (Ames, 1979). Em alguns casos, os carcinógenos podem ser espontaneamente reativos em meio biológico, mas a maior parte deles é inerte e requer a conversão a um intermediário reativo. Uma categoria de enzimas conhecidas coletivamente como

oxidases de função mista convertem estes xenobióticos em agentes eletrofílicos altamente reativos que reagem instantaneamente com sítios nucleofílicos em moléculas substratos, notadamente DNA, RNA e proteínas. Dados disponíveis corroboram a idéia de que um passo essencial na iniciação da carcinogênese química é a ligação covalente entre DNA-carcinógeno, com a formação de adutos capazes de promover um evento mutagênico (Miller & Miller, 1981).

Acredita-se então que a alquilação do DNA seja o primeiro passo na iniciação da carcinogênese quimicamente induzida. Produtos primários destas reações são geralmente promutagênicos ou letais e sua ocorrência leva a um risco aumentado de mutação e câncer. Estes produtos de reação, os adutos de DNA, têm chamado especial atenção não apenas devido a seu potencial mutagênico, mas também devido à sensibilidade e especificidade dos métodos para sua análise (Cooper, *et al.*, 1995). Assim, a identificação e avaliação do nível de adutos de DNA formados por determinada substância química ou mistura de substâncias, têm sido amplamente utilizados como dosímetros internos do nível de risco do desenvolvimento de câncer em humanos, devido à exposição a carcinógenos químicos (Beach & Gupta, 1992). Então, os adutos de DNA, formados pelas toxinas da samambaia em animais expostos, poderiam ser utilizados como marcadores moleculares da ação desta toxina sobre o genoma. Uma vez caracterizados, os adutos de DNA formados pelas toxinas da samambaia, através da administração oral da samambaia a animais experimentais, poderiam ser utilizados como “padrões” de adutos para a busca destas lesões no DNA da população humana exposta à samambaia.

Oncogenes e genes supressores de tumor são dois alvos críticos para carcinógenos químicos, levando a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Alguns trabalhos mostram que danos ao DNA na forma de adutos são capazes de ativar o oncogene *ras* (Balmain *et al.*, 1984; Marshall *et al.*, 1984; Sukumar *et al.*, 1983) e especula-se que possam afetar a expressão de genes reguladores e genes supressores de tumor (Knudsen, 1985). Mutações dos protooncogenes *H-ras* e *K-ras*, por exemplo, têm sido observadas em modelos de carcinogênese de pele, fígado, pulmão e glândula mamária de roedores. As mutações observadas nos tumores correlacionam-se com a esperada modificação de bases induzida pelo carcinógeno: transição de bases G → A com agentes alquilantes (metilnitrosouréia - NMU e N-metil-

N'-nitro-*N*-nitrosoguanidina - MNNG), transversões G → T com benzo(a)pireno (BP), transversões A → T com 7,12 dimetilbenzoantraceno (DMBA) e transversões G → T com aflatoxina B1 (Harris, 1991). Um exemplo bem documentado de inativação de gene supressor de tumor durante a carcinogênese é o gene p53. Mutações do gene p53 têm sido observadas em tumores animais e em uma grande variedade de cânceres humanos. A maioria das mutações envolve mutações de ponto e ocorrem em “hot spots” entre os exons 5 e 8. Estes “hot spots” estão localizados nos domínios mais conservados destes exons. Em tumores de cólon humano, a maioria das mutações é composta por transições G → A (como para *ras*); no entanto, outros tipos de alterações de bases em *p53* são observadas em outros cânceres humanos. Talvez a observação mais interessante seja a de uma alta incidência de mutações de ponto em *p53* em carcinomas hepatocelulares em pacientes de certos locais da China e sul da África onde a exposição a aflatoxina B1 é endêmica (Bressac *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1991). A maioria destas mutações ocorre em um único sítio, a terceira base do códon 249, e são transversões G → T. Além do mais, carcinomas hepatocelulares de áreas de baixa exposição a aflatoxina apenas raramente apresentam este tipo de mutação (Ruddon, 1995).

Adutos de DNA podem ocorrer em vários sítios na molécula. No entanto, a formação dos adutos envolve fatores eletrônicos e estereoquímicos específicos tal que a ligação, especialmente com compostos aromáticos volumosos, não é simplesmente aleatória (Weinstein, 1983). O anel de nitrogênio e o átomo de oxigênio exocíclico das bases de DNA e o átomo de oxigênio das ligações fosfato internucleotídeos são modificadas produzindo mais de uma dúzia de lesões de DNA (Saffhill *et al.*, 1985; Margison & O'Connor, 1990; Memisoglu & Samson, 1996). Alquilação ocorre nas posições N-1, N-3, e N-7 de adenina; nas posições N-3, N-7, e O⁶ de guanina; N-3, e O² de citosina; e N-3, O⁴ e O² de timina. A extensão da reação com átomos de oxigênio e nitrogênio é dependente do mecanismo pelo qual os diferentes agentes reagem com o DNA. Agentes que reagem via uma reação nucleofílica unimolecular (S_N1) seguindo cinética de primeira ordem (e.g. compostos nitrosos) tendem a reagir mais rapidamente com átomos de oxigênio no DNA em comparação com aqueles que reagem via uma reação nucleofílica bimolecular (S_N2) segundo a cinética de segunda ordem (e.g. metilmetanosulfonato MMS) (Horsfall *et al.*, 1990; Ludlum, 1977; Saffhill *et al.*, 1985). Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a alquilação dos átomos de oxigênio das bases de

DNA é biologicamente mais crítica do que a alquilação em outras posições para os efeitos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por compostos N-nitrosos (Montesano, 1981) e a maioria destes efeitos tem sido caracterizados usando os mais simples agentes alquilantes, os agentes metilantes.

As principais lesões promutagênicas são O^6 - alquilguanina (O^6 -AG), que tendem, durante a replicação do DNA, a parear inadequadamente com timina ao invés de citosina e O^4 -alquiltimina (O^4 -AT), que pode parear com guanina. Em uma segunda rodada de replicação do DNA, estas substituições levam predominantemente a transições GC→AT no caso da alquilguanina e transições AT→GC pela alquilpirimidina, com algumas transversões (Saffhil *et al.*, 1985). A metilação de N7-meG também ocorre em níveis 10-100 vezes mais altos que O^6 -meG e representa até 70% do total de adutos por metilação seguindo-se a exposição a compostos nitro-nitrosos (NOC) (Suemasu *et al.*, 1990). No entanto, não existem evidências de que estas lesões são promutagênicas *per se* (Gentil *et al.*, 1992; Loeb *et al.*, 1985); a substituição de N7 em guanina, desestabiliza a ligação glicosil resultando na formação de sítios apurínicos ou na abertura de anel imidazol (Kadulbar *et al.*, 1984; Barbarella *et al.*, 1991). Sítios apurínicos são promutagênicos, promovendo a incorporação inadequada de adenina durante a síntese de DNA (Loeb *et al.*, 1985), enquanto que estruturas de anel imidazol abertas resultam na paralisação da replicação de DNA (Tudek *et al.*, 1992).

Embora os adutos estejam relacionados à exposição ao carcinógeno, parece que a extensão de danos que ocorrem em sítios específicos é mais importante em termos de carcinogenicidade. Alguns destes adutos parecem ser relativamente inócuos, enquanto outros são potencialmente mutagênicos, dependendo de sua natureza.

Uma vez formados, adutos de DNA são prontamente reparados por proteínas do sistema de reparo responsáveis pela remoção destas lesões. Em uma célula, o balanço entre a frequência de insultos ao DNA e a disponibilidade da proteína de reparo apropriada, determina o quanto uma lesão em particular pode persistir e, portanto, as conseqüências biológicas da sua ocorrência.

O reparo do dano causado por alquilação no DNA ocorre por diferentes processos que são específicos para certos tipos de lesões (revisado por Friedberg *et al.*, 1995). O reparo

de alquil adutos no DNA ocorre por dois processos qualitativamente diferentes, que foram primeiro elucidados em sistemas bacterianos. As lesões promutagênicas O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) e O⁴-metiltimina (O⁴-MeT) são reparadas por um mecanismo de alquil DNA transferase, que diretamente, e sem romper a fita, remove o grupo alquil do DNA em uma reação estequiométrica autoinativadora. Esta proteína, a O⁶-AG-DNA alquiltransferase (ATase), repara o par de bases GC no caso de O⁶-MeG e o par de bases AT com O⁴-MeT. Em células de mamíferos, estes adutos são reparados por diferentes proteínas e apenas o mecanismo de alquiltransferase para o reparo de O⁶-AG está bem caracterizado (Cooper *et al.*, 1995). O reparo de outras lesões, como n-alquil purinas (por exemplo, 3-metiladenina e 7-metilguanina) e O²-alquilpirimidinas, envolve a excisão de bases, no qual a base modificada é removida, com a formação de um sítio apurínico ou apirimidínico, o qual é então cortado por uma AP-endonuclease. A fita de DNA é então reparada por síntese, tendo como molde a fita oposta, e refeita por uma DNA ligase (Saffhil *et al.*, 1985; Lindahl 1982).

Adutos de DNA, se não reparados ou mal reparados, antes da replicação celular, podem induzir mutações e presumivelmente contribuir com a iniciação e a transformação maligna celular (Harris, 1985; Perera, 1988). Portanto, adutos de DNA representam um estágio crítico precoce e detectável no processo da carcinogênese química e podem então, ser usados como dosímetros internos da exposição ao carcinógeno (Henderson *et al.*, 1989; Weinstein, 1981; Wogan, 1989). Evidências experimentais fornecidas por estudos de tumorigenicidade em pele de camundongo, sugerem que posteriormente aos eventos formadores de adutos, em estágios mais tardios no processo do câncer, a continuidade na formação de adutos também pode aumentar a conversão de papilomas benignos em carcinomas malignos de células escamosas (Hennings *et al.*, 1983; Scherer, 1984). Uma relação causal e quantitativa entre a formação de adutos e carcinogenicidade tem sido indiretamente sugerida pelo seguinte: (i) *in vivo*, muitos hidrocarbonos aromáticos policíclicos e agentes alquilantes apresentam uma capacidade formadora de adutos que se correlaciona com sua potência carcinogênica (Lutz, 1986); (ii) *in vitro*, a formação de adutos e a indução de tumor e transformação celular têm uma correlação positiva (Poirier, 1984); e (iii) o nível de adutos é geralmente mais alto nos órgãos alvos de espécies animais sensíveis quando comparados com espécies animais resistentes (Wogan & Gorelick, 1985). Adutos de DNA, produzidos em tecidos e células humanos *in vitro*, são qualitativamente

similares àqueles encontrados em animais expostos *in vivo*, apoiando a extrapolação de dados de ensaios com animais para o cenário humano e o uso de adutos de DNA como dosímetros da exposição humana a agentes genotóxicos (Beach & Gupta, 1992).

Então, o conhecimento dos eventos moleculares que podem resultar em seqüelas adversas seguindo-se à exposição a determinado agente químico, permite que marcadores moleculares de qualquer estágio do processo carcinogênico forneçam informações relevantes aos outros estágios (Henderson, 1989; Schulte, 1989). Desta forma, o uso de tais biomarcadores pode ter utilidade óbvia na avaliação do risco de câncer baseada em dados de exposição precoce, considerando o grande período de latência e o processo multifatorial dos cânceres humanos (Perera, 1987).

1.2.2- Detecção de adutos de DNA desconhecidos:

Metodologias altamente sensíveis e sofisticadas para avaliação e quantificação de adutos de DNA têm sido desenvolvidas nas duas últimas décadas. Estes métodos representam um grande avanço no campo de avaliação de adutos que podem ser detectados em níveis de 1 por 10^6 - 10^{10} nucleotídeos normais. Diferentes abordagens têm sido usadas, sendo as mais comuns: imunoensaios, ensaios fluorescentes e pós-marcação com ^{32}P . Recentemente, o uso de citometria de fluxo (Shinozaki *et al.*, 1998) e espectrometria de massa (Doerge *et al.*, 1998) tem sido descrito, sendo que ambos validam os dados obtidos com a pós-marcação com ^{32}P . Todas as metodologias têm vantagens e desvantagens e a escolha de cada uma delas dependerá do esquema de avaliação da exposição proposto. O método de pós-marcação com ^{32}P é apropriado para a avaliação e quantificação de adutos que ocorrem em baixos níveis, usando-se pouca quantidade de DNA, pois pode detectar adutos na faixa de 1 por 10^7 - 10^{10} nucleotídeos usando 1 - 10 μg de DNA (Beach & Gupta, 1992). Além disto, não é quimicamente específico como os imunoensaios, ensaios fluorescentes, citometria de fluxo e espectrometria de massa, permitindo a detecção de quaisquer adutos separáveis por cromatografia, podendo então detectar adutos desconhecidos formados por misturas complexas (Gupta, 1993).

O ensaio de pós-marcação com ^{32}P foi primeiramente descrito em 1981 (Reddy *et al.*, 1981) para análise de nucleotídeos normais e no mesmo ano, Randerath e colegas (Randerath *et al.*, 1981) detectaram adutos de DNA modificado *in vitro* por agentes alquilantes não aromáticos utilizando este método. Desde então, centenas de artigos foram publicados nos quais este ensaio foi usado para a detecção de adutos de DNA com mais de 140 agentes ou misturas complexas, sendo 80% destes, compostos aromáticos volumosos (Beach & Gupta, 1992). O ensaio básico (Figura 4) envolve uma série de reações bioquímicas seqüenciais que são: (i) digestão do DNA intacto a deoxinucleosídeos 3'-monofosfatos com diferentes enzimas; (ii) ligação de ^{32}P , mediada por uma polinucleotídeo quinase, à terminação 5' dos nucleotídeos modificados, criando um 3', 5'-bifosfato; (iii) separação dos adutos por cromatografia de camada fina em placas de troca aniônica de polietilenamina celulose (PEI-celulose) por esquemas de solventes multidirecionais variáveis; (iv) detecção dos adutos por autoradiografia; e (v) quantificação dos adutos através da medida da radioatividade. Várias modificações foram propostas ao método original que permitiram o aumento da sensibilidade da técnica para detecção de diferentes classes de adutos (Gupta, 1993). Em geral, estas modificações buscaram aumentar a concentração de adutos na amostra digerida, por eliminação dos nucleotídeos normais ou por marcação preferencial dos nucleotídeos modificados com ^{32}P .

Em 1985, Randerath e colegas publicaram um método alternativo ao procedimento original, que envolve a marcação preferencial dos nucleotídeos modificados em relação aos nucleotídeos normais, pela quinase, em condições de deficiência de ATP. Em ambos os procedimentos entretanto, a sensibilidade fica usualmente na faixa de 1 aduto por 10^7 - 10^8 nucleotídeos. No mesmo ano, Gupta (1985), propôs um método de enriquecimento particularmente apropriado para análise de adutos DNA-carcinógenos aromáticos, especialmente aqueles derivados de hidrocarbonos policíclicos aromáticos. Após a digestão enzimática do DNA a deoxiribonucleosídeos 3'-monofosfatos, a concentração dos adutos de DNA pode ser aumentada por extração com *n*-butanol na presença de um agente transferidor de fase, o cloreto de tetrabutyl amônia. No entanto, este procedimento de extração por solvente parece não ser aplicável a adutos de carcinógenos de baixo peso molecular. Outra forma de enriquecimento proposta é o tratamento do DNA digerido a nucleotídeos com nucleases com atividade

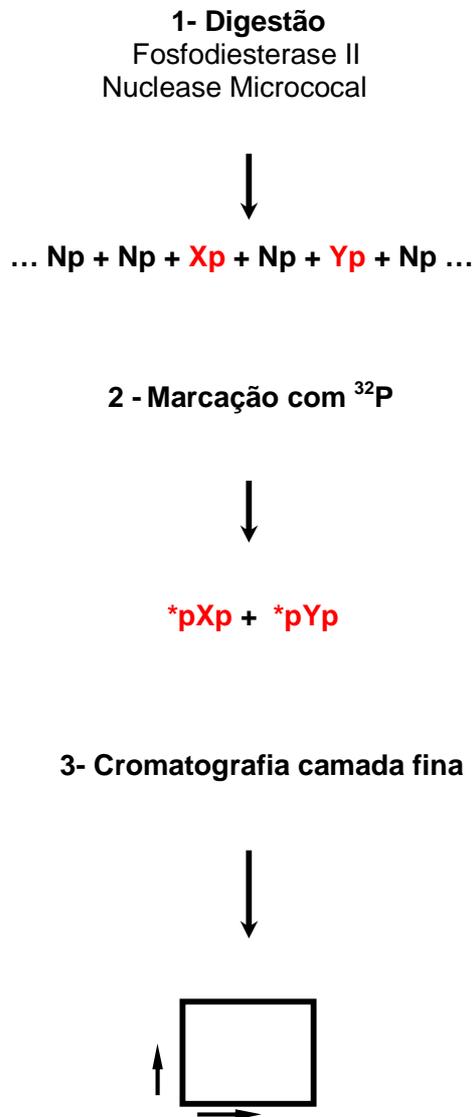


Figura 4 - Esquema do ensaio de pós-marcção com ^{32}P para detetecção de adutos de DNA. O DNA contendo adutos é inicialmente digerido a nucleotídeos, sendo que o produto desta digestão contém deoxinucleosídeos 3'monofosfatos normais (Np) e modificados (Xp, Yp). A seguir estes são marcados na extremidade 5' com ^{32}P pela polinucleotídeo quinase T4 e separados bidirecionalmente por cromatografia de camada fina em placas de PEI celulose.

fosfodiesterase como a nuclease P1 de *Penicilium citrinum* ou a nuclease S1 de *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas são capazes de remover o fosfato 3' de nucleotídeos normais convertendo-os a nucleosídeos, mas não o fosfato correspondente dos nucleotídeos modificados com a maioria dos compostos aromáticos. Estas versões enzimáticas para o aumento da sensibilidade do método, visam reduzir a competição pela marcação com ^{32}P dos nucleosídeos normais, uma vez que a quinase de polinucleotídeos T4, usada na reação de marcação, é capaz de adicionar um fosfato à terminação 5' de nucleotídeos, mas não de nucleosídeos (Reddy, 1991; Reddy & Randerath, 1986). Apesar de a maioria dos nucleotídeos modificados serem resistentes à ação das nucleases, nem todos os adutos são intensificados da mesma maneira (Reddy, 1991). Em ambos os processos de enriquecimento, químico ou enzimático, os adutos de DNA podem ser marcados na presença de excesso de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ livre de carreador, aumentando a sensibilidade para 1 aduto por 10^{10} nucleotídeos (Beach & Gupta, 1992). O enriquecimento do conteúdo de adutos nas amostras por HPLC (cromatografia líquida de alta performance) antes da marcação com ^{32}P também tem sido descrito (Dunn & San, 1988). O DNA digerido contendo uma mistura de nucleotídeos normais e modificados é injetado em uma coluna de fase reversa. Os nucleotídeos normais eluem com um tampão contendo 5% de metanol e 95% de formato de amônia 1M pH 3.5. As bases modificadas são posteriormente eluídas tanto em um gradiente linear de metanol para a recuperação fracionada dos adutos, quanto por um gradiente "step" para a recuperação de todos os adutos em uma única fração. As frações recuperadas são então secas, marcadas com ^{32}P e resolvidas em placas de cromatografia de camada fina de PEI-celulose. Este método permite resultados qualitativamente comparáveis com o método enzimático que utiliza a nuclease P1.

Apesar de todas estas modificações, o método de pós-marcação com ^{32}P para detecção de adutos ainda apresenta algumas dificuldades relacionadas à variabilidade na marcação (Watson, 1987), labilidade de alguns adutos de DNA (Dipple *et al*, 1985), recuperação diferencial dos adutos nos procedimentos de enriquecimento (Gupta & Early, 1988), perda de alguns adutos devido à digestão incompleta do DNA (Reddy *et al*, 1985) e limitações na quantificação da radioatividade com o uso de auto-radiografia acoplada com contagem da radioatividade por cintilação.

A partir de 1990, com o desenvolvimento de tecnologia para a aplicação de placas de imagens de fósforo armazenadas fotoestimuláveis para auto-radiografia de amostras marcadas com ^{32}P , ^{14}C e ^{35}S (Johnston *et al.*, 1990), um melhoramento significativo foi obtido na quantificação da radioatividade de adutos resolvidos por TLC (Reichert *et al.*, 1992). Os materiais para armazenamento de fósforo fotoestimuláveis foram desenvolvidos para a diminuição do tempo de exposição de filmes de raios-X usados em radiografias médicas (Luckey 1975). Posteriormente, a técnica, conhecida como imagem de fósforo armazenada (storage phosphor imaging), foi adaptada para a quantificação de radioatividade em superfícies planas (Amemiya & Miyahara, 1988; Johnston *et al.*, 1990). Neste método, uma placa armazenadora de imagem é colocada sobre uma fonte de radioatividade, como uma placa de TLC por exemplo, de maneira similar a um filme para auto-radiografia. As placas armazenadoras de imagens disponíveis comercialmente são compostas de finos cristais de BaFBr:Eu^{+2} em uma matriz orgânica (Amemiya & Miyahara, 1988). Radiações de alta energia (por exemplo, raios-X, luz UV, raios gama ou partículas beta) são capazes de excitar um elétron do íon Eu^{+2} , que é reduzido a Eu^{+3} , formando um complexo excitado, BaFBr^- , que apresenta uma faixa de absorção diferente, ao redor de 660nm (Johnston *et al.*, 1990). Assim, forma-se uma imagem latente estável de distribuição e intensidade de acordo com a radioatividade do cromatograma. Após o tempo de exposição, a imagem latente armazenada é submetida a uma varredura com laser vermelho (663 nm). A energia armazenada, proporcional à energia absorvida, é então liberada e a intensidade da luminescência gerada é medida. A informação gerada é armazenada de forma digitalizada e pode ser analisada com auxílio de programas de análise de imagens. Assim, a quantificação de adutos individuais em um cromatograma é imensamente facilitada, permitindo que diferentes cromatogramas, com diferentes amostras sejam expostos a uma mesma placa armazenadora de imagens, facilitando a comparação entre as amostras. Além disto, devido à alta sensibilidade do método, quantidades menores de radioatividade são requeridas no ensaio, diminuindo o nível de “background” e facilitando a estimativa deste. Aliado a menor manipulação dos cromatogramas requerida, esta tecnologia torna o ensaio muito mais seguro para o pesquisador. Por último, o registro digitalizado permanente que é criado, facilita a análise retrospectiva de amostras (Reichert *et al.*, 1992).

Utilizando a metodologia de pós-marcação com ^{32}P , Povey e colaboradores (1996), demonstraram a presença de adutos de DNA no trato digestivo superior de camundongos aos quais foi administrado intragastricamente extrato aquoso obtido da samambaia ou esporos de samambaia coletada em diferentes regiões do Reino Unido.

1.3- A promoção e a progressão: os eventos mutacionais

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos estágios, podendo ser dividido em iniciação, promoção e progressão. A iniciação da transformação maligna de uma célula normal por um agente carcinogênico envolve uma mudança permanente e hereditária na expressão gênica das células transformadas. Isto pode ocorrer tanto por um efeito genotóxico direto como por eventos mutacionais, nos quais o agente carcinogênico reage diretamente com o DNA, ou por eventos indiretos ou “epigenéticos” que modulam a expressão gênica sem diretamente reagir com a seqüência de bases do DNA.

A maioria dos pesquisadores favorece a teoria mutacional da carcinogênese, isto é, eventos que envolvem uma ação direta sobre o genoma, devido à principalmente três observações: (i) agentes que provocam danos ao DNA são freqüentemente carcinogênicos, (ii) a maioria dos agentes carcinogênicos são mutagênicos e (iii) a incidência de câncer em pacientes com deficiências no sistema de reparo de DNA está aumentada (Ruddon, 1995). Embora a teoria mutacional seja a explicação mais simples para uma mudança hereditária na célula que pode produzir um evento iniciador do câncer, nem todos os agentes iniciadores são mutagênicos em alguns sistemas testes usados e nem todos reagem diretamente com o DNA. Em casos nos quais uma interação direta com o DNA parece não ocorrer, é provável que a regulação da expressão do DNA esteja alterada por algum mecanismo indireto ou epigenético.

Há mais de 15 anos tem sido reconhecido que células tumorais apresentam modelos de metilação alterados em relação às células normais. Uma hipometilação global do genoma (Goelz *et al.*, 1985) é acompanhada por hipermetilação de regiões específicas

(Jones & Laird, 1999). As regiões que parecem ser alvos freqüentes para eventos de hipermetilação são ilhas CpG (Baylin *et al.*, 1998). Ilhas CpG são regiões ricas em GpC de aproximadamente 1 kb que estão normalmente associadas com regiões promotoras (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Metilação de ilhas CpG são raras nas células normais, tendo importância na inativação do cromossomo X (Panning & Jaenisch, 1992) e impressão genômica (Li *et al.*, 1993), aumentando com a idade (Ahuja *et al.*, 1998), e em culturas celulares *in vitro* (Antequera *et al.*, 1990). Nos últimos anos tem sido descrita, em diferentes tumores, hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de vários genes supressores de tumor como *PRb* (Stirzaker *et al.*, 1997), *VHL* (Herman *et al.*, 1994), *P16* (Ruas & Peters, 1998), *P15* (Herman *et al.*, 1996), *hMLH1* (Herman *et al.*, 1998), *APC* (Hiltunen *et al.*, 1997) e *BRCA1* (Dobrovic & Simpfendorfer, 1997). Esta hipermetilação é acompanhada por perda da função gênica e presumivelmente confere uma vantagem de crescimento às células tumorais. Tem sido então amplamente aceito que certos tumores apresentam alteração dos padrões de metilação que podem modificar a expressão de genes importantes na correção de erros e regulação da replicação e ciclo celular. Entretanto, os mecanismos pelos quais estes padrões de metilação alterados ocorrem no desenvolvimento do tumor, ainda não são claros.

Outras alterações que resultam na transformação maligna podem ser resultado de (i) interação do agente carcinogênico com proteínas de membrana que regulam os fatores de crescimento ou que controlam a regulação por mecanismo de “feedback” da proliferação celular no microambiente da célula, (ii) reação com moléculas de RNA envolvidas na transcrição proteica, (iii) ligação a proteínas regulatórias que controlam a transcrição gênica ou, (iv) interação com proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (Ruddon, 1995).

Assim, tem sido amplamente aceita a idéia de que o câncer resulta da acumulação de mutações em genes que controlam diretamente a replicação, o crescimento e a morte celular. No entanto, os mecanismos através dos quais estas mutações são geradas ainda são objetos de contínuo debate. Tem sido argumentado que uma instabilidade genética é absolutamente necessária para a ocorrência destas múltiplas mutações que geram o câncer (Hartwell, 1992; Loeb, 1991). Por outro lado, tem sido sugerido que taxas de mutação normais, acopladas com ondas de expansão clonal, são suficientes para que o processo ocorra em humanos (Tomlinson *et al.*, 1996). Diferentes alterações

genéticas afetando os genes que controlam o crescimento celular têm sido identificadas nos últimos anos, fornecendo evidências para as bases genéticas do câncer. Então, os agentes iniciadores de tumores agem mais provavelmente induzindo modificações como: pequenas alterações de seqüência, alterações no número de cromossomos, translocações cromossômicas e ampliações gênicas; produzindo uma célula genotipicamente alterada (Lengauer *et al.*, 1998).

Dois processos separados controlam a taxa de erros de replicação e asseguram a fidelidade da replicação do DNA: a polimerização e o reparo. A maquinaria de reparo opera em erros de seqüências gerados pelas enzimas DNA polimerases ou por agentes mutagênicos. Mutações podem ocorrer como resultado da incorporação inadequada de nucleotídeos pela DNA polimerase durante a replicação de DNA molde não lesado ou mesmo durante a síntese de reparo. Estudos de fidelidade da síntese de DNA indicam que DNA polimerases purificadas incorporam nucleotídeos não complementares em taxas muito mais elevadas do que se poderia esperar baseado na taxa de mutações espontâneas em células humanas (Loeb & Loeb, 2000). As taxas de erros de DNA polimerases purificadas de mamíferos variam de 1 nucleotídeo não complementar incorporado para cada 5.000 para a DNA polimerase β (enzima responsável pela síntese de fragmentos curtos durante a síntese de reparo) a 1 nucleotídeo não complementar incorporado para cada 10.000.000 para as DNA polimerases δ e ϵ (envolvidas na replicação do DNA) (Umar & Kunkel, 1996; Hindges & Hubscher, 1995; Syvaoja *et al.*, 1990). Mutações podem tornar estas enzimas propensas a erros (Clairmont & Sweasy, 1996). Ainda, o aumento de DNA polimerase β em certos tumores sugere a possibilidade de que estas enzimas possam substituir enzimas mais precisas, resultando em um aumento da mutagênese (Canitrot *et al.*, 1999). Em *Escherichia coli*, dano ao DNA resulta na indução de uma resposta propensa a erros, referida como resposta SOS (Witkin, 1976). Suspeita-se que esta via facilite a aceitação de lesões bloqueadoras durante a replicação de DNA, através da indução de proteínas que tornam a DNA polimerase normal propensa a erros. Recentemente, uma das proteínas envolvidas na resposta SOS, UmuD'₂C, foi identificada como uma DNA polimerase propensa a erro, designada como Pol V (Tang *et al.*, 1998; 1999). Além disto, uma DNA polimerase propensa a erro similar foi identificada em leveduras (Johnson *et al.*, 1999) e está mutada em uma variação de células de xeroderma pigmentoso (XP-V). Foi também demonstrado, que a maquinaria de replicação de DNA isolado de câncer de mama

humano exibe uma diminuição significativa da fidelidade de replicação, indicando que alterações funcionais na maquinaria de replicação do DNA nestas células podem potencializar a taxa de mutações genéticas e a instabilidade genômica observada nestes tumores (Sekowski *et al.*, 1998). Defeitos nos dois maiores sistemas de reparo (reparo por excisão de nucleotídeos e reparo de erros de pareamento) têm sido bem documentados.

1.3.1- Os genes de reparo:

Os sistemas de reparo por excisão de base ou por excisão de nucleotídeo (nucleotide-excision repair-NER e base excision repair-BER), como dito anteriormente, podem corrigir modificações covalentes no DNA resultantes de vários mutagênicos químicos e de radiações ultravioleta. Pacientes portadores de xeroderma pigmentoso, uma doença autossômica recessiva, desenvolvem numerosos tumores de pele nas áreas expostas ao sol. Os fibroblastos destes pacientes são sensíveis a luz ultravioleta e o padrão desta sensibilidade varia, indicando o envolvimento de diferentes genes (De Weerd-Kastelein *et al.*, 1972). Experimentos genéticos e bioquímicos identificaram mutações nos genes de NER como responsáveis por estas desordens (Bootsma *et al.*, 1998). Tumores de pele, na verdade, representam os principais tipos de tumores aos quais pacientes com NER defeituoso apresentam, indicando que a radiação ultravioleta é o principal agente mutagênico que causa danos ao DNA possíveis de serem reparados por NER.

Além destes, erros de pareamento de bases que ocorrem durante a replicação, podem ser reparados pelo sistema de reparo de erros de pareamento. O sistema de reparo de erros de pareamento (“mismatch repair” – MMR) foi descoberto em procariontes há muito tempo, mas apenas nos últimos 7 anos tem sido envolvido no desenvolvimento do câncer. O primeiro indício para um envolvimento de MMR no câncer veio da descoberta de um grupo de tumores colorretais esporádicos (não familiares) que exibiam alterações em microssatélites poli(A) e poli(CA) distribuídas pelo genoma, dando origem ao termo “instabilidade de microssatélites” (Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993). Microssatélites são seqüências de nucleotídeos repetitivas de tamanhos variáveis (2 a 6 pb) que ocorrem no genoma, entre e dentro de genes. Devido a sua natureza repetitiva, estas seqüências são particularmente susceptíveis a erros durante a replicação, devido

a derrapagens entre as fitas, que resultam em uma pequena alça no DNA molde ou na fita recém sintetizada. Isto pode levar a um aumento ou diminuição do tamanho dos microssatélites. Apesar destes erros replicativos que ocorrem nas células, os microssatélites são normalmente estáveis em relação ao seu tamanho devido à eficiência do MMR. No entanto, alguns tumores apresentam erros de replicação (RER) e incapacidade de manter o tamanho dos microssatélites, sendo que esta instabilidade de microssatélites pode também afetar seqüências não repetitivas do genoma. Embora os microssatélites estejam quase sempre em regiões não codificadoras, as células de câncer colorretal apresentando erros de replicação (RER), também apresentam uma taxa de mutação aumentada em genes expressos, o chamado "fenótipo mutador" (Bhattacharyya *et al.*, 1994; Eshelman *et al.*, 1995). Virtualmente todos os tumores de pacientes com câncer colorretal familiar sem polipose, HNPCC (Aaltonen, 1993), apresentam instabilidade de microssatélites ("microsatellite instability" - MSI). Os locos responsáveis por HNPCC foram mapeados nos cromossomos 2p16 e 3p21 (Lindblom *et al.*, 1993; Peltomaki, 1993). Strand e colegas (Strand *et al.*, 1993), sugeriram que a instabilidade de microssatélites podia resultar de um sistema de MMR defeituoso, pois notaram que bactéria e *Saccharomyces cerevisiae*, com defeitos nos genes *mutS* ou *mutL* ou seus homólogos, do MMR, exibiam um aumento na taxa de mutações espontâneas, fenótipo similar a instabilidade de microssatélites. Posteriormente, os genes humanos homólogos a *mutS* e *mutL*, respectivamente *hMSH2* e *hMLH1*, foram localizados nos cromossomos 2 e 3 (Bronner *et al.*, 1994; Fishel *et al.*, 1993). Estudos mostrando que tumores que exibem MSI não apresentam atividade de MMR em ensaios bioquímicos (Parsons *et al.*, 1993), fundamentaram a idéia de que a inativação dos genes do sistema de reparo de erros de pareamento leva ao fenótipo de instabilidade de microssatélites em pacientes com câncer (Peltomaki & de la Chapelle, 1997). Nos últimos anos, estudos genéticos e bioquímicos realizados em eucariotos têm definido cinco genes, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* (também chamado *GTBP*), *MLH1* e *PMS2* (chamado *PMS1* em *Saccharomyces cerevisiae*), que codificam para proteínas que são homólogas a proteínas de MMR de bactérias e são requeridas para o MMR de DNA de eucariotos (revisado por Kolodner, 1996 e Modrich & Lahue, 1996). Um sexto gene humano, *PMS1*, também tem sido sugerido como importante para o reparo de erros de pareamento (Kolodner, 1996). Aproximadamente 70% dos probandos com HNPCC e MSI, apresentam mutações nos genes de MMR; a maioria das mutações em células

germinativa tem sido encontrada em *hMLH1* e *hMSH2*, enquanto que mutações germinativas em *hPMS1* e *hPMS2* parecem ser eventos raros (Liu *et al.*, 1996).

Uma observação relevante extraída dos estudos de neoplasias com defeitos em MMR é relacionada à herança dominante de HNPCC. Em geral, pacientes com HNPCC apresentam um alelo normal do gene relevante de MMR. Este alelo normal é suficiente para manter níveis normais de MMR (Parsons *et al.*, 1993). Apenas quando o alelo normal é inativado durante a carcinogênese é que MMR é abolido e as mutações se acumulam. Neste sentido, os genes de MMR podem ser considerados como supressores de tumor. As células descendentes desta célula "iniciada" acumulam mutações em oncogenes e outros genes supressores de tumor, na fase de promoção, resultando em expansão clonal. Isto ocasiona uma seleção das mutações somáticas em genes de reparo, durante a carcinogênese, mesmo que tais mutações não levem diretamente a um aumento do crescimento celular.

Por outro lado, parcela razoável dos tumores colorretais esporádicos apresentam instabilidade de microssatélites e a grande maioria destes tumores RER, não apresentam mutações nos genes de MMR (Aaltonen, 1998). Nestes casos, parece que a instabilidade de microssatélites resulta mais freqüentemente da inativação epigenética de *hMLH1* associada com hipermetilação da região promotora do gene (Herman *et al.*, 1998; Kane *et al.*, 1997).

Na carcinogênese de tumores colorretais, duas diferentes vias podem ser reconhecidas: uma, chamada de "via clássica", é a mais comum e depende de eventos mutacionais múltiplos e acumulativos (germinativa e/ou somática) em genes supressores de tumores e oncogenes ou inativação de alelos normais por deleção ou por hipermetilação de promotores de genes supressores de tumor; a outra, "via mutadora", depende de uma mutação precoce no sistema de MMR (germinativa ou somática) ou a inativação destes genes por hipermetilação de promotores, levando a um acúmulo acelerado de mutações em genes alvo críticos (devido ao fenótipo mutador) e a progressão para a malignidade. A distinção entre estas duas vias parece ter importância prognóstica, já que existem evidências de que pacientes apresentando tumores colorretais com MSI, apresentam uma sobrevida maior (Thibodeau *et al.*, 1993). Esta observação pode ser devida ao fato de que mecanismos de reparo com falhas acarretam, como já dito, um aumento na

freqüência de mutações. Como conseqüência, o mesmo defeito genético que é responsável pela iniciação e progressão do tumor, também pode reduzir a viabilidade destas células (Sankila *et al.*, 1996).

1.3.2- Oncogenes: A família *ras*

O termo oncogene foi cunhado para definir um gene capaz de causar câncer. Obviamente este é um conceito muito simplista, pois como visto anteriormente, existem evidências de que a gênese de um tumor é complexa, envolvendo processos multifatoriais e de múltiplas etapas. Os oncogenes foram descobertos a partir de estudos envolvendo certos retrovírus capazes de induzir a transformação maligna em células infectadas (Ruddon, 1995). As mais comuns viroses oncogênicas, como a virose da leucemia de longa latência, contêm apenas genes para replicação e causam tumores por mutações (inserções) que freqüentemente levam meses para se manifestarem clinicamente. No entanto, alguns vírus isolados apresentam a propriedade de induzir tumores em animais infectados após curtos períodos de latência (geralmente dias ou semanas) e, além disto, são freqüentemente capazes de causar alterações morfológicas em culturas celulares.

A dissecação do genoma destes vírus mostrou que a maioria havia perdido genes codificadores da replicação e, portanto eram defeituosos na replicação, mas competentes para a transformação celular. Seqüências de nucleotídeos diferentes foram encontradas inseridas no lugar do material deletado. Estas novas seqüências foram designadas *oncogenes*. Técnicas de seqüenciamento e hibridização revelaram aproximadamente 30 diferentes oncogenes virais (*v-onc*), cujas seqüências eram quase idênticas a seqüências do DNA celular da espécie animal a partir do qual o vírus foi isolado. Além do mais, foi demonstrado que estes oncogenes haviam sido muito conservados durante a evolução, sendo encontrados no DNA celular de virtualmente todos os vertebrados superiores. O termo protooncogene foi proposto para designar a contraparte celular dos *v-onc*, para distinguí-los como genes que apenas apresentam potencial para atividade oncogênica. No entanto, estes são também referidos muitas vezes como oncogenes celulares (*c-onc*).

É claro, no entanto, que estes genes não são ativos nas células como causadores de câncer, já que RNA mensageiro e produtos protéicos destes são encontrados normalmente em diferentes tipos celulares, algumas vezes expressos em estágios particulares do ciclo celular. Estudos de expressão protéica tornaram claro que estes são genes altamente regulados que participam do programa de crescimento e diferenciação da célula normal. Também se tornou evidente, a partir destes estudos, que os oncogenes celulares podem ser anormalmente expressos em certos tumores como resultado de alteração na regulação, mutação, amplificação ou translocações cromossômicas.

Genes *ras* compõem uma família gênica encontrada em todos os eucariotos de fungos a mamíferos. O termo *ras* deriva das palavras *rat sarcoma* porque estes genes foram primeiro identificados como o princípio transformante das cepas Harvey e Kirsten das viroses de sarcoma de ratos (Barbacid, 1987), duas retrovíroses transformantes geradas pela transdução dos genes celulares de rato, *H-ras-1* e *K-ras-2*, respectivamente (DeFeo *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1981). Estes genes já haviam sido identificados em cepas de vírus de sarcoma de ratos e foram “redescobertos” quando foi descoberta a existência de oncogenes dominantes em humanos e em tumores animais induzidos por carcinógenos. A maioria destes genes transformantes foi então identificada como alelos mutantes dos genes celulares da família *ras* (Barbacid, 1987).

A evolução tem preservado suas funções biológicas e proteínas Ras de leveduras podem transformar células de mamíferos e proteínas Ras de mamíferos podem sustentar o crescimento de células de levedura mutantes (DeFeo *et al.*, 1985). As proteínas RAS parecem participar em processos biológicos múltiplos e freqüentemente distintos e a análise de seqüência destes genes e seus produtos revelam um alto grau de conservação. Em mamíferos, estas proteínas têm sido implicadas na proliferação celular (Mulcahy, *et al.*, 1985) e na diferenciação terminal (Noda *et al.*, 1985), o que sugere que estas podem funcionar como um ponto crítico nas vias de transdução de sinal. Três genes *ras* são identificados no genoma mamífero. Estes são designados *H-ras-1*, *K-ras-2* e *N-ras*. Dois pseudogenes são identificados e caracterizados em ratos e humanos: *H-ras-2* e *K-ras1*. Todos os genes foram clonados e seqüenciados em humanos, camundongos e em ratos (Barbacid, 1987; van Kranen, 1994). Em humanos, *N-RAS* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p22-p23), enquanto que *H-*

RAS-1 e *K-RAS-2* foram mapeados no braço curto dos cromossomos 11 (11p15.1-p15.5) e 12 (12p12.1), respectivamente. Em ratos, o gene *H-ras-1* está mapeado no cromossomo 1 e *K-ras-2* no cromossomo 4 (revisto por O'Brien, 1984). Os três genes *ras* codificam para proteínas genericamente conhecidas como P21 (Shih *et al.*, 1979). As seqüências codificadoras para P21 de cada um destes genes são igualmente distribuídas em quatro exons, exceto para o gene *K-RAS-2*, que possui dois quartos exons alternativos (exons IVA e IVB) que permite a síntese de duas proteínas p21 isomórficas de 188 e 189 resíduos que diferem no seu domínio carboxi terminal (Capon, *et al.*, 1983; McGrath *et al.*, 1983; Shimizu *et al.*, 1983).

A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida das proteínas P21 *H-RAS-1*, *K-RAS-2* e *N-RAS* ajudaram a definir 4 domínios dentro destas moléculas. O primeiro domínio compreende a porção amino terminal das proteínas P21 e é uma região altamente conservada. Por exemplo, os primeiros 85 resíduos de aminoácidos das proteínas P21 de mamíferos de seqüências conhecidas (*H-RAS-1*, *K-RAS-2* e *N-RAS* de humanos, *H-ras-2* de rato e *K-ras-2* e *N-ras* de camundongo) são idênticos. Os próximos 80 resíduos definem um segundo domínio onde as estruturas de proteínas de diferentes mamíferos divergem levemente uma da outra (por exemplo, existe 85% de homologia entre qualquer par de genes *ras* humano). O terceiro domínio compreende uma região altamente variável e os últimos quatro resíduos compõem o quarto domínio onde a seqüência Cys¹⁸⁶–A-A-X-COOH (onde A é qualquer aminoácido alifático) está presente em todos os membros da família *RAS* (Barbacid, 1987).

Os genes *ras* de mamíferos adquirem propriedades transformantes por mutações de ponto únicas que ocorrem nas suas seqüências codificadoras (Reddy *et al.*, 1982; Tabin *et al.* 1982; Taparowsky *et al.*, 1982). Mutações ocorrendo naturalmente em genes *ras* estão localizadas nos códons 12 (Reddy *et al.*, 1982; Tabin *et al.*, 1982; Taparowsky *et al.*, 1982), 13 (Bos *et al.*, 1985), 59 (Dhar *et al.*, 1982) e 61 (Brown *et al.*, 1984; Taparowsky *et al.*, 1983). Estudos de mutagênese *in vitro* mostram que mutações nos códons 63 (Fasano *et al.*, 1984), 116 (Walter *et al.*, 1986) e 119 (Sigal *et al.*, 1986) também podem conferir propriedades transformantes aos genes *ras*.

A presença do resíduo de glicina na posição 12 parece ser necessária para a função normal das proteínas Ras. A substituição de Gly¹² por qualquer outro aminoácido,

exceto prolina, resulta na ativação oncogênica desta molécula (Seeburg *et al.*, 1984). Um efeito similar é observado se Gly¹² é deletada ou se um aminoácido adicional é inserido entre Ala¹¹ e Gly¹² (Chipperfield *et al.*, 1985). A substituição do aminoácido vizinho, Gly¹³, também tem conseqüências transformantes para a célula, embora neste caso nem todas as substituições parecem ter o mesmo efeito ativador (Bos *et al.*, 1985; Fasano *et al.*, 1984). Mutações no domínio ao redor do códon 61 também têm um papel muito importante na geração de oncogenes *ras* (Brown *et al.*, 1984; Taparowsky *et al.*, 1983; Yuasa *et al.*, 1983). A substituição de Gln⁶¹ por qualquer outro resíduo de aminoácido, exceto Pro⁶¹ ou Glu⁶¹ (e um pouco menos por Gly⁶¹), produz oncogenes *ras* (Der *et al.*, 1986). Substituições no resíduo 59 tem sido observada apenas em oncogenes retrovirais (Dhar *et al.*, 1982) ou mutados *in vitro* (Fasano *et al.*, 1984). Em todos os casos, a substituição do resíduo de Ala⁵⁹ normal por Thr⁵⁹ tem sido observada.

As proteínas RAS estão localizadas na face interna da membrana plasmática, são capazes de ligar nucleotídeos guanina (GTP e GDP) (Scolnick *et al.*, 1979, Shih *et al.*, 1980, Tamanoi *et al.*, 1984; Temeles *et al.*, 1985) e possuem atividade GTPase implicada na regulação de sua atividade (Gibbs *et al.*, 1984; Temeles *et al.*, 1985). A relevância destas atividades para a função biológica das proteínas Ras tem sido demonstrada por três diferentes linhas de evidências: (a) a microinjeção de anticorpos anti RAS que inibem a ligação do nucleotídeo guanina, reverte o fenótipo maligno de células NIH3T3 transformadas por oncogenes RAS (Feramisco *et al.*, 1985); (b) mutantes RAS que perderam a habilidade de ligar nucleotídeos guanina não transformam células NIH3T3 (Willumsen *et al.*, 1986) e (c) a atividade GTPase dos genes RAS está severamente impedida nos alelos transformantes (Gibbs *et al.*, 1984; Temeles *et al.*, 1985). Além da ligação a GTP/GDP e atividade GTPase, proteínas RAS com uma mutação Ala⁵⁹→Thr⁵⁹ exibem atividade autofosforilativa (Shih *et al.*, 1980).

As propriedades bioquímicas das proteínas RAS se assemelham àquelas das proteínas G envolvidas na modulação da transdução de sinal através do sistema de sinalização transmembrana (Gilman, 1984). Este fato tem levado à proposição de que as proteínas RAS podem estar envolvidas em diferentes tipos de vias de sinalização mediadas por ligantes. Posteriormente, foi demonstrado que as proteínas RAS influenciam a proliferação, diferenciação, transformação e apoptose através da liberação de sinais mitogênicos e de crescimento no citoplasma e no núcleo celular (Khosravi Far & Der,

1994). Na maioria das células normais as moléculas RAS estão presentes em uma conformação inativa ligada a GDP. Um estímulo extracelular inicia a liberação de GDP e a ligação com GTP. Esta modificação conformacional habilita a interação com as moléculas efetoras e permite a transmissão do sinal. Finalmente, o estado ativo ligado a GTP é inativado pela hidrólise de GTP a GDP. A atividade GTPase intrínseca é fraca e não é suficientemente efetiva para as vias de transdução de sinal quando uma rápida inativação é necessária. De maneira a acelerar esta baixa taxa de hidrólise e permitir uma atividade de sinalização transitória, proteínas reguladoras como PAGs (proteínas ativadoras de GTPase) (Ahmadian *et al.*, 1996) ou proteína NF-1 (neurofibromatose tipo 1) (McCormick, 1995), ligam-se à conformação ligada a GTP e aumentam em mais de 100 vezes a atividade GTPase da proteína RAS. A diminuição dos níveis de RAS-GTP, e, portanto, o aumento de RAS-GDP resulta na perda da atividade biológica de RAS (figura 5). Na célula normal, PAGs ajudam a manter a maior parte de p21RAS no estado inativo ligado a GDP. O achado de superexpressão de genes *RAS* não mutado apóia a idéia de que a abundância de PAGs é limitada (Watzinger & Lion, 1999). A superexpressão de p21RAS poderia levar a saturação das proteínas reguladoras resultando em uma perda da regulação constitutiva da ativação das proteínas RAS e a transformação oncogênica. Outro grupo de proteínas reguladoras envolvidas na ativação das proteínas RAS é composto pelas proteínas designadas fatores de troca de nucleotídeo guanina (FTGs) ou fatores liberadores de nucleotídeo guanina (FLGs) (Satoh & Kaziro, 1992). Normalmente, a liberação de GDP é regulada pela concentração intracelular de GTP. Um aumento na concentração de GTP leva a um aumento na dissociação de GDP (veja figura 5). Uma proteína RAS livre de ligante liga GTP imediatamente porque este é 10 vezes mais abundante no citoplasma do que GDP.

A estabilização da proteína em seu estado ativo resultaria na transformação maligna. Teoricamente, isto poderia ocorrer quando mutações inibem a atividade GTPase intrínseca das proteínas RAS ou ainda quando a proteína é superexpressa. Altos níveis de proteína normal podem produzir moléculas no estado ativo ligado a GTP suficientes para induzir a transformação maligna sem afetar o equilíbrio entre as formas ativa e inativa característica das proteínas normais (Barbacid, 1987). Então, os genes *ras*

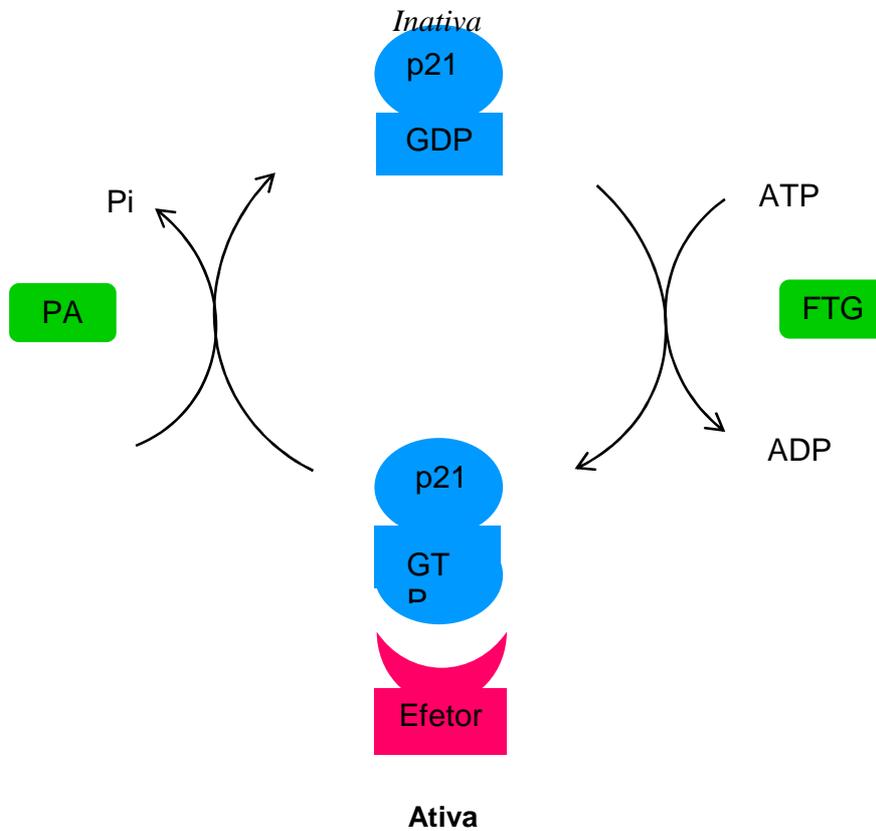


Figura 5- A atividade das proteínas RAS é regulada por um ciclo de ligação e hidrólise de nucleotídeo guanina. No estado ativo, p21 está ligada a GTP, no estado inativo a GDP. FTG (Fator de Troca de Guanina); PA (Proteína Ativadora de GTPase); Pi, fosfato inorgânico.

adquirem propriedades transformantes tanto por mecanismos qualitativos ou quantitativos e a combinação destas alterações qualitativas e quantitativas podem resultar em oncogenes capazes de induzir um espectro completo de fenótipos neoplásicos.

Oncogenes *ras* celulares transformam linhagens celulares estabelecidas de uma maneira dominante (Barbacid, 1985; Varmus, 1984). Nem os proto-oncogenes residentes nem a cotransfecção com os respectivos alelos normais afetam a eficiência de transformação dos oncogenes *ras*. No entanto, os níveis de expressão parecem modular sua potência transformadora (Winter & Perucho, 1986). Os oncogenes *ras* são necessários não apenas para a iniciação, mas também para a manutenção do fenótipo transformado.

Oncogenes *RAS* são mais freqüentemente encontrados em tumores de etiologia não viral. Em particular, tumores de animais induzidos por carcinógenos químicos ou físicos, tem sido abundante fonte desta classe de genes (Hyland *et al.*, 1985). Ainda, oncogenes *RAS* estão presentes em aproximadamente 10% das formas mais comuns de neoplasias humanas, sendo a família de oncogenes mais freqüentemente identificada em cânceres humanos (Barbacid, 1985; Marshall, 1985; Varmus, 1984). A ativação reprodutiva de oncogenes *ras* em tumores induzidos por carcinógenos possibilitou o estabelecimento de correlações entre mutações ativadoras e os efeitos mutagênicos conhecidos de certos carcinógenos. Por exemplo, as mutações mais comumente induzidas por nitroso-metiluréia (NMU) são transições G → A. Estas mutações resultam do pareamento inadequado provocado por O⁶-metilguanossina, um dos adutos gerados pela atividade metilante de NMU. Os oncogenes *H-ras-1* presentes em carcinomas mamários induzidos por NMU apresentam estas mesmas mutações, que não são encontradas quando o agente químico indutor de tumor é o dimetilbenz (a)antraceno (DMBA) (Eadie *et al.*, 1984; Loechler *et al.*, 1984). DBMA por sua vez, forma grandes adutos com resíduos de adenina e guanina, cujo reparo raramente permite a geração de substituições G → A (Singer & Kusmierk, 1982). Estas observações levaram a proposição de que MNU é diretamente responsável pela ativação maligna das oncogenes *H-ras-1* nestes tumores mamários (Zarbl *et al.*, 1985). O conceito de que oncogenes *ras* podem ser diretamente ativados por carcinógenos químicos é fortalecida com evidências experimentais obtidas com outros sistemas

modelos de tumores em animais (Barbacid, 1987) e outros resultados experimentais indicam que os genes *ras* podem ser ativados em estágios precoces do desenvolvimento do tumor (Balmain *et al.*, 1984; Bizub *et al.*, 1986; Kumar *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1992). Em estudos com humanos, mutações em *RAS* surgem com frequência crescente à medida que os tumores colorretais progridem, mas são observadas em adenomas em frequência significativa uma vez que as lesões excedam 1 cm, sugerindo que estas mutações representem um evento na progressão do tumor e não na iniciação (Vogelstein *et al.*, 1988).

1.3.3 - Gene *p53*: Um supressor de tumores

Os termos antioncogene e gene supressor de tumor são algumas vezes utilizados como sinônimo embora alguns pesquisadores usem-nos com sentido negativo ou positivo, respectivamente. Então, um antioncogene seria um gene cuja inativação, perda ou disfunção, leva a transformação celular ou conversão neoplásica, enquanto que um gene supressor de tumor seria aquele cuja ativação, expressão ou introdução, resulta em supressão ou inibição do fenótipo tumorigênico (Teich, 1997). Além disto, o termo oncogene recessivo foi usado como sinônimo de gene supressor de tumor (já que oncogenes têm um fenótipo dominante). Atualmente, o termo gene supressor de tumor é o termo preferido.

A existência dos genes supressores de tumor foi sugerida, em parte, por experimentos nos quais células híbridas criadas *in vitro* por fusão de um tipo celular tumorigênico com um tipo celular não tumorigênico, apresentavam freqüentemente características da célula mãe não tumorigênica. Além disto, em híbridos interespecíes (usualmente híbridos humanos x camundongos nos quais cromossomos humanos são seletivamente perdidos de maneira aleatória nas passagens das células em cultura), a retenção de certos cromossomos humanos era freqüentemente associado com um fenótipo morfológico normal, enquanto que a perda destes correlacionava-se com a morfologia neoplásica. Vários outros estudos de cânceres familiares forneceram evidências que sugeriam a existência de genes supressores de tumor, nos quais um modelo de herança recessiva requerendo um fenômeno de dois eventos parecia ser pertinente

(Teich, 1997). O primeiro gene supressor de tumor reconhecido em humanos foi o gene do retinoblastoma, um tumor maligno de retina que tem servido como exemplo para a predisposição genética ao câncer (Hethcote & Knudson, 1978).

Atualmente, dúzias de genes supressoras de tumor têm sido descritas. Mutações destes genes em células germinativas estão associadas com uma predisposição herdada a certos tipos de tumores, mas mutações somáticas em tumores são mais heterogêneas. Os genes supressores de tumor melhor caracterizados estão envolvidos em diversas funções que incluem a regulação do ciclo celular, repressão da transcrição, modulação da transdução de sinal e reparo de DNA. Os estudos com genes supressores de tumor demonstram que a perturbação da proliferação celular, da estabilidade genética e da morte celular podem ser parte de um padrão que precede a tumorigênese (Teich, 1997). Entre os genes supressores de tumor mais bem caracterizados está o gene *P53*.

O gene *P53* tem 20 Kb e está mapeado em 17p13.105-p12 no genoma humano. O gene contém 11 exons, o primeiro dos quais (213 bases) é uma região não codificadora e está separada por 6 a 10 Kb dos outros 10 exons. O mRNA totalmente processado tem 2.2-2.5 Kb em diferentes espécies e é expresso em todas as células do corpo (Levine, 1993). O gene *P53* foi originalmente descoberto quando uma proteína de 53 kDa foi encontrada em imunoprecipitados de células transformadas pelo vírus SV40, como parte de um complexo com o antígeno grande T do vírus. A proteína *P53* pode ser detectada em essencialmente todas as células normais embora esteja presente em níveis extremamente baixos e tem uma meia vida muito mais curta, de aproximadamente 30 minutos, comparada com a meia vida da proteína de células transformadas (Teich, 1997). Presumivelmente, diferenças de conformação na proteína mutante tornam esta menos susceptível a degradação, sugerindo que as proteínas virais estabilizam *P53* por formação de complexos.

A proteína *P53* é composta de 393 aminoácidos (53 kD) em humanos e é uma fosfoproteína nuclear (Levine, 1993). A região central da proteína contém o domínio de ligação ao DNA. A estrutura da proteína consiste de uma grande beta sanduíche com 3 alças e é composta de 2 folhas beta antiparalelas com 4 e 5 fitas beta, respectivamente. A primeira alça liga-se ao DNA na fenda maior e a segunda alça liga-se ao DNA na fenda menor. A função da terceira alça é a estabilização da segunda alça

(<http://www.bioscience.org/news/newindex.htm>). As seqüências de aminoácidos de p53 de *Xenopus*, roedores e humanos, compartilham homologia razoável ao redor de 50 – 60% (Soussi *et al.*, 1987). No entanto, identidades de seqüências bastante elevadas - de 90-100% - podem ser encontradas em várias regiões, entre os resíduos de aminoácidos 13-19, 117-142, 171-181, 236-258 e 270-286. A importância destas regiões de alta homologia é reforçada pela observação de que a maioria das mutações de ponto no gene p53 observada em carcinomas humanos (aproximadamente 85-90% dos casos) é encontrada nestas mesmas regiões de alta identidade (exceto para os resíduos 13-19 onde nenhuma mutação foi encontrada) (Hollstein *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991).

Mutações em *P53* são as mais comuns alterações genéticas observadas em cânceres humanos. A natureza ou o tipo de mutação observada depende do tecido de origem do tumor. Em carcinomas, na maior parte das vezes, (75-80%) são mutações que geram troca de aminoácido produzindo uma proteína anômala. O segundo alelo destas células é então perdido, reduzindo o alelo mutante a hemizigiosidade (Baker *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989). Em sarcomas, deleções, inserções e rearranjos gênicos são mais comuns e mutações de ponto são raras. Mutações em *p53* gerando troca de aminoácidos foram analisadas em 191 tumores e todas elas estavam localizadas entre os resíduos 120 e 290, sendo que a maioria das mutações foi encontrada na região de alta homologia de aminoácidos (Levine, 1993). Além disto, algumas mutações em códons específicos são selecionadas ou ocorrem muito freqüentemente (45-50% das vezes), sendo que estas são mapeadas nos códons 175, 248, 249, 273 e 282. Diferentes mutações tendem a ser resultado da exposição a uma determinada classe de agente mutagênico. Além do agente mutagênico, a seqüência de nucleotídeos interfere com o códon mutado. Em alguns casos, alterações de dinucleotídeos CpG para TpG são observadas e é bem estabelecido que resíduos C metilados (em duplas CpG) têm uma taxa de mutação maior dos que citosinas não metiladas (Levine, 1993).

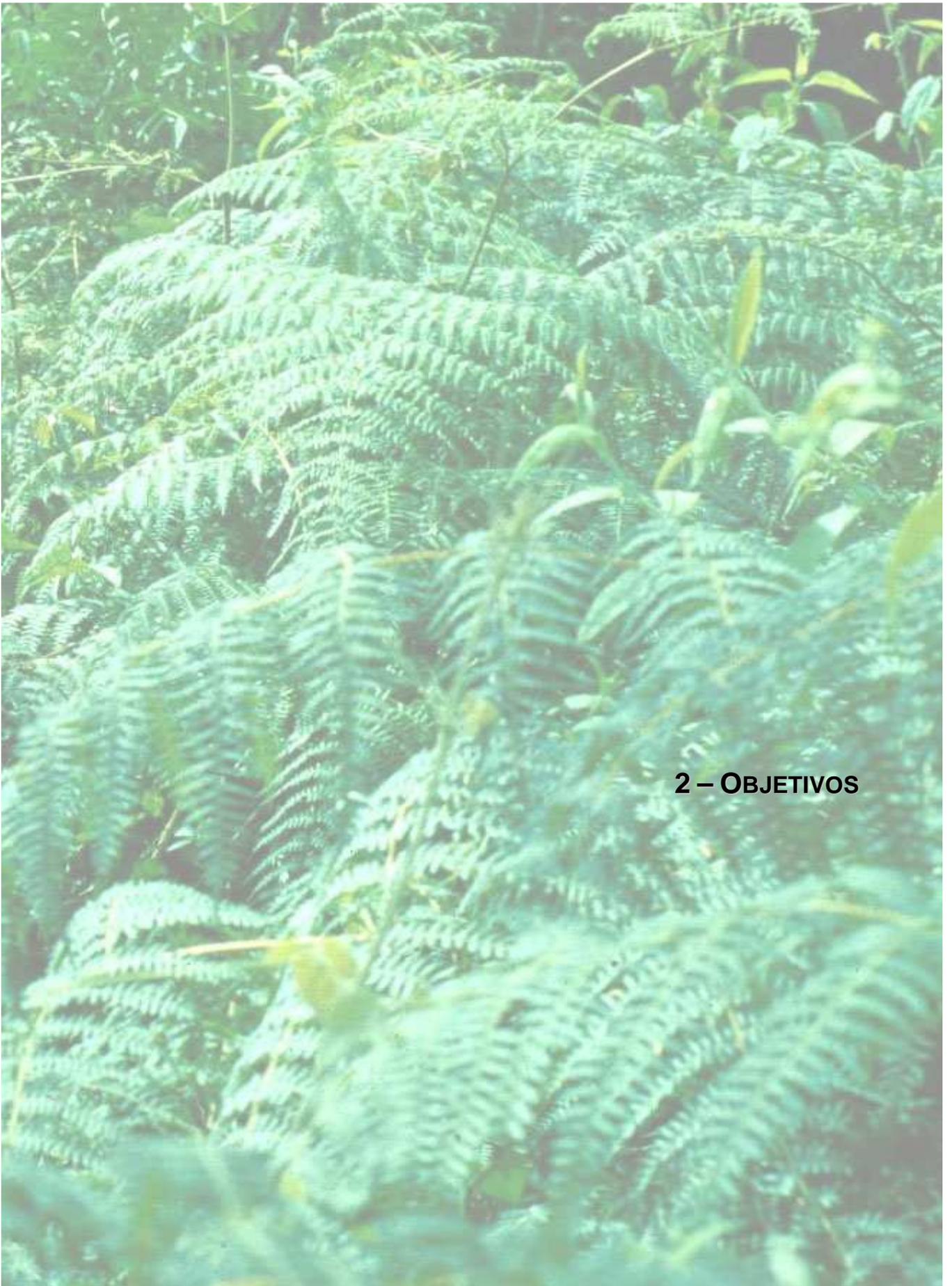
Enquanto as mutações somáticas em *P53* são encontradas em 50-60% dos cânceres humanos, mutações em células germinativas também são encontradas em algumas famílias. A Síndrome de Li-Fraumeni é caracterizada por uma família com um probando que apresenta um sarcoma de osso ou de tecido mole antes de 45 anos, apresenta um parente de primeiro grau com câncer diagnosticado antes dos 45 anos e apresenta um

outro parente de primeiro ou segundo grau na mesma linhagem com câncer antes dos 45 anos ou um sarcoma diagnosticado em qualquer idade (Li, 1988; Li *et al.*, 1988). Várias destas famílias apresentam mutações geradoras de troca de aminoácidos e mutações geradoras de código sem sentido em um dos alelos do gene *P53* nas células germinativas (Malkin *et al.*, 1990; Srivastava *et al.*, 1990).

A introdução de um alelo mutante de *p53* em camundongo transgênico produz um fenótipo similar. Em famílias de camundongos que expressam o gene mutante, 20% dos camundongos irá desenvolver câncer dos seis aos nove meses de vida (Lavigneur *et al.*, 1989). O intervalo de tempo para o desenvolvimento destes cânceres sugere a necessidade de eventos adicionais. Camundongos com o gene *p53* deletado apresentam desenvolvimento fetal normal, mas desenvolvem uma variedade de cânceres dentro de 3 a 6 meses de vida (Donehower *et al.*, 1992). Estes experimentos demonstraram que a proteína *p53* não é essencial para a vida, divisão celular ou processos do desenvolvimento. A proteína age como um ponto de controle do ciclo celular, sendo um regulador negativo paralisando o ciclo celular entre as fases G1 e S para permitir reparo antes que o processo de divisão prossiga. Além disto, *P53*, através de suas várias atividades bioquímicas e via sua habilidade de interagir com componentes do sistema de reparo e maquinaria de recombinação, participa ativamente de vários processos de reparo e recombinação de DNA (Albrechtsen *et al.*, 1999). Acredita-se que alterações na via de *P53* (mutações ou inativação epigenética) sejam em geral eventos precoces em cânceres de pulmão, esôfago, cabeça e pescoço, mama, cérvix e estômago; e geralmente, eventos tardios em cânceres de cérebro, tireóide, fígado e ovário (Greenblast *et al.*, 1994). Cânceres colorretais, da bexiga urinária, do fígado e talvez outros órgãos, podem desenvolver-se através de múltiplas vias; alterações de *P53* podem ser eventos precoces em alguns e eventos tardios em outros destes tipos de tumores.

Os modelos de mutação observados no gene *P53* e possivelmente em outros genes relacionados a câncer podem revelar agentes mutagênicos específicos em cânceres, confirmando ou não estudos epidemiológicos clássicos (Hartmann *et al.*, 1997). O gene *P53* é apropriado como um teste de “agente mutagênico” por várias razões: (1) as mutações freqüentemente ocorrem precocemente no processo neoplásico (Parenti *et al.*, 1995) e devem refletir exposição crônica a mutagênicos; (2) mutagênicos deixam

“impressões digitais” moleculares específicas (Vogelstein & Kinzler, 1992), que facilitam sua detecção; (3) mutações no gene *P53* ocorrem freqüentemente em quase todos os tipos de tumor (Greenblast, 1994), permitindo comparações de modelos de mutações em diferentes populações dentro e entre tipos de tumores; (4) uma grande variedade de mutações que geram troca de um aminoácido por outro e mutações nulas em *P53* são encontradas em cânceres; e (5) as regiões de provável significância funcional são de tamanho conveniente para proposta de “screening” de mutações.



2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral:

O objetivo do trabalho foi investigar a existência de marcadores moleculares da ação das toxinas da samambaia (*Pteridium aquilinum*) sobre o genoma de roedores, que pudessem ser utilizados como marcadores da ação carcinogênica da samambaia no homem.

2.2 - Objetivos Específicos:

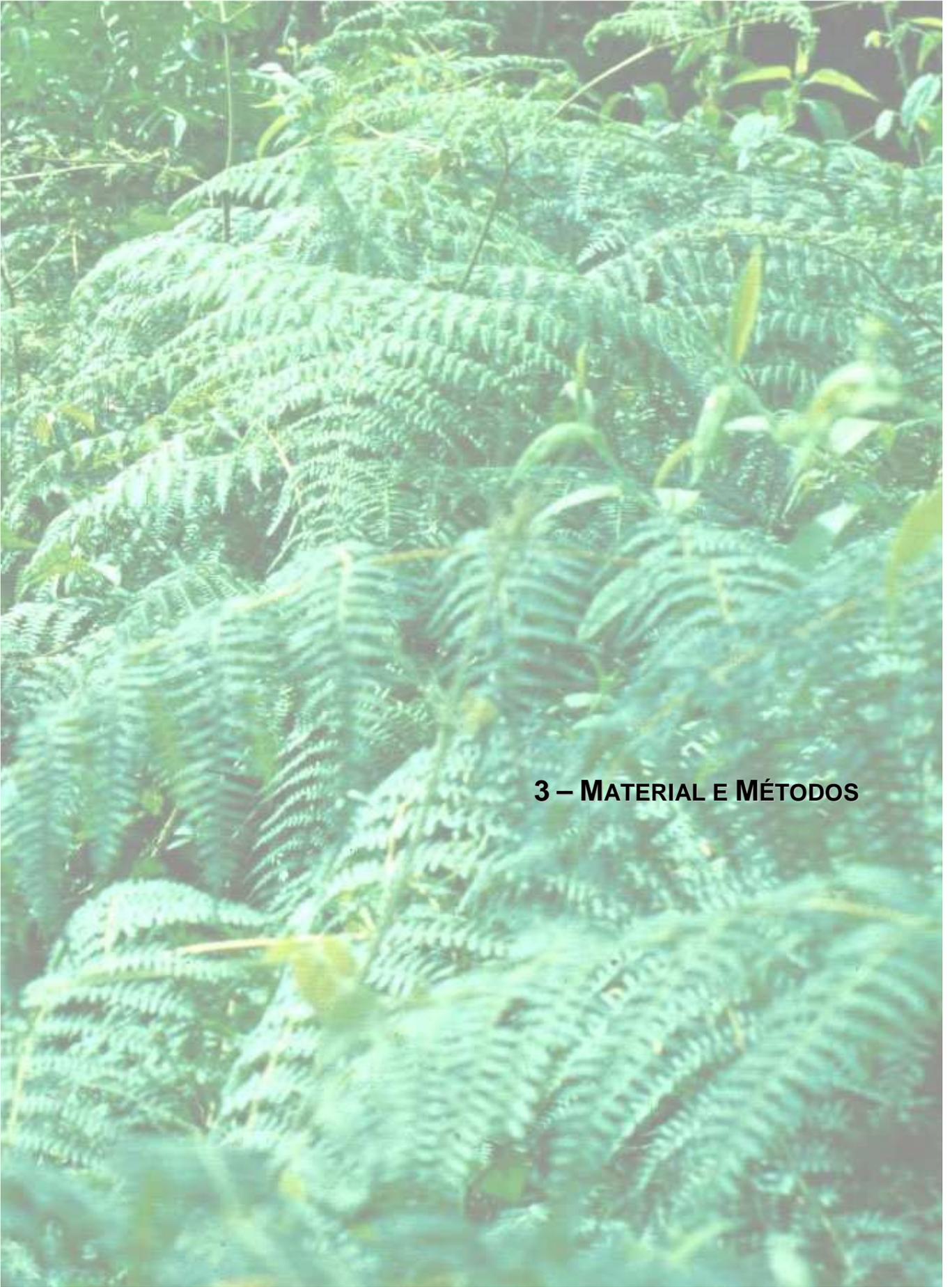
2.2.1 - Induzir a formação de tumores em ratos pelo tratamento crônico com diferentes preparações do broto de samambaia. -

2.2.2 - Estudar a formação de adutos de DNA em tecidos alvos de ratos e camundongos tratados com samambaia por diferentes períodos de tempo.

2.2.3 - Investigar a possível ocorrência de mutações em genes da família *ras* em adenocarcinomas de ratos tratados com samambaia.

2.2.4 - Investigar a possível ocorrência de mutações no gene *p53* em adenocarcinomas de ratos tratados com samambaia.

2.2.5 – Investigar a possível ocorrência de instabilidade de microssatélites em adenocarcinomas de ratos tratados com samambaia.

A photograph of a dense thicket of green ferns in a forest setting. The ferns are the dominant feature, with their intricate, feathery fronds filling most of the frame. The lighting is natural, highlighting the vibrant green of the leaves. In the lower right quadrant, the text "3 – MATERIAL E MÉTODOS" is overlaid in a bold, black, sans-serif font.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material:

3.1.1 - Reagentes para os experimentos de detecção de adutos:

Carvão ativado e óxido de alumínio ativado, Proteinase K, Ribonuclease A, Fosfatase alcalina, Nuclease P1 e deoxicorfomicina foram fornecidas pela Sigma (Poole, UK). Polinucleotídeo quinase T4 e ^{32}P - γ -ATP (atividade específica 6000 Ci/nmol) foram obtidos da New England Nuclear (Stevenage, UK). Nuclease micrococcal e fosfodiesterase de baço de bezerro foram compradas da Sigma e Boehringer-Mannheim (Alemanha) respectivamente ou da Worthington (Lorne Laboratories, Reading, UK). As placas de PEI-celulose obtidas da Macharey-Nagel foram fornecidas pela Sigma. Membrana de nitrocelulose para transferência, Protran®, foi comprada da Scheicher & Schuueell (Alemanha). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e os solventes de grau HPLC obtidos de diferentes laboratórios.

3.1.2 - DNA modificado para ensaio de pós-marcação com ^{32}P :

DNA de baço de bezerro modificado in vitro com ptaquilosídeo ativado:

DNA de baço de bezerro modificado *in vitro* com ptaquilosídeo ativado pela incubação com NaOH foi gentilmente cedido pelo Dr. A. S. Prakash da Universidade de Queensland, Austrália.

DNA de trato digestivo superior de camundongos tratados com samambaia (Pteridium aquilinum subsp. aquilinum):

Amostras de DNA obtidas de tratos digestivos superiores de camundongos BDF₁ tratados por administração intragástrica de esporos ou extrato de samambaia coletada em Benllech, Anglesey, País de Gales ou em um sítio perto da Universidade de York, Inglaterra, foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. C. Povey da Universidade de Manchester, Inglaterra.

3.1.3 - Preparação das soluções de enzimas:

Soluções de proteinase K, fosfatase alcalina, nuclease micrococcal (Worthington®) e fosfodiesterase de baço de bezerro (Worthington®):

As enzimas foram diluídas nas concentrações indicadas abaixo, em água deionizada autoclavada e armazenadas, em alíquotas, a – 20° C, exceto a fosfatase alcalina que foi armazenada a 4° C.

Proteinase K - 20 mg/ml

Fosfatase alcalina – 19 mU/ml

Nuclease micrococcal – 33U/μl

Fosfodiesterase de baço de bezerro – 8U/ml.

Soluções de nuclease micrococcal (Sigma®) e fosfodiesterase de baço de bezerro (Boehringer Mannheim®):

As soluções de enzimas foram dialisadas 3 vezes por 3 horas cada vez, a 4° C, contra água ultrapurificada (miliQ). Após a diálise, a concentração foi ajustada pela adição de água e as enzimas armazenadas em alíquotas a –20° C.

Nuclease micrococcal – 0,4U/μl

Fosfodiesterase de baço de bezerro – 2,5U/ml.

Solução de Nuclease P1:

Diluída a 3,27 μg/μl em acetato de sódio 10 mM e estocada em alíquotas a – 20° C.

Solução de Ribonuclease A:

Diluída a 10 mg/ml em Tris-HCl pH 7.5 e NaCl 15 mM. A solução foi aquecida a 100° C por 15 minutos, resfriada a temperatura ambiente e estocada em alíquotas a – 20° C.

3.1.4 - Tampões para extração de DNA:

Tampão de Extração de DNA: Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0.

Tampão de Lise 2X: Cloreto de amônia 2.5 M, bicarbonato de potássio 0.5 M, EDTA 0.5 M, pH 7.5.

Tampão de Lise de Núcleo: NaCl 7.5 mM, EDTA 24 mM, pH 7.5.

Tampão de digestão: Tris-HCl 10 mM, EDTA 40 mM, pH 8.0.

3.1.5 - Animais:

Foram utilizados ratos albinos Wistar do sexo feminino, com 45 a 100 dias de idade, obtidos do biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.1.6 - Samambaia:

Broto de samambaia *Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum* var. *arachnoideum* foi coletado em Santa Rita, distrito de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

3.2- Métodos:

3.2.1- Obtenção das preparações de broto de samambaia:

Broto de samambaia seco:

Broto de samambaia fresco colhido na véspera foi picado e seco em estufa a 60°C por 2 a 3 dias. A seguir foi moído em um moinho de pás até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi armazenado a -20° C.

Água de cocção do broto de samambaia:

Broto de samambaia fresco colhido na véspera foi finamente picado, colocado em panela e recoberto por água. A preparação foi cozida em fogo brando até ebulição que foi mantida por 10 minutos. A água foi coletada e o processo repetido com novo volume

de água por mais duas vezes. Ao final, a água coletada dos três processos de fervura foi juntada, resfriada e congelada.

Extrato de broto de samambaia seco:

O pó seco obtido de 3 Kg de broto de samambaia, como descrito acima, foi fervido com 4 litros de água por 10 minutos. A água foi coletada, rapidamente resfriada em banho de gelo e o procedimento foi repetido com novos volumes de água por mais duas vezes. A água obtida foi filtrada sob pressão negativa em filtro de papel número 1 em câmara fria. Ao volume total deste filtrado foram adicionados 330 g de carvão ativado e este foi submetido à agitação mecânica a 250 rpm por duas horas. A seguir, o carvão foi deixado sedimentar em câmara fria “overnight”. No dia seguinte, o carvão foi decantado, filtrado e fervido por 10 minutos em metanol. O metanol foi rapidamente resfriado, aplicado a uma coluna (8 x 3,5 cm) de óxido de alumínio ativado (100 g) e recuperado sob pressão negativa em câmara fria. Volumes de 500 a 800 ml de metanol foram evaporados de cada vez em evaporador rotatório (Rotavapor RE120 – BÜCHI) montado em banho mantido a 40° C sob vácuo, até a obtenção de uma goma que foi armazenada a -70° C até a reconstituição.

Extrato da água de cocção de broto de samambaia e de broto de samambaia cozido:

3,0 Kg de broto de samambaia colhido na véspera e armazenado a 4°C foi picado e fervido 3 vezes por 10 minutos com 4 litros de água por vez. A água foi coletada, rapidamente resfriada, filtrada e o extrato foi obtido de acordo com o protocolo acima descrito. O broto de samambaia cozido obtido neste procedimento foi grosseiramente triturado e fervido por 3 vezes por 10 minutos com 4 litros de água por vez e o extrato foi obtido e armazenado como os anteriores.

Reconstituição dos extratos obtidos do broto de samambaia:

Os resíduos correspondentes a cada preparação descrita acima foram descongelados à temperatura ambiente e reconstituídos para um volume final de 20 ml. Após reconstituição, os extratos foram divididos em alíquotas e mantidos a -20° C até o uso, que ocorreu no prazo máximo de uma semana após a reconstituição.

3.2.2- Tratamento, sacrifício e coleta de tecidos dos ratos:

Tratamento por longo prazo com broto de samambaia:

Ratos albinos do sexo feminino com 45 dias foram divididos em grupos que foram tratados por no mínimo 15 meses da seguinte forma:

Grupo 1: água de cocção de broto de samambaia como única fonte de água de beber e ração padrão *ad libitum*,

Grupo 2: ração padrão contendo 10% (p/p) de pó de broto de samambaia seco *ad libitum* e água *ad libitum* e

Grupo Controle: ração padrão e água *ad libitum*,

Ao final de 15 meses quatro animais de cada grupo experimental foram anestesiados sob atmosfera de éter, o sangue coletado em EDTA e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Após o sacrifício, fígado, íleo, estômago e bexiga foram coletados, limpos e lavados em solução salina gelada e examinados para a presença de lesões. Quando alguma lesão foi encontrada, parte do material foi colocada em formol para exame histológico e o restante, devidamente identificado, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido juntamente com os demais tecidos coletados. Os tecidos e o sangue foram armazenados a -70° C até a extração de DNA. Os outros animais dos grupos experimentais foram sacrificados a partir do 15^o mês quando começavam a apresentar sinais de deterioração da saúde como perda do controle esfinteriano, perda da coloração dos olhos ou hemorragias. Os animais foram sacrificados sob atmosfera de éter, necropsiados e examinados para identificação de lesões. As lesões detectadas eram seccionadas e parte foi colocada em formol para exame histológico e a outra parte colocada em etanol absoluto. Uma amostra de tecido normal próximo à região da lesão foi coletada da mesma maneira. As amostras de tecido coletadas em etanol foram armazenadas a -20° C até a extração de DNA. Após o sacrifício do último animal dos grupos experimentais, os animais do grupo controle foram sacrificados, examinados e os tecidos coletados da mesma maneira.

Tratamento por médio prazo com broto de samambaia:

Ratos albinos do sexo feminino com 45 dias foram divididos em 3 grupos de 12 animais cada. Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos com quatro animais cada, que foram tratados com ração padrão contendo 10% (p/p) de pó de broto de samambaia seco *ad*

libitum (subgrupo 1) ou com ração padrão e água de cocção do broto de samambaia como única fonte de água *ad libitum* (subgrupo 2) ou com ração padrão e água normal *ad libitum* (subgrupo controle). Cada grupo foi tratado por diferentes períodos de tempo: 3, 9 e 21 semanas.

Ao final de cada período experimental, os animais mantidos sob cada tratamento foram anestesiados sob atmosfera de éter e o sangue total colhido em EDTA e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Após o sacrifício, fígado, íleo, estômago e bexiga foram coletados, limpos e lavados em solução salina gelada e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos e o sangue foram armazenados a -70°C até a extração de DNA.

Tratamento com dose aguda de extratos de broto de samambaia:

Ratos albinos adultos (aproximadamente 15 semanas) do sexo feminino foram divididos em grupos de 16 animais cada aos quais foi administrado intragastricamente 1 ml de cada extrato alcoólico obtido de: broto de samambaia seco (grupo 1), de broto de samambaia cozido (grupo 2), da água de cocção de broto de samambaia (grupo 3) ou água destilada (grupo controle). Após a administração, quatro animais de cada grupo foram anestesiados sob atmosfera de éter e sangue e tecidos coletados e armazenados como descrito acima, em cada um dos seguintes tempos: 5 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias.

3.2.3- Estudos de adutos de DNA:

3.2.3.a - Extração de DNA de tecidos:

Os tecidos congelados dos animais de cada grupo foram juntados para a extração de DNA. Estes foram macerados na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino que foi armazenado a -70°C . O pó congelado foi utilizado para a extração de DNA e a quantidade de tecido utilizada para cada procedimento de extração variava de acordo com o tecido, mas as proporções de tampão e enzimas descritas a seguir eram mantidas. 300 mg deste pó congelado eram transferidos para tubo contendo 3 ml de

tampão de digestão ao qual eram adicionados 30 µl de solução de RNase A (10 mg/ml). Os tubos foram incubados a 37° C por 60 minutos, após o que foram adicionados 60 µl de solução de Proteinase K (10 mg/ml), seguindo-se incubação “overnight” a 37° C. No dia seguinte foram adicionados 3 ml de fenol saturado com Tris e os tubos foram agitados suavemente por inversão por 10 minutos, seguindo centrifugação a 7000 x g em temperatura ambiente por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa juntamente com a interface foi transferida para novo tubo e a extração com fenol foi repetida por mais duas vezes. Ao final, a fase aquosa foi transferida para novo tubo, evitando-se a interface, ao qual foram adicionados 3 ml de clorofórmio seguindo-se agitação suave por inversão por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados como anteriormente e a fase aquosa transferida para novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto seguida de agitação suave. O DNA foi transferido para microtubo novo com a ajuda de pipeta “Pasteur” com a ponta fechada e lavado seriadamente com 100 µl de: etanol 70% por duas vezes, etanol absoluto, etanol absoluto:éter dietílico (1:1) e éter dietílico. Após evaporação do éter, o DNA foi ressuspenso em 200 a 500 µl de água deionizada estéril e mantido em banho maria a 37°C por 1 hora, após o que foi armazenado a -20° C. Após a dosagem, o DNA foi seco sob vácuo e armazenado a -70° C.

3.2.3.b - Diluição e quantificação das amostras de DNA:

As amostras de DNA secas e mantidas a - 70° C foram diluídas em água deionizada e deixadas sob agitação por inversão “overnight” a 4 ° C. A concentração de DNA das amostras foi calculada usando a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV 160), da emissão de luz a 260 nm, de 20 a 50 µl de cada amostra, considerando-se 1 A₂₆₀ igual a 50 µg de DNA de fita dupla.

3.2.3.c - Pós-marcação com ³²P:

Dois diferentes protocolos foram utilizados para o enriquecimento dos adutos nas amostras. Em cada um destes protocolos, nuclease micrococcal e fosfodiesterase de baço de bezerro de diferentes fontes comerciais foram utilizadas para a digestão inicial

do DNA. Assim, quando a extração com butanol foi empregada para o enriquecimento dos adutos, o DNA foi inicialmente digerido com nuclease e fosfodiesterase fornecidas pela Worthington e quando os adutos foram enriquecidos pela digestão com nuclease P1, o DNA foi inicialmente digerido com nuclease fornecida pela Sigma e fosfodiesterase fornecida pela Boehringer- Mannheim.

Digestão das amostras de DNA a nucleotídeos com nuclease e fosfodiesterase Worthington®:

10 a 25 µg de cada amostra de DNA foram digeridas por 4 horas a 37° C na presença de 0.43 mU/µg DNA de fosfodiesterase de baço de bezerro, 0.50 U/µg DNA de nuclease micrococal, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5 mM de CaCl₂ e 1µM de deoxicorfomicina em um volume final de 2.5 µl/µg DNA. Alíquotas de 10 µl deste DNA digerido foram armazenadas a -80° C.

Digestão das amostras de DNA a nucleotídeos com nuclease da Sigma® e fosfodiesterase da Boehringer- Mannheim®:

10 a 25 µg de DNA foram evaporados a vácuo (Gyro Vap - Howe) e foram a seguir digeridos por 4 horas a 37° C na presença de 57 mU/µg DNA de nuclease micrococal (Sigma®), 0.95 mU/µg DNA de fosfodiesterase de baço de bezerro (Boehringer®), succinato de sódio 20 mM pH 6 e cloreto de cálcio 5 mM, em um volume final de 0,95 µl/µg DNA. Alíquotas de 7.5 µl foram armazenadas a - 80° C.

Quantificação dos nucleotídeos normais:

Para determinar o nível dos nucleotídeos normais liberados nas reações de digestão acima, alíquotas contendo de 10 a 13 µg do produto da primeira digestão, foram tratadas com 38 mU de fosfatase alcalina com adição de água para um volume final de 50 µl. A mistura foi incubada a 37° C por 4 horas ou "overnight". Após a incubação, foram adicionados 600 µl de água. 500 µl de cada amostra, contendo agora os nucleosídeos referentes aos nucleotídeos produzidos na primeira digestão, foram injetados em um sistema de HPLC (Gilson) com uma coluna de fase reversa "Aminex". A coluna foi eluída com 10 mM de bicarbonato de amônia com fluxo a 0.75 ml/min. A emissão de luz a 254 nm foi detectada, registrada e a concentração dos nucleosídeos determinada. Antes da aplicação das amostras, a coluna foi testada injetando-se 50 µl de solução contendo cada um dos quatro nucleosídeos em uma concentração de 200

nmoles/ml, diluída 20 vezes no tampão de eluição. A eficiência da digestão e pureza de cada amostra foi verificada pela eluição de quatro picos correspondentes aos quatro nucleosídeos, com uma relação da concentração de deoxiadenosina : deoxiguanosina de aproximadamente 1.4. Amostras bem digeridas e com menos que 10 % de contaminação com RNA foram utilizadas para o procedimento de extração dos adutos com butanol ou para digestão com nuclease P1.

Extração dos adutos com n-1-butanol:

Adutos aromáticos foram extraídos a partir de alíquotas (10 µl) contendo 4 µg do digerido inicial, com butanol, na presença de um agente transferidor de fases, o cloreto de tetrabutyl amônio (TBA). Em alguns experimentos, a digestão inicial e a extração foram feitas no mesmo dia e em outros o digerido inicial foi mantido a – 80° C por alguns dias antes da extração. A cada alíquota de 10 µl foram adicionados 190 µl de água e a seguir 25 µl de TBA 10 mM e 25 µl de formato de amônia 100 mM pH 3,5. A mistura foi extraída duas vezes com 1 volume de 1-butanol saturado com água. As extrações foram convenientemente feitas em microtubos de 1.5 ml, agitando-se as amostras por 30 segundos em vórtex. As fases foram separadas por centrifugação (2 minutos a 12000 x g). As fases orgânicas combinadas (da primeira e da segunda extrações) foram extraídas reversamente por três vezes, com 450 µl de água saturada com butanol, cada vez, para remoção dos nucleotídeos normais contaminantes. O extrato final foi neutralizado com 2 µl de Tris-HCl 0.25 mM pH 9.5 e evaporado a vácuo (Gyro Vap - Howe). Cada amostra foi diluída em 50 µl de água, novamente evaporada e armazenada a – 20° C, por não mais que dois dias, até a reação de marcação com ³²P.

Enriquecimento dos adutos pela digestão dos nucleotídeos com Nuclease P1:

Às alíquotas de 7,5µl (~8µg) do DNA digerido inicialmente com enzimas nuclease micrococal (Sigma®) e (Boehringer- Mannheim®) foram adicionados 3 µl de uma mistura de reação contendo acetato de sódio 40 mM pH 5, cloreto de zinco 0.2 mM e nucleai P1 0.31 µg/µl. Os tubos foram incubados a 37° C por 30 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 1 µl de Tris 0.92 mM e a seguir as amostras foram evaporadas a vácuo.

Reação de marcação dos adutos com ³²P:

Às amostras extraídas com butanol ou digeridas com Nuclease P1 e secas, foram adicionados 10 µl de uma mistura de reação contendo: Tris-HCl 30 mM pH 9.5, MgCl₂ 10 mM, ditioneitol 10 mM, espermidina 1mM, ATP em concentração final de 3.0 µM (40 µCi de ³²P-γ-ATP) e 2.5 U de polinucleotídeo quinase T₄. Os tubos foram incubados a 37° C por 30 minutos. Alternativamente, os adutos foram marcados na presença de 166µCi de ³²P-γ-ATP de alta atividade específica (7000 Ci/mmol), mantidas as outras condições da reação.

Resolução dos adutos por cromatografia de camada fina:

5 µl de cada amostra contendo os adutos marcados foram aplicados continuamente, mas lentamente, nos pontos de origem de uma placa de cromatografia de camada fina, trocadora de íons, de polietilamina celulose (PEI - celulose) medindo 20 x 20 cm. Duas amostras foram aplicadas na mesma placa, no ponto de origem (x), de acordo com o esquema apresentado na figura 6. À parte superior de cada placa, foi afixada, com o uso de grampeador, uma tira de papel para cromatografia, Whatman 3 MM, medindo 5 x 20 cm. O cromatograma foi desenvolvido “overnight” na direção ascendente (D1) em tampão fosfato 1 M pH 6.5. Nestas condições de alta concentração de sal, nucleotídeos residuais normais, [³²P-γ]ATP não utilizado e outros contaminantes, foram removidos; enquanto que os adutos aromáticos, sendo lipofílicos, permaneciam na origem ou próximos a esta. Posteriormente estes foram resolvidos em solventes com alta concentração de sal e uréia. O desenvolvimento foi feito em tanques de vidro tampados. Após o final do desenvolvimento na D1, cada placa foi cortada nas linhas ‘ab’ usando tesoura longa e a parte superior do cromatograma, juntamente com a tira de papel Whatman, contendo a maior parte da radioatividade, foi apropriadamente descartada. Para remover o sal, cada cromatograma foi lavado duas vezes em 500 ml de água destilada por 15 minutos cada lavagem. As placas foram então secas em corrente de ar morno por 10 a 15 minutos, usando um secador de cabelos comercial convenientemente montado em uma capela. Para a resolução dos adutos, cada cromatograma foi então cortado com tesoura na linha ‘cd’ e desenvolvido em formato de lítio 3.5 M - uréia 8.5 M pH 3.5, “overnight”, na direção D3 e em cloreto de lítio 1.2 M - Tris 0.5 M - uréia 8.5 M pH 8.0, na direção D4, por 2 horas (Figura 6 A). Antes do desenvolvimento nos solventes contendo uréia, cada cromatograma foi brevemente desenvolvido até a origem, em água destilada, para permitir uma migração uniforme dos

solventes. Após o desenvolvimento em cada direção, D3 e D4, os cromatogramas foram lavados duas vezes em água destilada por 15 minutos e secos em corrente de ar

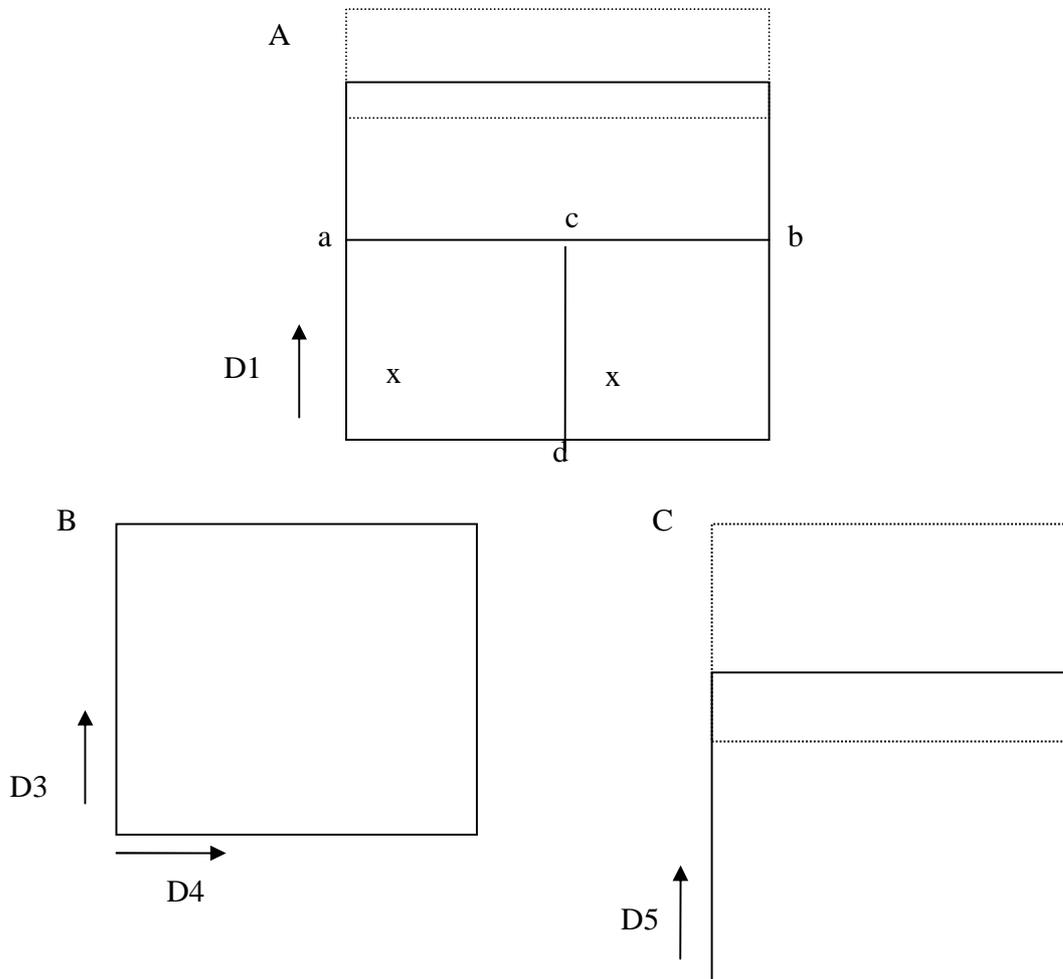


Figura 6 - Esquema da cromatografia de camada fina bidirecional para separação de adutos de DNA aromáticos. Cada placa de PEI celulose medindo 20 x 20 cm era usada para a aplicação de duas amostras simultaneamente no ponto X (A). As placas, atadas a uma tira de papel de filtro, eram desenvolvidas inicialmente na direção D1. Em seguida, eram cortadas nas linhas 'ab' e 'cd' e eram desenvolvidas nas direções D3 e D4 (B) e finalmente, após serem novamente atadas a uma tira de papel de filtro eram desenvolvidas na direção D5 (C). Os tampões e os tempos de corrida estão descritos em Métodos.

morno. Os cromatogramas foram finalmente desenvolvidos na direção D5, “overnight”, em fosfato de sódio 1 M pH 6.5, com uma tira de papel para cromatografia Whatman 3 MM, medindo 9 x 10 cm, fixada à parte superior do cromatograma (figura 6 B). Após a remoção da tira de papel, as placas foram novamente lavadas e secas como anteriormente. As placas foram então embrulhadas em filme plástico e expostas, em um cassete, a uma tela armazenadora de imagens de fósforo (“Storage Phosphor Screen - Molecular Dynamics”) por diferentes períodos de tempo, à temperatura ambiente. Antes e após cada uso, cada tela foi exposta a uma luz visível brilhante, usando-se para isto o “Image Eraser” modelo 410A da “Molecular Dynamics”, para apagar imagens remanescentes e possível “background” causado por radiação cósmica e ambiental. Após o tempo de exposição, a imagem armazenada na placa foi visualizada com o uso do “Phosphoimager Storm 860” da “Molecular Dynamics” a 176 μm e a imagem registrada foi digitalizada e armazenada em computador.

Quantificação dos adutos:

A resolução da imagem e quantificação dos volumes foi realizada com o uso do programa Image QuaNT™ versão 4.1 (Molecular Dynamics). A determinação do “background” foi feita pelo cálculo da média de todos os valores “pixel” ao redor do objeto. Na ausência de um padrão interno, os adutos foram quantificados comparando-se o sinal deste com aquele de uma curva padrão de ^{32}P . A curva padrão foi feita aplicando-se em triplicata, em placa de TLC de PEI-celulose, 1 μl de diluições seriadas (10^2 a 10^4 vezes) da mistura utilizada na reação de marcação. Esta placa, com a curva padrão e os cromatogramas com as amostras, foram expostos juntos, no mesmo cassete, por até 48 horas. Alíquotas de 1 μl das mesmas diluições usadas para a curva padrão foram transferidas para “vials” plásticos e a radioatividade foi quantificada pelo método de Cerenkov (sem adição de fluido de cintilação) em cintilador (Minaxi, Packard). A quantidade de adutos detectada foi então quantificada determinando-se a relação, sinal do aduto/ sinal do ^{32}P , assumindo-se que os adutos foram marcados quantitativamente. Os níveis de adutos foram expressos como pmoles de adutos detectados por nmol de deoxiguanosina liberada (como determinado por HPLC).

Controles negativo e positivo para os experimentos de pós-marcação com ^{32}P :

Em todos os experimentos realizados uma amostra de DNA de baço de bezerro obtida comercialmente foi incluída desde a digestão inicial como controle negativo. Como

controle positivo para o ensaio, foram incluídas em todos os experimentos, desde a digestão inicial, amostras de DNA obtidas dos tratos digestivos superiores de camundongos tratados com dose aguda intragástrica de esporos ou extratos de samambaia coletada no Reino Unido. Estas amostras haviam sido analisadas anteriormente por Povey e colegas (Povey *et al.*, 1996) pelo método de pós-marcação com ^{32}P , que detectaram três adutos principais que não estavam presentes nas amostras dos animais do grupo controle.

3.2.4- Extração de DNA de tecidos normais e tumorais para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR):

Os tecido foram retirados do etanol e finamente picados com a ajuda de bisturi estéril. Os tumores haviam sido anteriormente microdissecados com a ajuda das lâminas obtidas do exame histológico, de maneira a conterem no mínimo 80% de células neoplásicas. Aproximadamente 50 mg de tecido foram transferidos para microtubo ao qual foram adicionados 500 μl de tampão de lavagem. O tubo foi agitado e a seguir centrifugado a 12000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 500 μl de tampão de digestão e proteinase K (20mg/ml) para uma concentração final de 0.5 mg/ml. O tubo foi agitado brevemente em vórtex e incubado em banho maria a 55° C "overnight". Após a incubação, 500 μl de fenol saturado com Tris foram adicionados ao tubo que foi mantido em agitação lenta por inversão por 10 minutos, sendo centrifugado a seguir a 12000 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, cuidadosamente, evitando-se a interface e a seguir foram adicionados 500 μl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). O tubo foi mantido em agitação lenta por inversão por 10 minutos sendo centrifugado a seguir a 12000 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, evitando-se a interface e 500 μl de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) foram adicionados. Nova etapa de agitação e centrifugação, como já descrita anteriormente, foi executada e ao sobrenadante, transferido para novo tubo, foram adicionados igual volume de álcool isopropílico e acetato de amônia para concentração final de 200 μM . O tubo foi mantido "overnight" a -20° C para precipitação do DNA. A seguir, o tubo foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 100 μl de etanol a 70% e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado

deixado secar ao ar ou em estufa a 37° C. A seguir o DNA foi ressuspendido em 50 a 100 µl de TE ou água deionizada estéril e armazenado a -20° C.

3.2.5- Quantificação das amostras de DNA em gel de agarose:

As amostras de DNA foram descongeladas e mantidas em banho maria a 37° C por no mínimo 30 minutos. Um volume de 10 µl contendo de 0.5 a 1 µl da amostra de DNA em tampão de amostra foi aplicado em gel de agarose a 1% em TAE 0.5X. Em canaletas consecutivas, foram aplicados padrões de DNA genômico em concentrações conhecidas. Após eletroforese a 80 volts por 30 minutos, o gel foi transferido para solução contendo brometo de etídeo (5 µg/ml) e mantido em agitação por 45 minutos após o que foi transferido para água deionizada e agitado por 30 minutos. O gel foi então colocado sobre transiluminador ultravioleta e fotografado. A concentração de DNA de cada amostra foi determinada por comparação da banda referente a esta com aquelas referentes aos padrões.

3.2.6- Polimorfismo Conformacional de Fita Simples de fragmentos amplificados por PCR (SSCP-PCR) dos exons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *p53*:

Os exons 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *p53* eram amplificados separadamente a partir de DNA extraído de tecidos normais e tumorais de ratos tratados por longo tempo com água de cocção do broto de samambaia ou pó de broto de samambaia seco a 10% (p/p) na dieta. A seqüência dos iniciadores, as temperaturas de anelamento utilizadas e o tamanho dos fragmentos amplificados são dados na tabela I. Os iniciadores para os exons 5 a 8 foram sintetizados pela Operon de acordo com Vancutsem e colaboradores (Vancutsem *et al.*, 1994), enquanto que os iniciadores internos e aqueles para o exon 9 foram desenhados baseado nas seqüências depositadas no banco de dados "GeneBank".

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores PT-100 da MJ Research. As reações ocorreram em um volume final de 30 µl em tampão Tris-HCl 20 mM pH 9.2 (exons

Tabela I: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos correspondentes aos exons 5 a 9 do gene p53 amplificados de tumores e tecido normal de ratos tratados com broto de samambaia:

Exons	Iniciadores	Temperatura Anelamento (° C)	Tamanho do Fragmento (pb)
5	Direto: GACCTTTGATTCTTTCTCCTCTCC Reverso: GGGAGACCCTGGACAACCAG	63° C	264
6	Direto: CTGGTTGTCCAGGGTTCTCC Reverso: CCCAACCTGGCACACAGCTT	60° C	294
7 e 8	Direto: CTTACTGCCTTGTGCTGTGC Reverso1: CTTAAGGGTGAAATATTCTCC Reverso 2: TAATCCAATAATAACCTTGG	56° C	328 351
9	Direto: TCTGTCCTACTTCATCCTTG Reverso: AGGTCACCTCACCTGGAGTGA	60° C	144

7,8 e 9) ou pH 8.8 (exons 5 e 6), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dinucleotídeos trifosfatados 0.25 mM e 25 pmoles ou 37.5 pmoles (exon 9) dos iniciadores conforme tabela I e 1.5 unidades de uma mistura de *Taq* DNA polimerase (PhN) : DNA polimerase *Pfu* (Stratagene) na proporção de 15:1. A DNA polimerase *Pfu* foi utilizada na proporção acima em todas as reações de amplificação para seqüenciamento, uma vez que possui uma atividade de “proofreading” não apresentada pela *Taq* DNA polimerase, importante para se evitar erros no seqüenciamento devido à incorporação inadequada de nucleotídeos. A mistura de reação de amplificação foi coberta com 20 µl de óleo mineral e seguindo-se uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, foi submetida a 35 ciclos de 1 minuto na respectiva temperatura de anelamento de cada par de iniciadores, 1 minuto a 72° C para extensão e 1 minuto a 95° C para desnaturação com 8 minutos a 72° C para extensão final. As condições de cada reação foram otimizadas com o uso do kit Optiprimer (Stratagene). Em cada experimento, amostras de tumor e do respectivo tecido normal foram amplificadas simultaneamente.

Após a amplificação, 2 a 5 µl do produto foram desnaturados pela adição de 10 µl de solução formamida a 95% e colocadas em ebulição por 5 minutos sendo a seguir imediatamente transferidas para gelo. As amostras de tumor e tecido normal foram aplicadas em canaletas consecutivas de um gel de poliacrilamida a 12% (exon 9) e 10% (exons 5, 6, 7 e 8) com uma relação de acrilamida:bisacrilamida de 24:1 contendo glicerol 10%. A eletroforese foi realizada a força constante de 14 W por 8 horas a temperatura ambiente. Alternativamente, a eletroforese foi realizada na ausência de glicerol com força constante de 16 W por 4 horas a 4° C. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 0.5%) e as bandas visualizadas por revelação com nitrato de prata.

Algumas amostras amplificadas para os exons 5, 6 e 7-8, foram reamplificadas utilizando pares de iniciadores internos, ao qual foi adicionado uma cauda com seqüência para anelamento do iniciador de M13. Estas amostras foram utilizadas para seqüenciamento direto dos produtos de PCR para confirmação dos resultados obtidos com SSCP-PCR. Para o seqüenciamento direto dos produtos de PCR dos exons 7 e 8, um novo iniciador reverso (reverso 2) para a primeira amplificação foi desenhado de acordo com a seqüência depositada no "GeneBank", uma vez que o iniciador utilizado para o SSCP-PCR não permitia a utilização de um iniciador mais interno que amplificasse todo o exon. Assim, estes exons foram amplificados primeiramente com os

iniciadores direto e reverso 2 mostrados na Tabela I. Para o exon 9, não sendo possível desenhar um par de iniciadores internos que permitissem o seqüenciamento de todo o exon, os fragmentos amplificados foram clonados em bactérias competentes e seqüenciados como descrito abaixo.

3.2.7- Seqüenciamento direto de produtos de PCR do gene *p53*:

Os exons 5, 6, 7 e 8 do gene *p53* amplificados das amostras de DNA de adenocarcinomas de íleo e bexiga, algumas das quais foram analisadas por SSCP-PCR, foram seqüenciados diretamente a partir de produtos de PCR. Iniciadores internos aos iniciadores utilizados no ensaio de SSCP foram desenhados para cada fragmento.

À extremidade 3' de cada iniciador, direto e reverso, foi adicionada uma seqüência de 17 pares de bases correspondente a uma seqüência da fita direta e reversa, respectivamente, de M13. Cada amostra foi inicialmente amplificada nas condições descritas para SSCP e a seguir reamplificada com os iniciadores internos. A reação de reamplificação foi realizada em um volume final de 50 µl utilizando 2 µl do produto da primeira PCR, por 35 ciclos, sendo as outras condições idênticas a da primeira PCR. As temperaturas de anelamento, iniciadores e tamanhos dos fragmentos obtidos estão descritos na tabela II.

Após a reamplificação, cada fragmento foi purificado com o uso do kit "Wizard PCR prep" (Promega) de acordo com instruções do fabricante. O fragmento purificado foi submetido a uma reação de seqüenciamento, pelo método de Sanger, 1977, utilizando kit "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle" da Pharmacia, em um volume final de 8 a 10 µl, utilizando iniciadores fluorescentes de M13, direto ou reverso (1 pmol/reação), de acordo com instruções do fabricante, com 5 µl (~ 300 ng) do fragmento purificado para cada tubo de reação. Após desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, a reação de seqüenciamento foi realizada por 35 ciclos com 36 segundos a 55 °C (para o iniciador direto) ou 50 °C (para o iniciador reverso), 1 minuto e 24 segundos a 72 °C e 1 minuto a 95 °C, seguidos por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Ao fim da reação de seqüenciamento, 4 µl de solução desnaturante (formamida 95%) foram adicionados a cada tubo. Os produtos do seqüenciamento foram resolvidos em gel de

poliacrilamida 6%, contendo uréia 8 M, em um seqüenciador automático "ALF" (Automated Laser Fluorescence DNA Sequencer) da

Tabela II: Iniciadores internos, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos correspondentes aos exons 5 a 8 do gene p53 utilizados na segunda amplificação para o seqüenciamento direto de produtos de PCR:

Exo n	Iniciadores	Temp. Anelamento (°C)	Tamanho Fragmento (pb)
5	Direto: GTAAAACGACGGCCAGTATTCTTTCTCCTCTCCTACAG Reverso: CAGGAAACAGCTATGACAGTTCTAACCCACAGCAGTG	63	238
6	Direto: GTAAAACGACGGCCAGTCCCGGCCTCTGACTTATTCTT Reverso: CAGGAAACAGCTATGACCCTGGCACACAGCTTCTAC	65	272
7 e 8	Direto: GTAAAACGACGGCCAGTGTGCTGTGCCTCCTCTTGT Reverso: CAGGAAACAGCTATGACATCCAATAATAACCTTGGTAC	60	338

Pharmacia-Biotech. Os resultados obtidos foram armazenados na forma de histogramas e analisados posteriormente.

3.2.8 - Seqüenciamento direto de produtos de PCR do gene *K-ras*:

As regiões contendo os códons 4 a 20 (exon 1) e os códons 52 a 76 (exon 2) do gene *K-ras* foram amplificadas de 8 amostras de tumores malignos (7 adenocarcinomas de íleo e 1 carcinoma de bexiga) inicialmente com os iniciadores direto e reverso apresentados na tabela III. As reações ocorreram em um volume final de 10 µl, na presença de 20 a 25 pmoles de cada iniciador e 25 mM de solução de dNTP's em tampão contendo MgCl₂ 1.5mM, KCl 50 mM, triton X-100 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 8.4 e 1.5 unidades de uma mistura de *Taq* DNA polimerase (PhN) : DNA polimerase *Pfu* (Stratagene) na proporção de 15:1. A mistura foi coberta com 20 µl de óleo mineral e, seguindo-se uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, foi submetida a 35 ciclos de 1 minuto na respectiva temperatura de anelamento de cada par de iniciadores, 1 minuto a 72° C para extensão e 1 minuto a 95° C para desnaturação com 8 minutos a 72° C para extensão final. A seguir, os produtos desta primeira PCR foram reamplificados utilizando um dos iniciadores usados anteriormente e um segundo iniciador, mais interno, contendo em sua extremidade 3', uma seqüência para anelamento do iniciador reverso de M13 (Tabela III). Esta segunda amplificação foi realizada basicamente como a primeira, porém em volume final de 50 µl. Os produtos desta segunda PCR foram purificados utilizando-se o kit "Wizard PCR prep" (Promega) de acordo com instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada como descrito no item 3.2.7.

3.2.9 – Amplificação do gene *H-ras* para clonagem:

Regiões compreendendo os códons 1 a 30 (exon 1) e 51 a 70 (exon 2) do gene *H-ras* de amostras de 7 adenocarcinomas de íleo, 1 carcinoma de bexiga urinária e 1

fragmento de mucosa de íleo normal pareada com uma das amostras de adenocarcinomas, foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores apresentados

Tabela III – Iniciadores, tamanho dos fragmentos e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação dos exons 1 e 2 dos genes *K* e *H-ras* de amostras de tumor e tecido normal de ratos tratados com broto de samambaia.

Gene	Região	Iniciadores	Tamanho (pb)	Tm (°C)
<i>K-ras</i>	Exon 1	Direto: GCCTGCTGAAAATGACTGAG Reverso: CGTAGGATCATATTCATCCA	116	57
		Direto M13: GTAAAACGACGGCCAGTGCCTGCTGAAAATGACTGAG	133	60
		Reverso M13: CAGGAAACAGCTATGACAGTGATTCTGAATTAGCTGT	110	
	Exon 2	Direto: GACTCCTACAGGAAACA Reverso: GGCAAATACACAAAGAAAGC	138	60
		Direto M13: GTAAAACGACGGCCAGTGACTCCTACAGGAAACA	155	57
		Reverso M13: CAGGAAACAGCTATGACGTAATTCATGGAGAAACCTG	134	
<i>H-ras</i>	Exon 1	Direto: GTTTGGCAACCCCTGTAGAA Reverso: CTATAGTGGGATCATACTCG	132	57
	Exon 2	Direto: AGGTAGTCATTGATGGGGAG Reverso: GGACTTGGTGTGTTGATGG	140	57

na tabela III. As reações ocorreram em um volume final de 20 μ l, na presença de 20 a 25 pmoles de cada iniciador e 25 mM de solução de dNTP's em tampão contendo $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 50 mM, triton X-100 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 8.4 e 1.5 unidades de uma mistura de *Taq* DNA polimerase (PhN) : DNA polimerase *Pfu* (Stratagene) na proporção de 15:1. A mistura foi coberta com 20 μ l de óleo mineral e, seguindo-se uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, foi submetida a 35 ciclos de 1 minuto na respectiva temperatura de anelamento de cada par de iniciadores, 1 minuto a 72° C para extensão e 1 minuto a 95° C para desnaturação com 8 minutos a 72° C para extensão final.

3.2.10 - Clonagem de produtos de PCR para seqüenciamento:

Ligação de produtos de PCR ao plasmídio pUC 18:

Os fragmentos correspondentes ao exon 9 do gene p53 amplificados para SSCP e aos exons 1 e 2 do gene *H-ras* amplificados como descrito anteriormente, foram purificados utilizando-se o kit "Wizard PCR prep" (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos purificados foram então ligados ao vetor pUC 18 utilizando o kit "Sure Clone" da Pharmacia ou o kit "pGEMT Easy" da Promega, de acordo com instruções dos fabricantes. O produto desta ligação foi armazenado a -20° C e utilizado para a transformação de bactérias competentes.

Transformação de bactérias competentes com os produtos de ligação:

Os produtos da ligação, obtidos na etapa anterior, foram utilizados para transformar bactérias hospedeiras *E. coli* DH5 α de acordo com os procedimentos descritos por Cohen e colaboradores (1972). Uma alíquota de 100 μ l de *E. coli* DH5 α tornada competente por tratamento prévio com cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989) foi incubada por 30 minutos, em banho de gelo, com 1 a 2 μ l de cada produto de ligação obtido na etapa anterior. Outra alíquota de 100 μ l da bactéria foi, da mesma forma, incubada com 10 ng do vetor pUC 18 intacto, utilizado como controle da transformação. Após 30 minutos no gelo, os tubos contendo as células foram submetidos a um choque térmico por 90 segundos a 42°C e, em seguida, incubados por 2 minutos no gelo. A seguir foram adicionados 900 μ l de meio 2xyt (1.6% lacto triptona, 0.5% extrato de

levedura, 0.05% NaCl, pH 7.0) a cada tubo contendo as células transformadas e estas foram submetidas à nova incubação por 1 hora a 37 °C sob agitação (180 rpm).

Uma alíquota de 100 µl de cada tubo contendo *E. coli* DH5α transformada foi plaqueada em placas de cultura, contendo meio 2xyt com 1.5% de ágar, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, 0.004% de X gal e IPTG para concentração final de 0.1 M. As placas foram, então, incubadas em estufa a 37 °C por ~ 16 horas.

Seleção dos clones, verificação da presença dos fragmentos de interesse e purificação dos plasmídios:

Os clones foram selecionados ao acaso entre aqueles de cor branca, tendo sido escolhidos cinco clones de cada transformação para verificação da presença do inserto através da PCR. Os clones escolhidos foram isolados diretamente da placa (utilizando-se um palito estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. A reação foi feita em um volume final de 10 µl contendo 1 pmol dos iniciadores direto e reverso de M13 ou com 1 pmol dos iniciadores específicos utilizados na amplificação inicial de cada fragmento, sendo as outras condições mantidas. Quando os iniciadores para M13 foram utilizados, as reações de PCR foram desenvolvidas por 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto a 55 °C e 2 minutos a 72 °C, precedidos por uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e seguidos por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Quando foram utilizados os iniciadores específicos para cada fragmento clonado, as condições da PCR foram as mesmas da amplificação inicial. Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE corado pela prata, sendo então selecionados dois a cinco clones positivos de cada transformação. Para a obtenção do DNA plasmidiano os clones escolhidos foram isolados diretamente da placa (com palito estéril) e inoculados em tubos contendo 3 a 5 ml de meio 2xyt suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. A incubação ocorreu por 16 horas a 37 °C sob agitação. Após a incubação as bactérias foram centrifugadas a 14000 x g. Os DNAs plasmidiano contendo os fragmentos de interesse foram então purificados utilizando-se o kit "Wizard Mini Prep" (Promega), conforme especificações do fabricante e ressuspendidos em 50 a 60 µl de água deionizada estéril. O DNA purificado obtido foi quantificado em gel de agarose conforme descrito no item 3.2.5. As

reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se aproximadamente 300 ng de DNA por tubo de reação, como descrito no item 3.2.7.

3.2.11- Estudo de instabilidade de microssatélites:

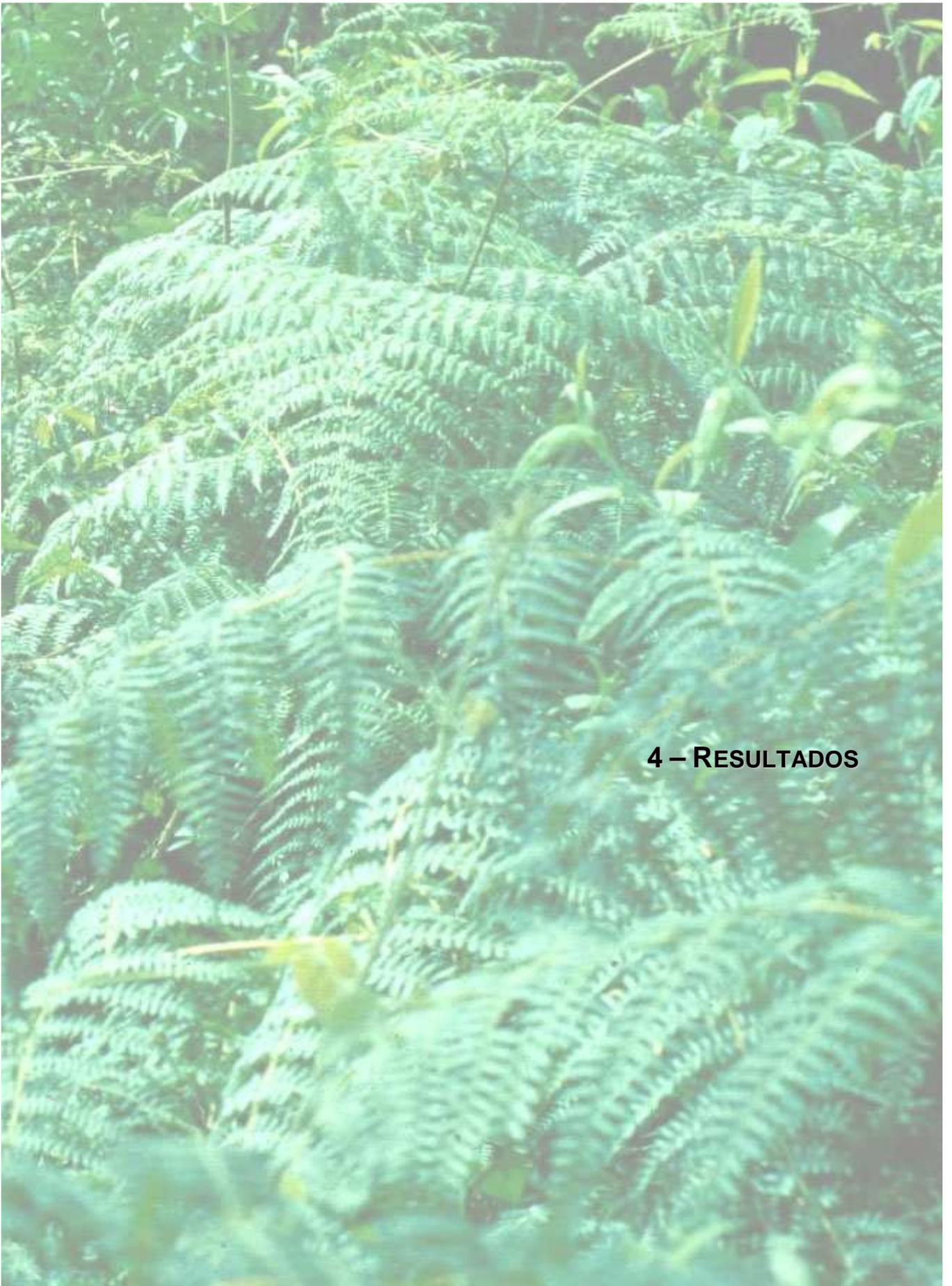
Foram analisados cinco diferentes locos de microssatélites de seis adenocarcinomas de íleo e de um carcinoma de bexiga de ratos tratados com broto de samambaia por longo período de tempo. Estes tumores foram previamente seqüenciados para os genes *p53*, *H-ras* e *K-ras*. Cada loco foi amplificado simultaneamente de um tumor e de tecido normal correspondente. A localização dos locos, os iniciadores, tamanho dos fragmentos e temperaturas de anelamento utilizadas, mostrados na tabela IV, foram descritos por Serikawa e colegas (Serikawa *et al.*, 1992). Os locos IGHE, ADRB2, PRLR (repetições de dinucleotídeos) e o loco PBPC2 (repetição de tetranucleotídeo) foram testados anteriormente juntamente com outras 81 seqüências de microssatélites em tumores de cólon de ratos induzidos por amins heterocíclicas (Canzian *et al.*, 1994). No trabalho citado, cinco de oito tumores induzidos por 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo-[4,5-b]piridina, apresentaram instabilidade em pelo menos um dos locos acima referidos. O loco IVD é uma repetição de poli(A) com 20 nucleotídeos, monomórfico, e foi escolhido devido à sua similaridade com o loco monomórfico BAT26 de humanos, que tem sido proposto como o melhor marcador de instabilidade de microssatélites em tumores colorretais humanos (Hoang *et al.*, 1997).

As reações de PCR ocorreram em um volume final de 10 µl em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.4 (PBPC2, IVD e ADRB2) ou pH 9.0 (IGHE e PRLR), com 25 mM de dNTP's, 20 nmoles de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM (PBPC2, IVD e ADRB2) ou 1.0 mM de MgCl₂ (IGHE e PRLR), Triton X100 0.1%, na presença de 0.5 U de *Taq* DNA polimerase. Após desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, a reação procedeu por 35 ciclos de 1 minuto na respectiva temperatura de anelamento de cada par de iniciador, 1 minuto de extensão a 72°C e 1 minuto de desnaturação a 95 °C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72 °C.

A seguir, os produtos desta amplificação foram resolvidos em gel de poliacrilamida 8%, com 7M de uréia, onde o produto da amplificação de uma amostra de tumor foi aplicado ao lado de uma amostra da amplificação do respectivo tecido normal. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 0.5%) e as bandas visualizadas por revelação com nitrato de prata.

Tabela IV – Localização dos *locus*, repetições, iniciadores e tamanho dos produtos de PCR usados para analisar instabilidade de microssatélites.

Símbolo do loci	Cromosomo	Repetição	Iniciadores	Tamanho (pb)	Tm (°C)
IGHE	6	(CA)22	Direto: CTTCCCTACCTTCTACAACACTAAG Reverso: TAAACCAAAGAGCATGATGAAG	147	60
PRLR	2	(TC)25	Direto: CTCACGTGGTGATATCTATCTTTC Reverso: AAGCATGAAGCAAGTTGGAG	182	55
ADRB2	18	(AG)10	Direto: TAGGTTTTTAAGCTGCAAGTGAG Reverso: CTGTACAAGGAAAACATTAAGCAC	110	50
PBPC2	1	(AGGA)12	Direto: TCTGACCCATACTTGTACTTTGC Reverso: AATTCTGCCTCTTTTCTCAG	198	60
IVD	3	(A)20	Direto: GAAAGCCTAAAATTCGGTCC Reverso: AGGGCGCAGACACTGTTAC	133	65



4 - RESULTADOS

4.1 - Produção de tumores:

Ratas foram tratadas por longo tempo com a água de cocção do broto de samambaia (ACBS) ou com o broto de samambaia seco a 10% (p/p) na ração (BSS) de maneira a produzirem tumores para estudos genômicos. Protocolos experimentais utilizando quantidades maiores de broto de samambaia seco na ração (20 e 30%) foram testados, mas os animais apresentaram diminuição do consumo de ração e começaram a apresentar significativa perda de peso. Assim, decidiu-se por manter a proporção de 10% (p/v) de broto de samambaia seco na ração. O grupo tratado com ACBS foi composto por vinte animais e o grupo tratado com BSS foi composto por seis animais. Trabalho anterior mostrou que uma maior proporção de tumores de bexiga ocorreu quando os ratos foram tratados com ACBS ao invés do BSS na ração (Santos *et al.*, 1992). Assim, esperando uma produção maior de tumores de bexiga, um maior número de animais foi tratado com ACBS. Um grupo controle composto por 13 animais foi tratado com dieta padrão e água durante todo o período experimental. Dos seis animais tratados com BSS, quatro foram sacrificados aos 15 meses de experimento, para serem utilizados nos estudos de adutos de DNA, juntamente com quatro animais do grupo controle. Todos os outros animais dos grupos experimentais foram sacrificados a partir do 15º até o 24º mês de tratamento, quando apresentaram sinais de deterioração da saúde como hemorragias, perda do controle esfinteriano e descoramento das mucosas. O restante dos animais do grupo controle foi sacrificado após o sacrifício do último animal do grupo experimental.

As tabelas V e VI apresentam os resultados da incidência e distribuição das lesões proliferativas encontradas em ratas tratadas por longo tempo com a água de cocção do broto de samambaia (ACBS) e com o broto de samambaia seco na dieta (BSS). Várias lesões, variando de hiperplasia da mucosa a adenocarcinomas e carcinomas, foram encontradas em ambos os grupos de animais tratados. Um animal do grupo controle apresentou um cistoadenofibroma benigno isolado no peritônio. O mesmo tipo de lesão foi encontrado em quatro animais tratados com ACBS. Os outros doze de treze animais do grupo controle aparentemente não apresentaram nenhuma outra lesão.

Tabela V - Incidência e tipos histológicos de lesões proliferativas encontradas em ratas tratadas com água de cocção de broto de samambaia (ACBS), broto de samambaia seco a 10% na ração (BSS) e água com ração padrão (Controle).

Sítio	Tipo de lesão	Controle	ACBS	BSS
Íleo	Hiperplasia	0	4	2
	Adenoma	0	13	3
	Adenocarcinoma	0	4	3
	Carcinoma	0	1	0
Bexiga urinária	Hiperplasia	0	4	1
	Papiloma	0	4	2
	Adenoma	0	1	0
	Carcinoma	0	1	0
Outros	Miscelânea	1*	8**	0

O número de animais apresentando cada tipo de lesão está indicado.

(*) um animal apresentando cistoadenofibroma isolado.

(**) dois animais com pólipos endocervicais, quatro animais com cistoadenofibroma isolado, um animal com fibroma cervico-vaginal e tumor de ovário não classificado e um animal com leiomioma uterino.

Tabela VI - Distribuição das lesões entre ratas do grupo controle e tratadas por longo tempo com água de cocção de broto de samambaia (ACBS) e broto de samambaia seco a 10% na ração (BSS).

Grupo (n)	Íleo	Bexiga	Outros	Múltiplos sítios	Sem lesões
Controle (13)	0	0	1 (7.7%)	0	12 (92.3%)
ACBS (20)	17 (85%)	8 (40%)	8 (30%)	10 (50%)	0
BSS (6)	4 (66.7%)	2 (33.4%)	0	2 (33.4%)	2 (33.4%)

A maioria dos animais dos grupos experimentais (24 de 26) apresentou lesões de íleo (principalmente) e/ou de bexiga. Em dois dos ratos tratados com BSS, que foram sacrificados no 15^o mês, nenhuma lesão foi encontrada. Lesões no útero e ovário foram também detectadas em quatro de vinte ratas tratadas com ACBS. Dos animais tratados com ACBS, 50% apresentaram lesões em mais que um sítio enquanto que o mesmo ocorreu com 33% dos animais tratados com BSS. Adenocarcinomas de íleo ou carcinomas foram encontrados em cinco dos vinte (25%) animais tratados com ACBS, enquanto que três dos seis (50%) animais tratados com BSS apresentaram adenocarcinomas. Em contraste, apenas um de vinte (0.5%) animais tratados com ACBS apresentou uma lesão maligna na bexiga, enquanto que nenhum rato tratado com BSS apresentou lesão neste sítio. A figura 7 ilustra o aspecto macroscópico de algumas das lesões encontradas em íleo e bexiga, enquanto que alguns cortes histológicos de lesões proliferativas progressivas encontradas no íleo de animais tratados são apresentados na figura 8. A lesão maligna de bexiga consistiu de um carcinoma de células transicionais e os adenocarcinomas de íleo foram bem diferenciados apresentando invasão até a submucosa.



Figura 7 – Aspecto macroscópico de tumores de bexiga (no alto) e de íleo (embaixo) encontrados em ratas tratadas por longo prazo com água de cocção do broto de samambaia. À direita são apresentados cortes dos órgãos para melhor visualização das lesões.

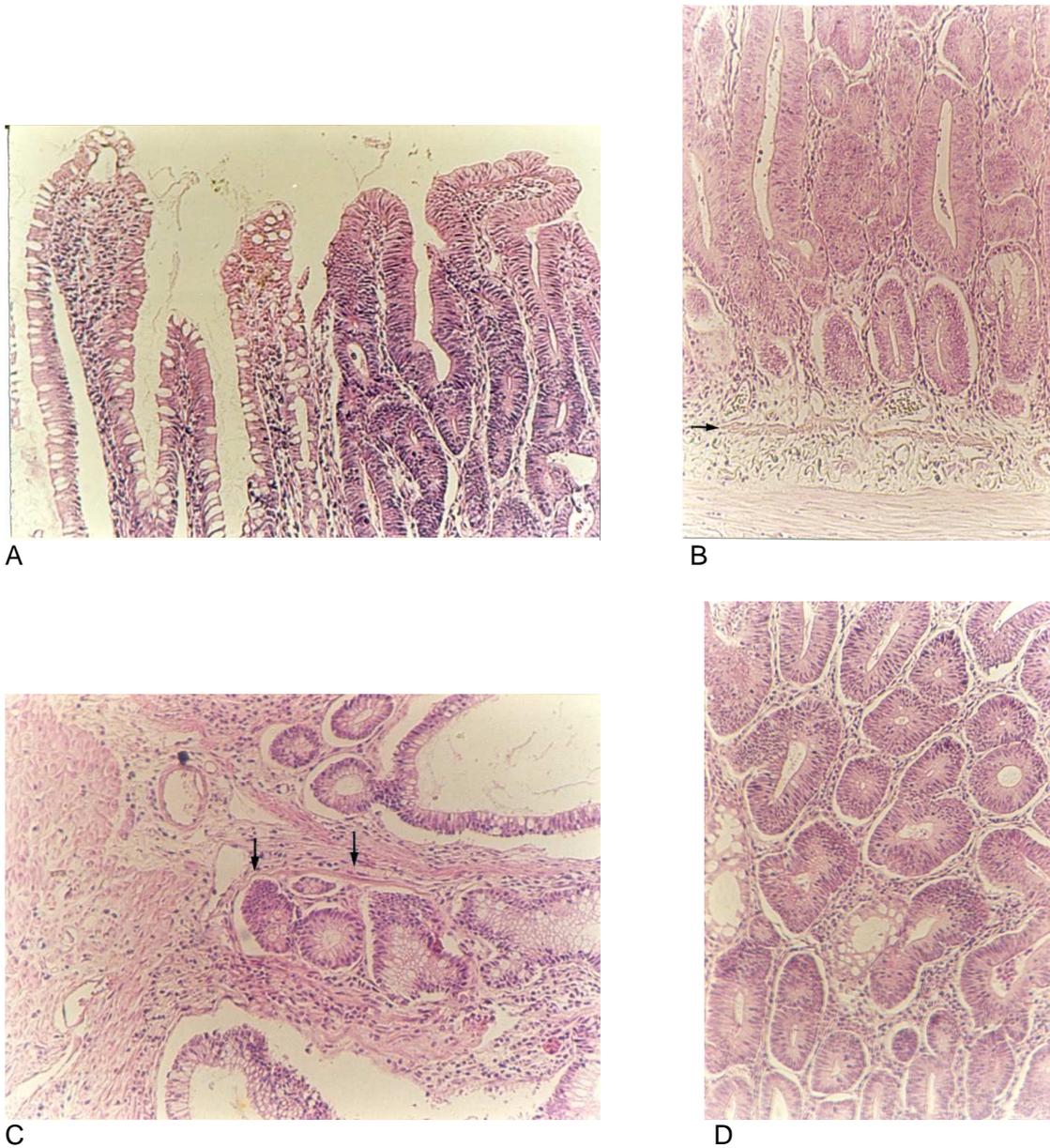


Figura 8- Cortes histológicos de íleo de ratas tratadas com broto de samambaia, ilustrando a evolução das lesões proliferativas encontradas. A: mucosa de íleo mostrando na metade esquerda da figura vilosidades normais e na metade direita, epitélio hiperplásico, HE, 250x; B: adenoma de íleo, onde observa-se glândulas neoplásicas justapostas, com epitélio pseudoestratificado limitadas à mucosa, sendo que a camada muscular da mucosa (seta) está íntegra e a sub-mucosa está livre da neoplasia, HE, 250x; C: adenocarcinoma de íleo, onde pode-se observar glândulas neoplásicas que ultrapassaram a muscular da mucosa (setas) e invadiram a submucosa, chegando próximas da camada muscular, HE, 250x; D: adenocarcinoma de íleo apresentando pelo menos 80% de células de natureza neoplásica, HE, 400x.

4.2- Estudos de adutos de DNA:

4.2.1 - Ratas tratadas com diferentes preparações do broto de samambaia (*Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum*) por diferentes períodos de tempo:

Ratas foram tratadas com diferentes preparações obtidas do broto de samambaia por longo e médios prazos. Por longo prazo, os animais foram tratados com o broto de samambaia seco a 10% (p/v) na ração (BSS) durante 15 meses e por médios prazos os animais foram tratados com BSS ou com a água de cocção do broto de samambaia (ACBS) por 3, 9 e 21 semanas. Cada grupo experimental e controle foi composto por quatro animais. Após o período experimental os animais foram sacrificados e o DNA extraído de tecidos alvos (íleo e estômago) foi analisado para a presença de adutos aromáticos pelo método de pós-marcação com ^{32}P , utilizando dois diferentes protocolos para o enriquecimento de adutos nas amostras: extração com butanol e digestão com nuclease P1.

O tratamento de ratas com BSS pelo período de 15 meses foi suficiente para induzir tumores em dois dos quatro animais tratados sendo que nenhum tumor foi encontrado nos animais do grupo controle. As lesões encontradas incluíam hiperplasia, adenoma e adenocarcinoma do íleo terminal. Nenhuma lesão visível foi encontrada no estômago e bexiga destes animais. No entanto, não foram detectados adutos de DNA nas amostras de tecido normal (íleo ou estômago) destes animais, utilizando o método de pós-marcação com ^{32}P de adutos enriquecidos tanto pela extração com butanol como pelo tratamento das amostras com nuclease P1. A figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos de um experimento com as amostras de DNA tratadas com butanol, extraídas de íleo dos animais tratados por 15 meses com BSS. Também não foram detectados adutos no DNA obtido de íleo de ratas tratadas com BSS ou com ACBS por períodos de tempo menores (3, 9 e 21 semanas), usando o mesmo protocolo. Estes últimos períodos experimentais não foram suficientes para induzir tumores nos animais tratados.

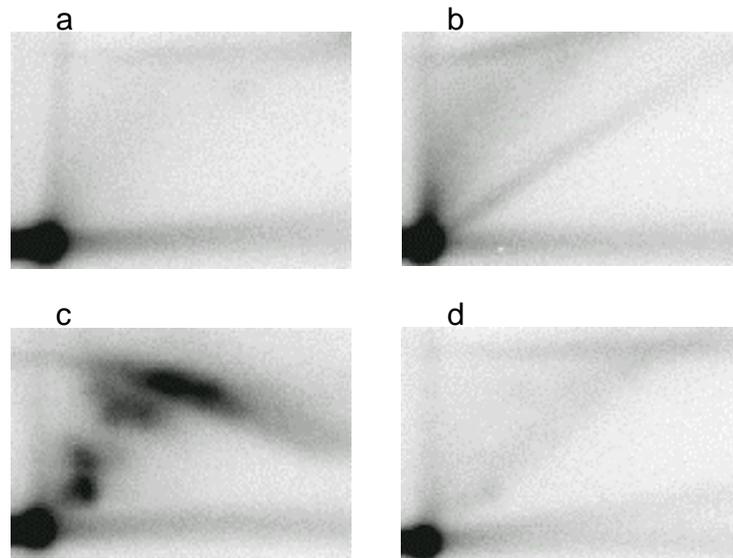


Figura 9 - Cromatogramas das análises de pós-marcação de DNA extraído de íleo de ratas tratadas com samambaia seca 10% (p/p) na ração normal (a) ou do grupo controle (b) e sacrificados 15 meses após o início do tratamento. Controle positivo: DNA de tecidos gastrintestinais superiores de camundongos tratados com dose aguda de extrato de samambaia e sacrificados 5 horas depois (c); controle negativo: DNA de timo de bezerro (d). As amostras de DNA foram digeridas com nucleai e fosfodiesterase Worthington e enriquecidas usando extração com butanol. A cromatografia, marcação e análise foram feitas como descrito em Métodos.

Ratas também foram tratadas com dose aguda única de extratos alcoólicos obtidos de broto de samambaia fresco, seco ou cozido. Estes animais (quatro de cada grupo) foram sacrificados 5 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após o tratamento juntamente com quatro animais de cada grupo controle. DNA obtido do estômago e do íleo destes animais foram também analisados por pós-marcação com ^{32}P . Nenhum aduto de DNA relacionado ao tratamento com os extratos de broto de samambaia foi detectado nestas amostras. A figura 10 I (a-d) apresenta os resultados obtidos com o DNA de íleo dos animais tratados com extrato de broto de samambaia fresco e sacrificados 5 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após o tratamento. Alguns adutos observados no DNA de algumas amostras de animais tratados com extratos de samambaia fresca ou seca (dados não mostrados) também foram encontrados em amostras de animais do grupo controle (Figura 10 II b e d). No entanto, em outros experimentos, ensaiando amostras de DNA obtidas do mesmo tecido mas extraídas em dias diferentes, estes adutos foram detectados em apenas uma das amostras.

4.2.2 - Camundongos tratados com dose aguda de extrato ou esporos de samambaia e DNA modificado *in vitro* por ptaquilosídeo:

Amostras de DNA dos tratos gastrointestinais superiores de camundongos BDF1, tratados com administração intragástrica de esporos ou extrato de samambaia (*Pteridium aquilinum*) foram ensaiadas pelo método de pós-marcação com ^{32}P e apresentaram vários adutos que não foram encontrados nas amostras de DNA dos animais do grupo controle (Figura 11 a), ou em DNA de baço de bezerro usado como controle negativo. Alguns destes adutos (Figura 11 I b, c - 1,2 e 3), localizados perto da origem, foram anteriormente descritos (Povey *et al.*, 1996) e no presente trabalho, pelo menos quatro outros adutos (4, 5, 6 e 7) com maior mobilidade cromatográfica foram detectados tanto nas amostras de camundongos tratados com extrato (Figura 11 I b, II b) ou esporos de samambaia (Figura 11 I c, II c). Estes adutos, mais hidrofílicos, foram detectados tanto usando a extração com butanol como procedimento para enriquecer o conteúdo de adutos na amostra (Figura 11 I) quanto com o tratamento das amostras com nuclease P1 (Figura 11 II). No entanto, os adutos menos polares (1,2 e 3) não foram detectados usando-se o segundo procedimento (Figura 11 II b, c).

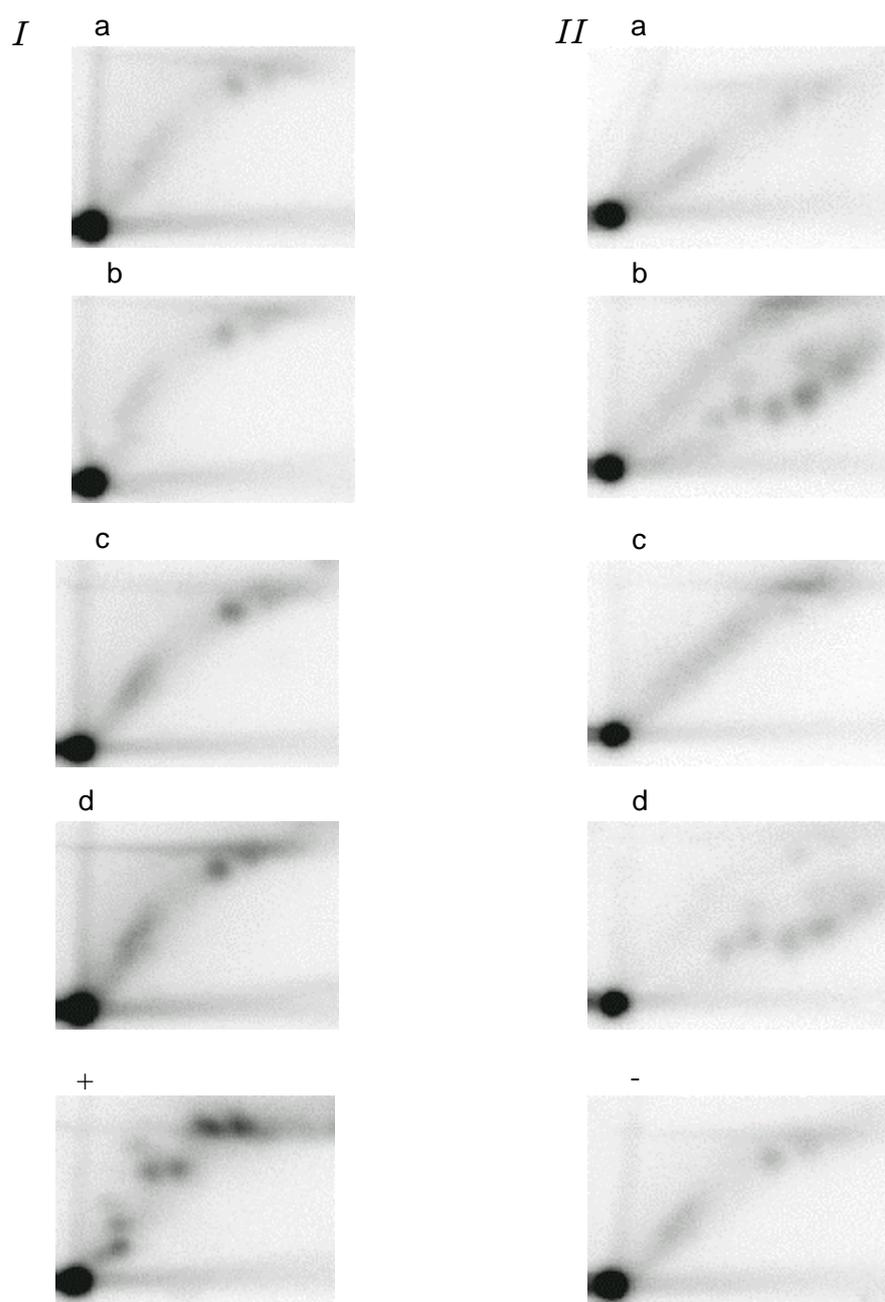


Figura 10- Cromatogramas das análises de pós-marcação de DNA extraído de íleo de ratas tratadas com uma dose intragástrica aguda de extrato de samambaia fresca (I) ou do grupo controle (II) e sacrificados 5 horas (a), 24 horas (b), 3 dias (c) e 7 dias (d) após o tratamento. Controle positivo (+): DNA extraído de tecidos gastrintestinal superiores de camundongos tratados com esporos de samambaia. Controle negativo (-): DNA de timo de bezerro. DNA foi digerido, enriquecido, marcado e analisado como para a Figura 9.

Utilizando ambos os procedimentos para o enriquecimento das amostras (apenas o resultado com nuclease P1 é mostrado), um aduto formado pela reação *in vitro* de DNA de baço de bezerro com o ptaquilosídeo ativado, APT-DNA (Figura 11 II d) foi detectado. Este aduto, APT-DNA, apresentou mobilidade cromatográfica similar aos adutos mais hidrofílicos encontrados em amostras de camundongos tratados com extrato e esporos de samambaia. Assim, foram realizados experimentos de co-cromatografia onde as amostras de DNA de camundongo e do DNA modificado *in vitro* pelo ptaquilosídeo ativado foram tratadas e aplicadas simultaneamente no mesmo cromatograma. Nestes cromatogramas (apenas o experimento utilizando o enriquecimento com nuclease P1 é mostrado) um aduto correspondente ao APT-DNA (marcado com círculo) com mobilidade cromatográfica diferente dos adutos encontrados no DNA de camundongos foi detectado (Figura 11 II e, f).

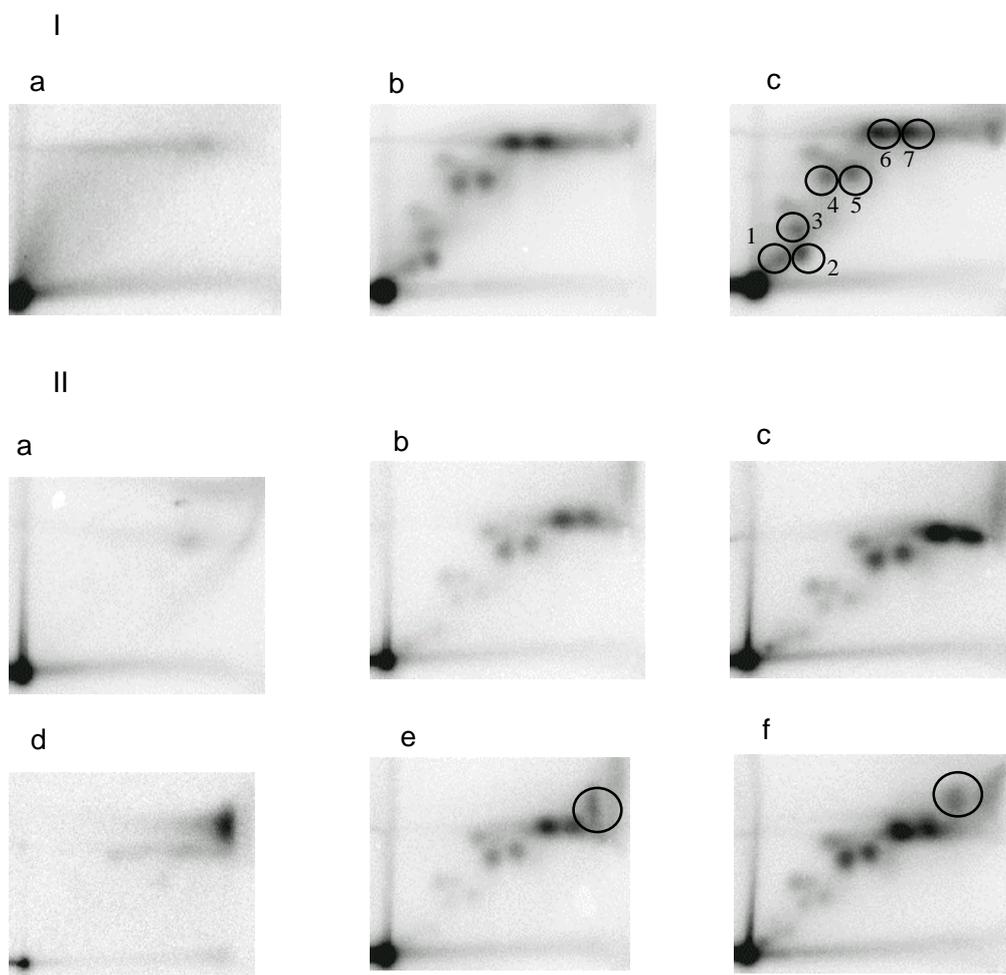


Figura 11 - Cromatogramas e co-cromatogramas da análise de pós-marcação de: DNA extraído de tecidos gastrintestinal superiores de camundongos do grupo controle (a), tratados com administração intragástrica de extrato de samambaia (b) ou tratados com administração intragástrica de esporos de samambaia (c), DNA de timo de bezerro modificado *in vitro* com ptaquilosídeo ativado (d), co-cromatografia de **d** mais II **b** (e) e de **d** mais II **c** (f). I- DNA foi digerido com nuclease e fosfodiesterase da Worthington. Nucleotídeos modificados foram extraídos com butanol. II- DNA foi digerido com nuclease micrococcal Sigma e fosfodiesterase de baço de bezerro Boehringer-Mannheim e o 3'-P dos nucleotídeos normais foram removidos pela incubação do DNA digerido com nuclease P1. As amostras foram marcadas usando $[^{32}\text{-}\gamma\text{-P}]\text{-ATP}$ com alta atividade específica (7000Ci/mmol) e foram aplicadas em placas de PEI-celulose. Cromatografia e análise foram realizadas como descrito em Métodos.

4.3 - Estudos de mutações:

4.3.1 - SSCP-PCR e seqüenciamento dos exons 5 a 9 do gene *p53*:

Os exons 5 a 9 do gene *p53* de um total de 30 amostras de DNA obtidas de tecidos normais e lesões de íleo e bexiga de ratas tratadas com água de cocção de broto de samambaia ou com o broto de samambaia seco a 10% na ração, foram analisadas por SSCP-PCR. Cada fragmento foi analisado em duas diferentes condições de eletroforese (na ausência e na presença de glicerol a 10%) e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes. No presente trabalho, nenhum fragmento analisado apresentou alteração compatível com a presença de mutações.

Uma vez que a técnica de SSCP-PCR não é capaz de detectar 100% das mutações em todos os fragmentos analisados, decidimos proceder ao seqüenciamento destes mesmos exons (5 a 9) de oito tumores malignos (sete adenocarcinomas de íleo e um carcinoma de bexiga urinária) obtidos (cinco dos quais foram analisados por SSCP-PCR) e de uma amostra de tecido ileal normal. Para os exons de 5 a 8, foram seqüenciados diretamente os produtos da PCR utilizando-se um iniciador mais interno na reação de seqüenciamento. O exon 9 foi clonado para seqüenciamento. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes desde a primeira amplificação e ambas as fitas de cada fragmento foram seqüenciadas. As seqüências obtidas de ambas as fitas de cada fragmento foram editadas, alinhadas e comparadas com as seqüências depositadas no GeneBank. Os resultados obtidos indicaram ausência de mutações nas regiões estudadas do gene *p53* de tumores induzidos pela samambaia em ratas.

4.3.2 - Seqüenciamento dos genes *K* e *H-ras*:

Ambas as fitas de DNA das regiões compreendendo os códons 1 a 30 do exon 1 e os códons 51 a 70 do exon 2 do gene *H-ras* foram amplificadas das amostras de tumor maligno (7 adenocarcinomas de íleo e 1 carcinoma de bexiga) cujo gene *p53* havia sido seqüenciado, de uma amostra de papiloma de bexiga urinária e de uma amostra de

tecido normal pareado com um dos adenocarcinomas de íleo. Os produtos destas ampliações foram clonados em vetor pUC18 e este vetor foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α . O DNA plasmidiano de cinco clones selecionados aleatoriamente das placas onde as bactérias transformadas foram crescidas, foi purificado e ambas as fitas foram seqüenciadas. As seqüências obtidas de ambas as fitas de cada fragmento foram editadas, alinhadas e comparadas com as seqüências depositadas no GeneBank. Nenhuma mutação foi encontrada na região seqüenciada do exon 1.

No exon 2 do gene *H-ras*, por outro lado, foi encontrada uma transição C \rightarrow A no códon 53 de quatro dos adenocarcinomas de íleo e na amostra de papiloma de bexiga urinária, enquanto que no códon 76 a mesma transição foi encontrada em três dos adenocarcinomas de íleo e na amostra de papiloma de bexiga. Estas lesões foram provenientes de cinco animais diferentes. O códon 53 foi alterado de CTG para ATG e o códon 76 de GAG para AAG como mostrado nas figuras 12 e 13. Para esclarecer a natureza desta transição (se mutação ou polimorfismo), uma amostra de DNA de íleo normal pareado com uma amostra de um dos adenocarcinomas que apresentaram a alteração foi clonada e ambas as fitas do DNA de cinco clones foram seqüenciadas da mesma forma. Nesta amostra de íleo normal as mesmas alterações foram também observadas, caracterizando então um polimorfismo. Todas as amostras foram heterozigotos para o polimorfismo apresentando o alelo normal e o alelo com a transição. Três amostras de adenocarcinomas, a amostra de papiloma de bexiga e a amostra de tecido normal apresentaram ambos os polimorfismos.

As regiões do gene *K-ras*, compreendendo os códons 4 a 20 (exon 1) e os códons 52 a 76 (exon 2) foram seqüenciadas diretamente dos produtos de PCR obtidos da amplificação das mesmas amostras analisadas para o gene *H-ras*. Neste caso, nenhuma mutação foi encontrada na região seqüenciada.

4.3.3 – Análise de microssatélites:

Cinco locos de microssatélites de ratos foram amplificados de DNA obtido de sete pares de tumores malignos (seis adenocarcinomas de íleo e um carcinoma de bexiga) e tecido

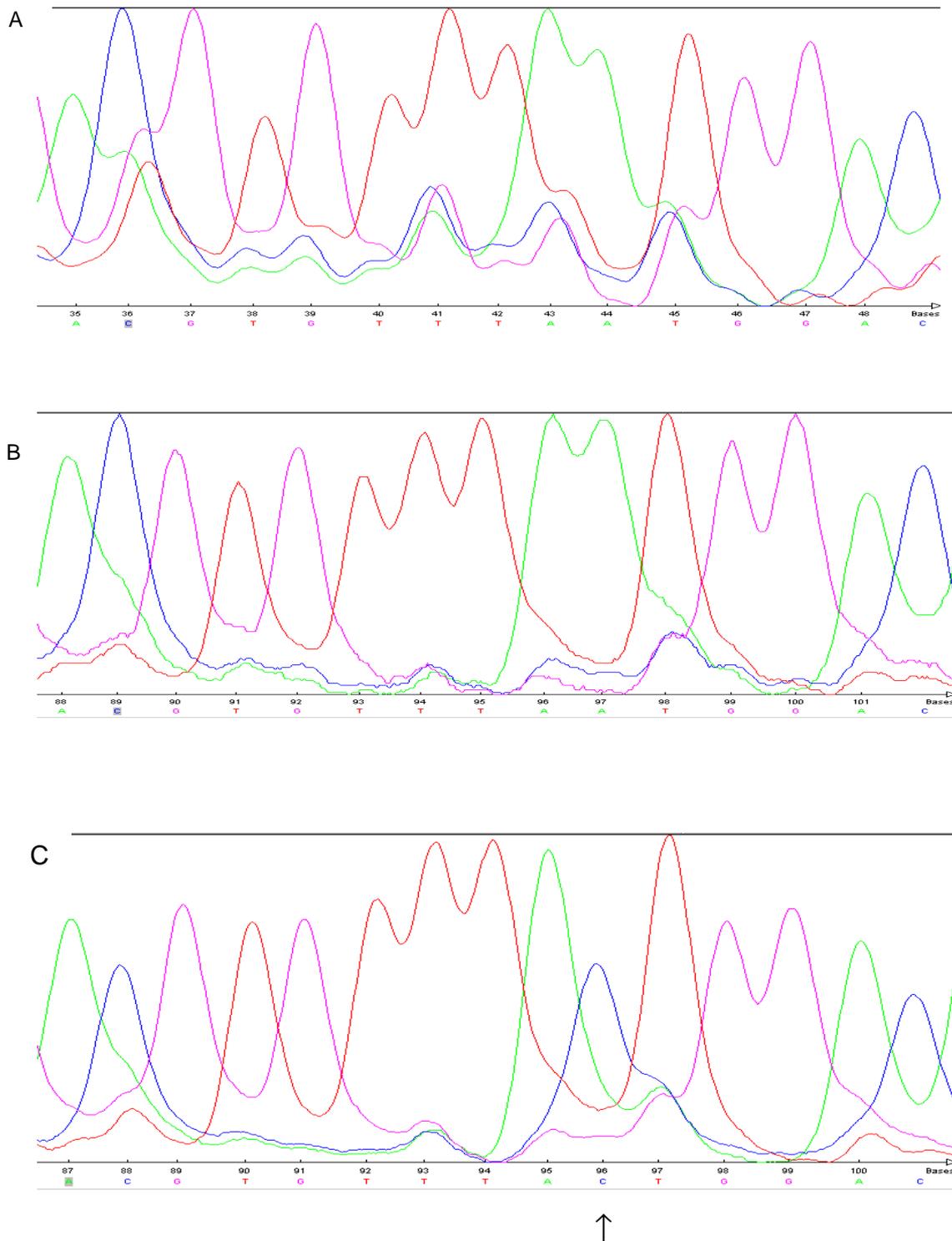


Figura 12 - Fluorogramas relativos ao seqüenciamento automático da fita direta dos códons 50-54 de clones transformados com o exon 1 do gene *H-ras* amplificado de: A- adenocarcinoma de íleo, B- mucosa de íleo normal do mesmo animal e C- outro alelo da mesma amostra que B, sendo que este clone apresenta o alelo normal. A seta indica a base mutada.

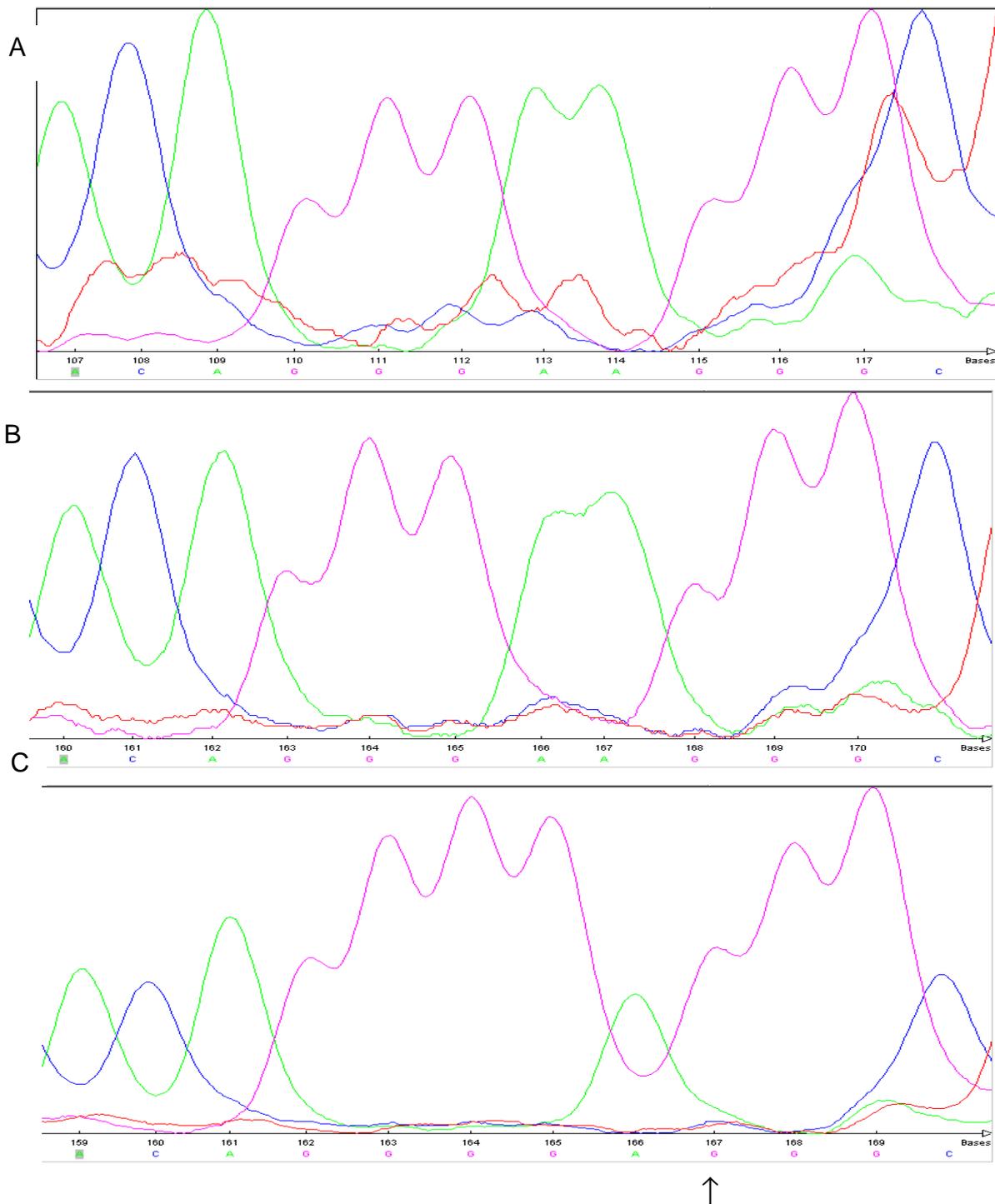


Figura 13 - Fluorogramas relativos ao seqüenciamento automático da fita direta dos códons 74-76 de clones transformados com o exon 2 do gene *H-ras* amplificados de: A- adenocarcinoma de íleo, B- mucosa de íleo normal do mesmo animal e C- outro alelo da mesma amostra que B, sendo que este clone apresenta o alelo normal. A seta indica a base mutada.

normal correspondente. As amostras de tumores analisadas estavam entre aquelas cujos genes *p53*, *H-ras* e *K-ras* já haviam sido seqüenciados. Os locos, localizados em 5 cromossomos diferentes, foram amplificados como descrito em Métodos e analisados em gel de poliacrilamida desnaturante. Nenhuma das amostras analisadas apresentou instabilidade de microssatélites. A figura 14 apresenta um dos géis obtidos para a análise dos locos PRLR, uma repetição de dinucleotídeo e PBPC2, uma repetição de tetranucleotídeo.

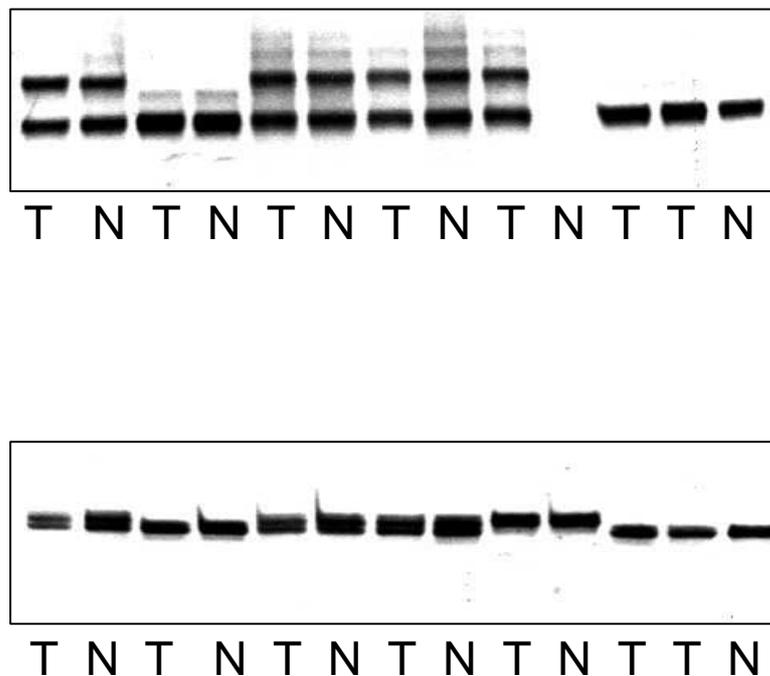
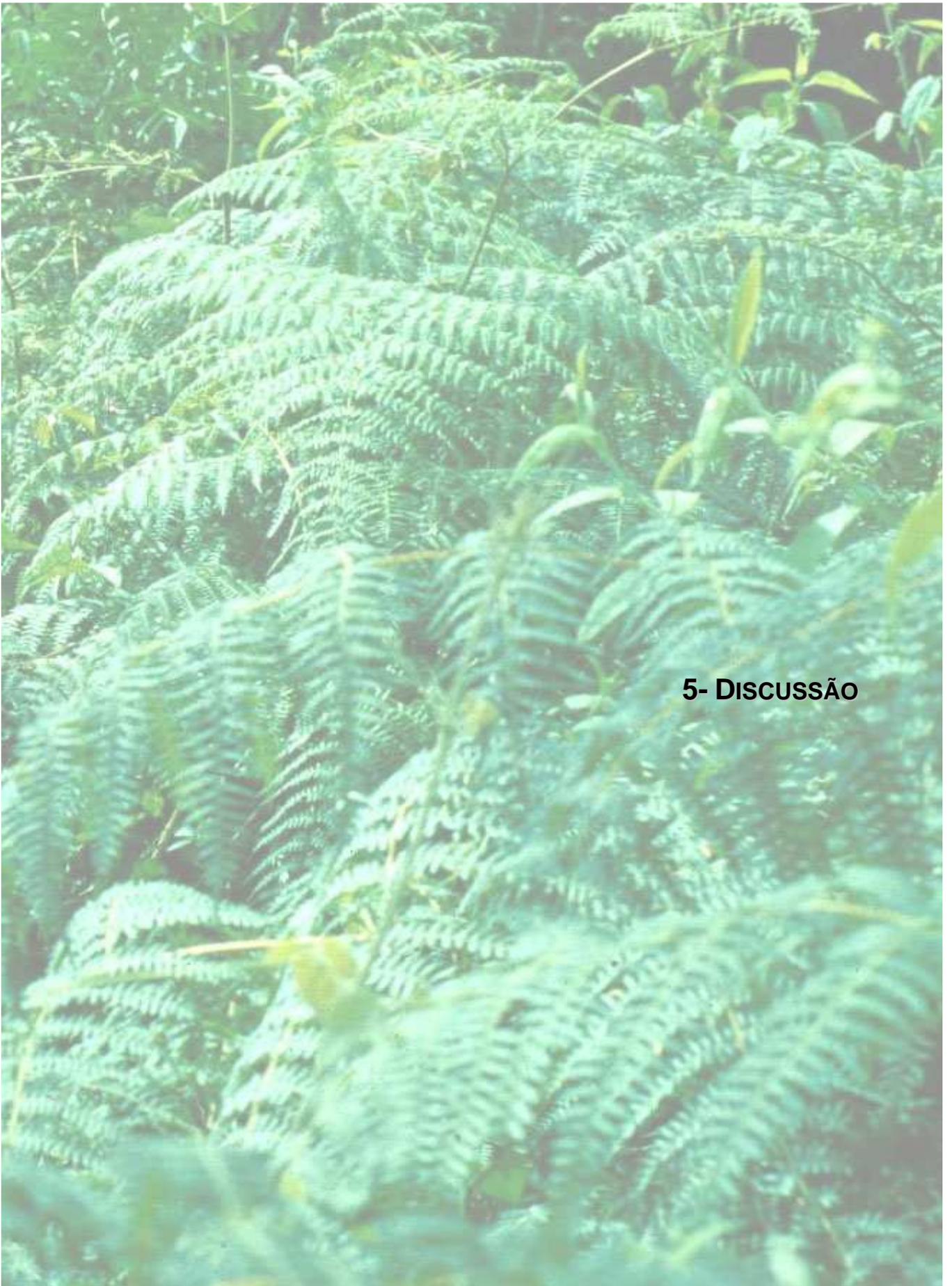


Figura 14- Análise da instabilidade de microssatélites para os locos PRLR (acima) e PBPC2 (abaixo). Os locos foram amplificados simultaneamente de tumores e tecido normal pareado com cada amostra de tumor e a seguir resolvidos em gel de acrilamida 8% contendo uréia 7M. T-tumor e N- tecido normal.



5- DISCUSSÃO

5.1 – Produção de tumores:

Efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos da samambaia têm sido descritos seguindo-se à administração da planta florescendo em diversas partes do mundo a vários animais em diferentes protocolos experimentais (IARC, 1986). A samambaia coletada na região de Ouro Preto (*Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum* var. *arachnoideum*) também apresenta potencial carcinogênico, induzindo a formação de tumores em íleo e bexiga urinária de ratos tratados com a samambaia seca, tanto crua quanto cozida, adicionada à ração padrão ou em ratos cuja água de beber é substituída pela água obtida da cocção da samambaia (Santos *et al.*, 1987, 1990, 1992 e Silva *et al.*, 2000). Estas observações são confirmadas no presente trabalho já que encontramos lesões malignas e pré-malignas com características histológicas de tumores induzidos por samambaia, em íleo e bexiga urinária de ratos tratados tanto com o pó do broto de samambaia seca a 10% na dieta (BSS) quanto com a água de cocção do broto de samambaia (ACBS).

Lesões benignas ou malignas de íleo foram mais prevalentes que lesões da bexiga urinária. Lesões de íleo ocorreram em 66% dos animais tratados com BSS, enquanto que 33% dos animais deste grupo apresentaram lesões de bexiga. Nos animais tratados com ACBS lesões de íleo ocorreram em 85% dos animais e lesões de bexiga foram encontradas em 40% dos animais. Apesar do pequeno número de animais no grupo tratado com BSS, seis animais comparados com vinte animais do grupo tratado com ACBS, estes resultados parecem ser consistentes com observação anterior que sugeriu um aumento da ocorrência de tumores na bexiga em ratos tratados com a água de cocção do broto de samambaia comparados com ratos tratados com o pó do broto de samambaia seca na dieta (Santos *et al.*, 1992).

Em todos os vinte e seis animais tratados quer com ACBS ou com BSS apenas nove lesões malignas (oito de íleo e uma de bexiga) foram encontradas enquanto que um total de dezessete adenomas e seis papilomas foram observados em contraste com trabalhos anteriores, utilizando a mesma variedade de samambaia (Santos *et al.*, 1990 e 1992), que demonstraram uma maior ocorrência de lesões malignas em relação às

lesões benignas. Tal fato pode ser devido a variações sazonais na concentração dos componentes tóxicos da samambaia utilizada nos diferentes trabalhos (Evans, 1984). Além disto, diferenças no conteúdo de ptaquilosídeo têm sido encontradas na samambaia relacionadas às condições de armazenamento (tempo e temperatura) (Potter & Pitman, 1995). Portanto, as diferenças no potencial tóxico das preparações utilizadas em diferentes estudos podem ser explicadas por diferentes tempos e condições de armazenamento destas. Por motivos estruturais, neste trabalho, não foi possível controlar a época da coleta e o tempo de armazenamento das preparações utilizadas. Como o tempo de tratamento dos animais foi prolongado (em média um ano e meio), a samambaia foi sendo coletada e processada na medida em que se fazia necessário, em diferentes épocas do ano.

5.2 – Estudos de adutos:

Como dito anteriormente, adutos de DNA são lesões precoces induzidas por agentes químicos, que devido a seu potencial mutagênico e facilidade relativa dos métodos utilizados para sua detecção, podem ser utilizados como dosímetros internos da exposição a substâncias carcinogênicas. Assim, decidimos verificar se as toxinas da samambaia eram capazes de levar à formação de adutos de DNA em tecidos alvos de ratos em níveis detectáveis pelo método de pós-marcação com ^{32}P . Assim, ratos foram tratados por longo prazo (15 meses) com broto de samambaia seco a 10% (p/p) na ração (BSS) e por médios prazos (3, 9 e 21 semanas) tanto com o broto de samambaia seco a 10% na ração, quanto com a água de cocção do broto de samambaia (ACBS). Um protocolo de tratamento dos ratos com dose aguda de extratos alcoólicos de broto de samambaia fresco, seco, ou cozido foi também utilizado. Surpreendentemente porém, não detectamos adutos de DNA de tecido normal de estômago ou íleo de ratos tratados por até 15 meses com BSS, mesmo em tecidos normais de ratos que desenvolveram tumores durante este período. Não detectamos também adutos de DNA nas amostras obtidas de animais tratados por médios prazos tanto com BSS quanto com ACBS ou tratados com dose aguda única dos extratos de samambaia.

Alguns adutos foram observados em amostras de DNA de animais tratados (Figura 9) que foram atribuídos a algum artefato no procedimento de extração de DNA, uma vez que adutos similares foram encontrados em amostras de DNA de ratos do grupo controle, mas não estavam presentes nas mesmas amostras de tecidos cujo DNA foi extraído em dia diferente (Figura 9).

A metodologia utilizada, pós-marcação com ^{32}P , foi, por outro lado, capaz de detectar adutos induzidos por samambaia em camundongos ou formados pelo ptaquilosídeo *in vitro*. Estas amostras de camundongos foram utilizadas como controle positivo em todos os experimentos. O fato de que não foram detectados adutos nas amostras de DNA de ratos tratados com a samambaia coletada em Ouro Preto pode ser atribuído a diferentes fatores. Descartamos a possibilidade de problemas com o ensaio de pós-marcação com ^{32}P já que as amostras utilizadas como controle positivo produziram consistentemente os mesmos resultados. Assumimos então que o protocolo utilizado é sensível para detecção de adutos induzidos por samambaia em níveis cujos estes são produzidos *in vivo*, pelo menos em camundongos. A samambaia coletada no Reino Unido (*Pteridium aquilinum* subsp. *aquilinum*) e a samambaia coletada no Brasil (*Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum* var. *arachnoideum*) possivelmente apresentam diferentes conteúdos de toxinas. De fato, já foi demonstrado que samambaias de uma mesma subespécie e mesmo de uma mesma variedade, florescendo em regiões diferentes da Austrália, podem apresentar diferentes concentrações de ptaquilosídeo (Smith *et al.*, 1994). As samambaias coletadas no Brasil e no Reino Unido podem ainda conter diferentes toxinas e, realmente, novas toxinas têm sido recentemente identificadas (Castillo *et al.*, 1998). Alternativamente, pode ser que ratos e camundongos metabolizem as toxinas da samambaia de maneira diferente o que pode resultar em níveis não detectáveis de adutos nos tecidos analisados de ratos (íleo e estômago). Neste aspecto é interessante notar que em ratos, a samambaia induz tumores principalmente de íleo seguido por bexiga urinária e glândula mamária, enquanto que em camundongos ocorrem principalmente leucemias e tumores de estômago e pulmão, sendo que os tumores de íleo são raros (Evans, 1984; IARC, 1986). Estes dados sugerem que diferentes carcinógenos presentes na samambaia podem ter diferentes ações em cada espécie. O fato de que adutos não puderam ser detectados em tecidos de ratos cronicamente tratados, que desenvolveram ou esperava-se que desenvolvessem tumores, pode ainda ser o resultado de um aumento da expressão de proteínas do sistema de reparo de DNA nos tecidos alvos que estaria sendo estimulada, em ratos, pelas próprias

toxinas da samambaia, ou ainda pode sugerir que adutos detectáveis por pós-marcação com ^{32}P não são importantes na formação dos tumores em ratos. A depurinação de N3 adenina em adutos induzidos por ptaquilosídeo ativado tem sido correlacionada com a indução de mutações e a formação de tumores (Prakash *et al.*, 1996). No entanto, tais adutos provavelmente não são detectados pelo procedimento de pós-marcação devido a sua instabilidade.

Previamente, Povey e colaboradores (Povey *et al.*, 1996) descreveram a ocorrência de adutos no tecido gastrintestinal superior de camundongos BDF1 tratados com dose aguda de esporos ou extrato de samambaia. Os autores descreveram a ocorrência de três adutos principais e alguns menores utilizando a extração com butanol para enriquecer as amostras. Estes adutos não foram caracterizados, mas apresentaram uma mobilidade cromatográfica similar àquela apresentada por adutos formados no mesmo tecido de camundongos tratados com compostos sintéticos que apresentavam um anel ciclopropil em sua estrutura. Usando protocolo um pouco diferente, detectamos os mesmos adutos (1,2 e 3) nestas amostras (Figura 12), mas também detectamos pelo menos outros quatro adutos (4, 5,6 e 7) com maior mobilidade cromatográfica (Figura 12). Alterações foram introduzidas no protocolo de pós-marcação utilizado originalmente por Povey e colaboradores (1996) com o objetivo de aumentar a sensibilidade do ensaio de pós-marcação com ^{32}P . Assim, utilizamos ^{32}P -ATP com maior atividade específica e aumentamos o número de lavagens com água saturada com butanol durante o procedimento de enriquecimento dos adutos nas amostras. Tais modificações parecem ter sido suficientes para aumentar a sensibilidade da técnica permitindo a identificação dos novos adutos nestas amostras.

De maneira a saber se algum dos adutos encontrados nas amostras de camundongos podia ser formado pelo ptaquilosídeo *in vivo*, realizamos um experimento de co-cromatografia. Nestes experimentos, as amostras obtidas de camundongos foram ensaiadas simultaneamente com uma amostra de DNA de baço de bezerro modificado *in vitro* pelo ptaquilosídeo ativado (APT). Cada uma das amostras de camundongo e a amostra de APT-DNA foram aplicadas cada uma em uma placa de cromatografia e também simultaneamente em uma outra placa. As placas onde as amostras foram aplicadas simultaneamente apresentaram um perfil de adutos correspondente aos adutos encontrados nas amostras de camundongo mais um aduto correspondente ao APT-DNA.

Assim, podemos dizer que o principal aduto formado pelo ptaquilosídeo *in vitro* (APT-DNA) não é detectado no tecido gastrointestinal superior de camundongos tratados com esporos ou extrato de samambaia coletada no Reino Unido ou de ratos tratados com samambaia coletada no Brasil. Como um aduto similar ao APT-DNA foi encontrado em íleo de bezerro alimentado com samambaia coletada na Austrália (Prakash *et al.*, 1996), é possível que nos extratos preparados com as samambaias coletadas no Reino Unido e no Brasil não exista ptaquilosídeo suficiente para induzir a formação de adutos *in vivo*, detectáveis pelo método por nós utilizado. O ptaquilosídeo pode ter sido degradado no procedimento de extração, embora deva ser notado que este pode ser isolado usando procedimentos similares e que extratos assim preparados, são carcinogênicos (Hirono *et al.*, 1978, 1984, Santos *et al.*, 1990; 1992). Alternativamente, como o ptaquilosídeo precisa ser ativado em condições alcalinas em seu metabólito ativo, a dienona, para que esta alquile DNA, pode ser que esta ativação seja facilitada no rúmen bovino. Ainda, diferenças nos padrões de expressão de proteínas de reparo nos tecidos alvos de bovinos e roedores podem explicar a manutenção do aduto formado por ptaquilosídeo em bovinos e o desaparecimento deste em roedores. Assim sendo, as diferenças metabólicas espécie-específicas entre ruminantes e roedores poderiam explicar as diferenças nos resultados encontrados.

Extração com 1-butanol (Gupta, 1985) ou o tratamento com nuclease P1 (Reddy & Randerath, 1986) são os procedimentos mais comumente utilizados para concentrar adutos de DNA de hidrolisados antes da marcação com ^{32}P . No entanto, nenhum dos dois métodos pode ser indiscriminadamente utilizado desde que a recuperação dos adutos pode variar muito dependendo da natureza química destes. Então, a extração com butanol na presença de um agente transferidor de fases pode ser aplicada para extrair compostos aromáticos lipofílicos contendo mais que um anel aromático. Por outro lado, embora muitos adutos aromáticos e também adutos não aromáticos volumosos mostrem-se resistentes à atividade 3' fosfodiesterase da nuclease P1 (Reddy & Randerath, 1986), várias arilaminas foram quase que completamente perdidas após o tratamento com nuclease P1 (Gupta & Early, 1988). Além do mais, vários adutos formados a partir de agentes alquilantes simples (Reddy *et al.*, 1985) e alguns adutos de nucleotídeos cíclicos podem ser sensíveis a digestão com nuclease P1 (Hemmink *et al.*, 1991; Szyfter *et al.*, 1991; Vaca *et al.*, 1992). Usando ambos os procedimentos, pudemos detectar o aduto formado *in vitro* pela reação do ptaquilosídeo ativado (APT) com DNA de baço de bezerro. A Figura 12 II d apresenta

os resultados obtidos com o tratamento com nuclease P1 e um perfil similar foi obtido com a extração com butanol.

Com amostras de DNA obtidas dos tratos gastrintestinais superiores de camundongos BDF1, nós obtivemos perfis similares de adutos tanto com extração com butanol tanto com o tratamento com nuclease P1. No entanto, os adutos de baixa mobilidade (Figura 12 - 1, 2, e 3) que haviam sido descritos anteriormente, não estavam presentes nas amostras digeridas inicialmente com nuclease micrococcal da Sigma e com fosfodiesterase de baço de bezerro da Boehringer-Mannheim (Figura 12 II b, c). Estes adutos de baixa mobilidade foram detectados apenas nas amostras digeridas inicialmente com as enzimas obtidas da Worthington (Figura 12 I b, c). É possível que estas diferenças sejam devidas à digestão parcial do DNA dependendo das enzimas utilizadas, já que diferenças na eficiência de digestão de DNA e liberação de N7-MedGp já foram encontradas (Haque *et al.*, 1997).

Em resumo, adutos de DNA derivados do ptaquilosídeo ativado não foram detectados em tecidos de roedores tratados com *Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum* var. *arachnoideum* ou com *Pteridium aquilinum* subsp. *aquilinum*. Nós não podemos descartar a possibilidade de que isto seja o resultado de baixos níveis de ptaquilosídeo nas preparações de samambaia utilizadas para o tratamento dos animais. No entanto, como tumores foram induzidos em ratos pela samambaia *Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum* var. *arachnoideum* e adutos de DNA foram detectados seguindo-se o tratamento de camundongos com *Pteridium aquilinum* subsp. *aquilinum*, podemos concluir que mais do que uma substância genotóxica estão presentes na samambaia. Se estas genotoxinas estão relacionadas aos novos compostos similares ao ptaquilosídeo que estão sendo identificados, permanece a ser determinado (Castillo *et al.*, 1998).

5.3 – Estudos de mutações e instabilidade de microssatélites:

O câncer surge como o resultado de uma “instabilidade genética” que permite uma ocorrência contínua de mudanças genéticas e epigenéticas que permitem que a célula escape dos controles celulares e ambientais que normalmente controlam seu

crescimento e proliferação. Em conseqüência, ocorre um acúmulo de múltiplas mutações em genes associados a câncer. No desenvolvimento de tumores colorretais duas vias distintas são reconhecidas: uma chamada de “via mutadora”, é caracterizada por tumores que apresentam o “fenótipo mutador” e outra chamada “via clássica”. Propõe-se que os genes envolvidos em reparo de erros de pareamento do DNA (MMR) estão entre os alvos mais precoces dos danos ao DNA causados por carcinógenos que levam ao desenvolvimento de tumores pela “via mutadora”. De fato, a falha de algumas proteínas do sistema de reparo de erros de pareamento, notadamente *hMSH2* e *hMLH1* em reparar erros que ocorrem durante a replicação, podem causar a “instabilidade de microsatélites” (MSI), que caracteriza fenotipicamente esta via. Por outro lado, tumores de cólon que não apresentam MSI, desenvolvem-se por acúmulo de mutações em genes relacionados ao câncer como oncogenes e genes supressores de tumor, caracterizando a “via clássica”. Uma série de estudos tem estabelecido que nesta via, mutações aditivas do oncogene *K-ras*, juntamente com a inativação dos genes supressores de tumor *P53*, *DCC* e *APC*, ocorrem na maioria dos pacientes e estão implicadas com transformação gradual da mucosa normal em tumor maligno (Vogelstein & Kinzler, 1993).

Apesar de existirem na literatura um grande número de trabalhos relativos aos efeitos tóxicos e carcinogênicos da samambaia ou seus constituintes isolados, quase nada é relatado a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese destes tumores. É bastante claro, a partir de estudos com a samambaia ou seus constituintes, que o tipo de tratamento e a via utilizada é capaz de alterar o sítio e a ocorrência de tumores (Shahin *et al.*, 1998b). Como o objetivo do estudo destes tumores foi encontrar possíveis marcadores moleculares da ação da samambaia sobre o genoma, achamos importante tratar os animais com a samambaia e não apenas com alguns de seus constituintes isolados, já que o homem certamente está exposto a todas estas toxinas simultaneamente. Assim, decidimos verificar se os tumores induzidos pela samambaia oferecida a ratos via digestiva apresentavam mutações em genes tipicamente mutados em tumores de cólon da chamada “via clássica”: *p53* e *K-ras*.

A maioria das mutações no gene *P53* está localizada entre os exons 5 a 8, os quais incluem blocos de seqüências conservadas (Caron de Fromentel & Soussi, 1992) e uma seqüência específica de domínio de ligação com DNA (Bargonetti *et al.*, 1993).

Mutações inativadoras nestes domínios resultam em uma perda da função de supressão do crescimento celular da proteína P53. Mutações no gene *P53* são em muitos casos, específicas para determinado tumor (revisto por Harris, 1993 e Greenblat *et al.*, 1994) e da mesma maneira, um carcinógeno pode induzir mutações específicas em modelos animais e o tipo de mutação pode freqüentemente ser relacionada à reatividade química do carcinógeno. A assinatura mutacional no gene *P53* varia consideravelmente com o tipo de tumor e parece ser específica para o órgão afetado (Pfeifer & Holmquist, 1997). Estas observações fazem de *p53* um marcador molecular adequado para tumores quimicamente induzidos. Por outro lado, os tipos de mutações ativadoras que ocorrem em genes *ras* são dependentes do tecido alvo e do carcinógeno utilizado para a indução dos tumores. Mutações de ponto dos genes da família *ras* são dependentes do carcinógeno químico e a incidência e localização destas mutações nos genes *ras* são também dependentes da espécie animal e dos órgãos envolvidos (Wang *et al.*, 1990; Jacoby *et al.*, 1991; Ohgaki *et al.*, 1991; Sukumar *et al.*, 1991). Assim, mutações nos genes *p53* e *K-ras* poderiam eventualmente ser utilizadas como marcadores moleculares da ação da samambaia sobre o genoma.

Iniciamos então o presente trabalho fazendo uma análise de SSCP dos exons do gene *p53* onde mutações ocorrem mais freqüentemente (exons 5 a 9 em ratos) em lesões benignas e malignas obtidas até então dos animais tratados com ACBS. Embora duas diferentes condições tenham sido usadas para o SSCP, o que teoricamente permitiria uma sensibilidade bastante elevada para a detecção de mutações de ponto, nenhuma alteração indicativa de mutação foi encontrada nesta análise. A técnica de SSCP-PCR foi desenvolvida em 1989 e é provavelmente um dos métodos de detecção de mutações mais comumente utilizados. No entanto, a taxa de detecção de mutações é a característica mais frustrante do método. Isto porque, utilizando uma condição, tipicamente 50 – 95% das mutações são detectadas e esta taxa se aproxima de 100% apenas quando três ou mais diferentes condições são usadas (Cotton, 1997). Para descartarmos a possibilidade de que alguma mutação pudesse não estar sendo detectada pelas condições de SSCP por nós utilizadas, decidimos proceder ao seqüenciamento das mesmas regiões (exons 5 a 9) de sete adenocarcinomas de íleo e um carcinoma de bexiga, provenientes dos ratos tratados com ACBS e com BSS. Alguns destes tumores haviam sido analisados por SSCP. Seqüenciamos inteiramente os exons 5 a 9 do gene *p53* amplificados das amostras acima referidas. Os iniciadores

utilizados para a primeira amplificação foram desenhados complementares às seqüências de introns de maneira a evitar a amplificação de pseudogenes. Nenhuma mutação foi encontrada nas regiões pesquisadas.

Tumores de glândula mamária de ratos tratados com ptaquilosídeo ativado, também não apresentaram mutações nos exons 5 a 7 do gene *p53*, em concordância com os nossos resultados (Shahin *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* têm mostrado que a exposição à quercetina desacelera o ciclo celular na fase G1 em células primárias de bovinos (Pa1Fs). Este efeito se correlaciona com um aumento da atividade de transcrição e dos níveis da proteína p53. No entanto, em células expressando a proteína E7 de papilomavírus bovino tipo 4 (BPV4) ou o genoma total de BPV4, *H-ras* mutado e quercetina não promovem a desaceleração do ciclo celular em G1, permitindo a total transformação maligna. Embora nestas células os níveis da proteína p53 se elevem em resposta a quercetina ou a danos ao DNA, a atividade transcricional desta está inibida (Beniston *et al.*, 2000). Em roedores no entanto, não existe até o momento, investigação de expressão de p53 em tumores induzidos por samambaia ou seus componentes.

Como dito anteriormente, tumores colorretais que se desenvolvem pela “via clássica” apresentam, além de mutações do gene *p53*, mutações ativadoras no gene *K-ras*. Assim, investigamos, por seqüenciamento, os exons 1 e 2 do gene *K-ras* dos tumores de ratos que haviam sido examinados para mutações no gene *p53*. Mais uma vez não encontramos mutações nas regiões examinadas que compreendiam os códons onde mutações ativadoras usualmente ocorrem no gene *K-ras*.

Uma vez que mutações nos códons 61 e 59 do gene *H-ras* haviam sido descritas em íleo de bezerros alimentados com samambaia (Prakash *et al.*, 1996), decidimos também seqüenciar os exons 1 e 2 deste gene nos mesmos tumores já estudados. Não encontramos, no entanto, nenhuma mutação nos códons onde mutações ativadoras são esperadas ocorrer nos genes *ras*. Por outro lado, detectamos duas mutações no exon 2 do gene *H-ras* de quatro adenocarcinomas e de tecido normal de íleo e em um papiloma de bexiga de cinco ratos tratados com o broto de samambaia. A transversão encontrada, C → A implica na troca de um resíduo de Leu por um resíduo de Met no códon 53 e a transição G → A implica em uma troca de Glu por Lis no códon 76. Estas posições não são aquelas onde mutações ativadoras usualmente ocorrem em genes *ras*

e estas alterações provavelmente não provocam modificações conformacionais importantes que possam interferir com as funções da proteína.

Uma transversão A → C no segundo nucleotídeo do códon 61 e diferentes mutações de terceira base no códon 59 do gene *H-ras* de íleo de bezerros alimentados com samambaia foi descrita (Prakash *et al.*, 1996). Em outro estudo, os mesmos pesquisadores (Shahin *et al.*, 1998) encontraram uma mutação de terceira base no códon 58 e uma mutação de primeira base no códon 59 de tecido normal de glândula mamária de ratos tratados com ptaquilosídeo intravenoso, mas não encontraram nenhuma alteração no exon 2 de tumores de glândula mamária de ratos tratados da mesma forma. Entretanto, como as alterações no gene *H-ras* citadas acima foram observadas apenas em tecido normal e não em tumores, não acreditamos que estas estejam relacionadas ao mecanismo carcinogênico da samambaia em ratos.

Anteriormente, Campo *et al.*, (1990) encontraram *H-ras* ativado em carcinomas do canal alimentar superior associado com papilomavírus em gado. No entanto, os autores não encontraram mutações nos exons 1 e 2 do gene *H-ras* destes tumores através de seqüenciamento. É bem estabelecido que a ativação de diversos receptores de superfície celular podem estimular diferentes sinais que convergem para a ativação de genes *ras*. *Ras*, por outro lado, evoca um amplo espectro de respostas celulares mediadas por uma cascata de quinases citoplasmáticas (Shields *et al.*, 2000). A superexpressão de proteínas *Ras* podem imitar o efeito de mutações ativadoras e assim, células superexpressando a proteína *Ras* podem apresentar o fenótipo maligno sem, no entanto, apresentar mutações ativadoras (Barbacid, 1987). O fato de não termos encontrado mutações em genes *ras* sugere que, se houver, o envolvimento dos genes *ras* no desenvolvimento de tumores induzidos pela samambaia em ratos, ocorre por outra via que não mutações de ponto. Podemos apoiar as evidências do envolvimento de diferentes componentes da samambaia, que, associados a outros fatores ambientais (papilomavírus, por exemplo), levam a uma expressão alterada de *ras* e/ou a uma resposta anômala da célula à proteína *Ras* ativada.

Não tendo encontrado mutações nos genes *p53* e *ras* nos tumores induzidos pela samambaia, levantamos a possibilidade de que estes tumores pudessem se

desenvolver pela “via mutadora” ao invés da “via clássica” e decidimos então verificar a ocorrência de instabilidade de microssatélites nestas mesmas amostras.

A instabilidade de microssatélites (MSI) é causada por uma falha no sistema de reparo de erros de pareamento que ocorre durante a replicação do DNA e é caracterizada pelo acúmulo acelerado de mutações de ponto e alterações no tamanho de seqüências de microssatélites. Analisamos 5 locos de microssatélites de ratos em sete das amostras de tumores malignos das quais tínhamos o tecido normal pareado (sete adenocarcinomas de íleo e um carcinoma de bexiga). Os locos IGHE, ADRB2, PRLR e PBPC2 haviam sido analisados em tumores de cólon induzidos por amins heterocíclicas em ratos. Cinco de oito tumores induzidos por 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo-[4,5-b] piridina, apresentaram instabilidade em pelo menos um dos locos acima referidos (Canzian *et al.*, 1994). O loco IVD consiste de uma repetição poli(A) com 20 nucleotídeos, monomórfico (Serikawa *et al.*, 1992), características similares ao loco BAT26 que tem sido proposto como marcador de instabilidade em tumores colorretais humanos (Hoang *et al.*, 1997). Acreditamos, portanto, que estes locos apresentam sensibilidade suficiente para detectar a instabilidade de microssatélites em tumores de ratos que apresentam o “fenótipo mutador”. De acordo com nossas análises, os tumores induzidos pela samambaia em ratos não apresentam MSI.

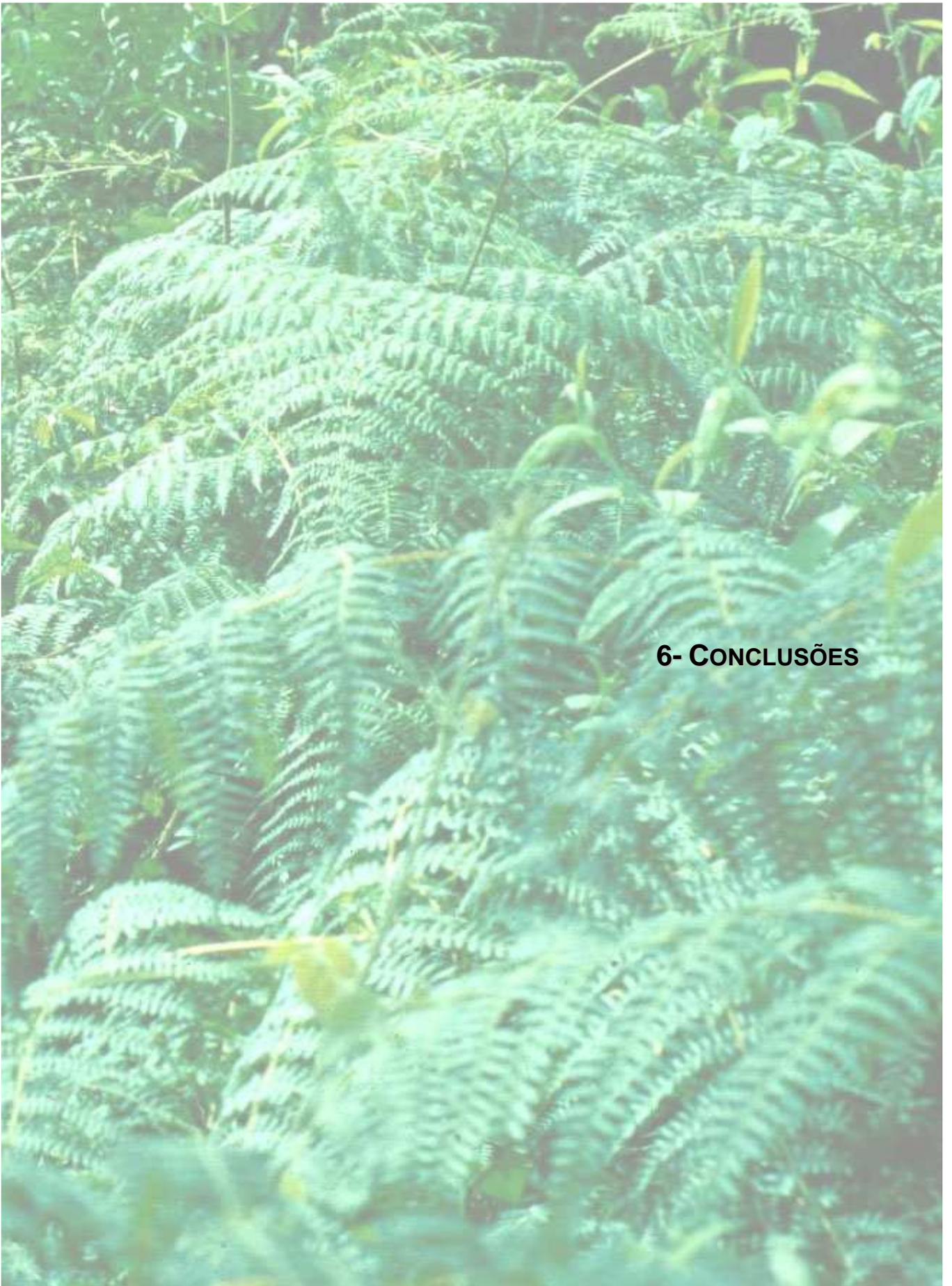
Assim, nossos resultados sugerem que os tumores induzidos pela samambaia não apresentam o “fenótipo mutador”. Existe a possibilidade de que estes tumores se desenvolvam pela chamada “via clássica” e que, embora os genes *p53* e *ras* não apresentem mutações, outros genes, envolvidos nesta via, como *APC* e *DCC* por exemplo, podem estar mutados ou apresentar expressão alterada por hipermetilação. No entanto, não existem dados a este respeito na literatura.

Estudos recentes de instabilidade de tumores têm levado à conclusão de que existem várias e completamente distintas formas de instabilidade genética em células tumorais (Cahill *et al.*, 1999). Uma das mais bem entendidas é aquela que surge da inativação de genes do MMR dando origem aos tumores com MSI. Intrigantemente, tumores com MSI retêm o cariótipo diplóide enquanto que a maioria dos tumores sólidos apresenta uma ampla variação no número de cromossomos, ou aneuploidia. Alguns pesquisadores argumentam que a aneuploidia é uma característica definitiva do câncer e é a forma

predominante de manifestação da instabilidade genética, uma vez que a maioria dos cânceres humanos não apresenta MSI (Perucho, 1996; Duesberg *et al.*, 1998). Estas observações têm levado à sugestão de que cânceres desenvolvem instabilidade tanto ao nível de seqüência (MSI) ou ao nível cromossomal (CIN), mas geralmente não em ambos os níveis (Cahill *et al.*, 1999).

Em gado criado em pastos infestados com samambaia e que desenvolveram tumores digestivos e de bexiga, foram encontradas aberrações cromossômicas em linfócitos como falhas, quebras, fragmentos e rearranjos (Moura *et al.*, 1988). Apesar de nenhum estudo citogenético ter sido ainda realizado em ratos tratados com samambaia, existe a possibilidade de que aberrações cromossômicas ocorram em ratos, podendo ser esta uma via para a instabilidade genética dos tumores induzidos pela samambaia nestes animais.

Em resumo, embora tenhamos utilizado técnicas altamente sensíveis, nenhum marcador molecular foi encontrado em tumores malignos induzidos pela samambaia em ratos. Acreditamos que a continuidade deste trabalho, com atenção dirigida a alterações epigenéticas ao invés de detecção de mutações possa fornecer tais marcadores.



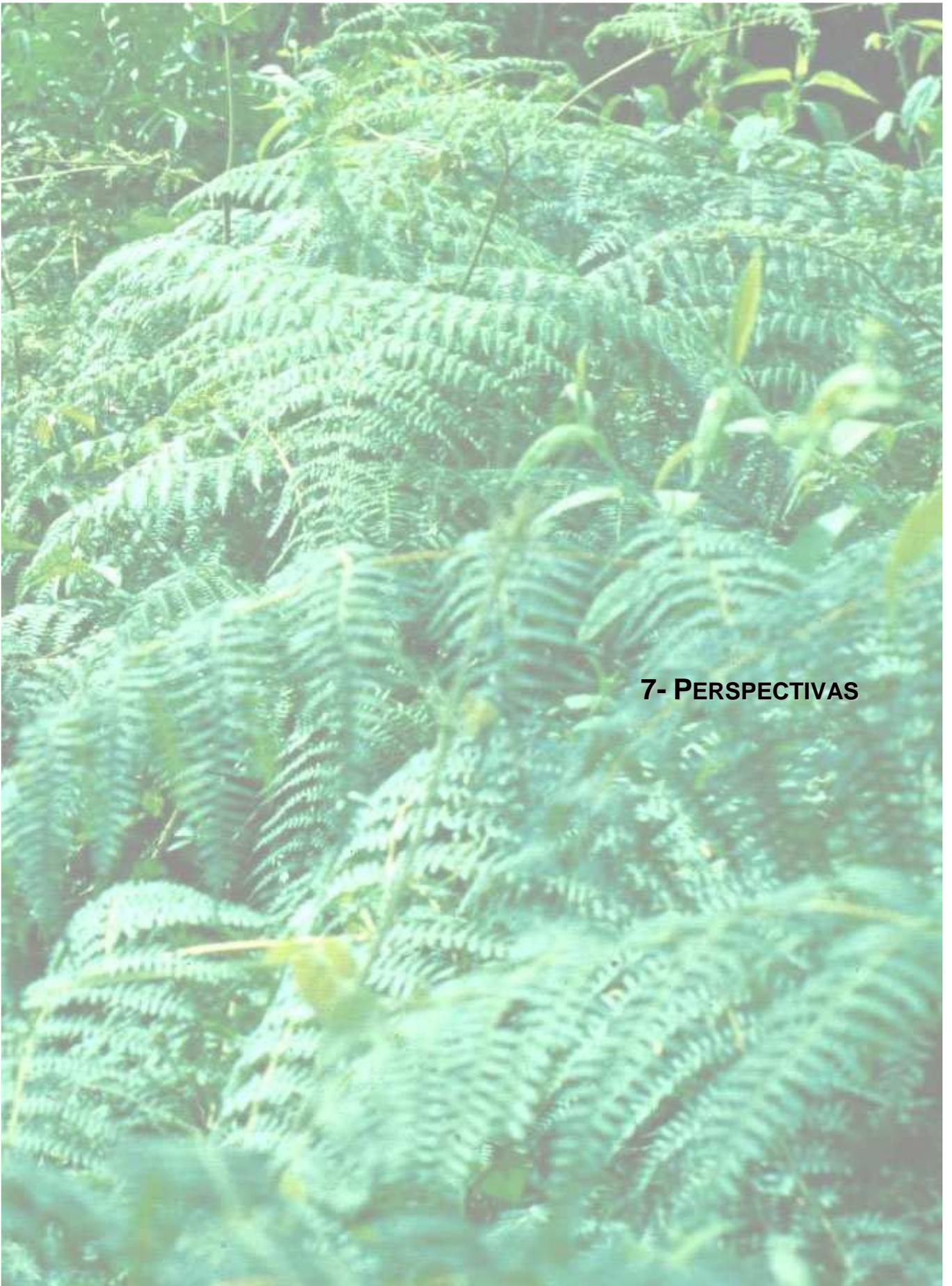
6- CONCLUSÕES

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes partes do mundo apontam fortemente para uma relação entre a exposição direta ou indireta do homem à samambaia ou suas toxinas e um aumento do risco de ocorrência de tumores do trato digestivo superior. No entanto, embora estudos experimentais reforcem os trabalhos epidemiológicos, tais evidências não são suficientes para inequivocamente estabelecer uma relação causal entre a exposição à samambaia e a ocorrência de tumores em humanos. Assim, acreditamos que apenas com o uso de marcadores moleculares apropriados, o risco da exposição humana à samambaia poderá ser acuradamente avaliado.

No presente trabalho investigamos a existência de marcadores moleculares em diferentes estágios da carcinogênese induzida pela samambaia em animais experimentais. Em tecidos normais de ratos e camundongos tratados com samambaia, pesquisamos a presença de adutos de DNA detectáveis pelo método de pós-marcação com ^{32}P . Adutos de DNA não foram detectados em tecidos normais de ratos tratados de diferentes formas, inclusive com protocolos utilizados para indução de tumores nestes animais. Por outro lado, em camundongos, adutos de DNA foram detectados e embora não tenham sido caracterizados, estes adutos apresentaram mobilidade cromatográfica diferente daquela apresentada pelo único aduto formado pelo ptaquilosídeo ativado *in vitro*. Assim, concluímos que outros compostos presentes na samambaia, além do ptaquilosídeo são capazes de induzir adutos de DNA *in vivo* em camundongos e, portanto podem estar contribuindo para as propriedades carcinogênicas da samambaia. O fato de não termos encontrado adutos de DNA nos tecidos de ratos tratados com a samambaia pode ser devido a diferenças entre o conteúdo de toxinas apresentado pelas diferentes subespécies de samambaia utilizadas nos dois trabalhos (*Pteridium aquilinum* x *Pteridium caudatum*) ou, talvez mais provavelmente, devido a diferenças que ratos e camundongos possam apresentar no metabolismo das toxinas da samambaia ou no reparo de lesões de DNA induzidas por estas.

Na segunda parte do trabalho, investigamos a existência de marcadores moleculares em tumores malignos induzidos pela samambaia em ratos. Não identificamos por seqüenciamento, mutações pontuais nos genes *p53* e *ras*, dois genes comumente mutados nos tumores colorretais humanos que se desenvolvem pela chamada “via clássica”. Não identificamos também, nestes tumores, instabilidade de microssatélites, característica fenotípica dos tumores colorretais que se desenvolvem pela chamada “via

mutadora”. Assim, concluímos que os tumores induzidos por samambaia em ratos não se desenvolvem pela “via mutadora” e que mutações em outros genes supressores de tumores ou oncogenes da “via clássica” possam estar ocorrendo. Levantamos também a hipótese de que marcadores moleculares de tumores induzidos pela samambaia possam estar relacionados a eventos epigenéticos como metilação alterada de regiões promotoras de genes relacionados ao câncer.



7- PERSPECTIVAS

7.1- Curto prazo:

7.1.1- Dar continuidade à coleta de amostras de tumores de esôfago e estômago de indivíduos que relatam o consumo crônico de broto de samambaia na região de Ouro Preto.

7.1.2- Iniciar estudos moleculares em tumores de esôfago e estômago de indivíduos que relatam o consumo crônico de broto de samambaia em amostras já coletadas.

7.1.3- Verificar a possível ocorrência de alterações em padrões de metilação de regiões promotoras de genes relacionados a câncer em tumores malignos de ratos induzidos pela samambaia e em tumores humanos citados acima, através de MSP (methylation specific PCR).

7.1.4- Realizar testes de mutagenicidade com cepas de *E. coli* CC101, CC102, CC103, CC104, CC105 e CC106 tratadas com extratos obtidos do broto de samambaia para caracterizar o(s) tipo(s) de mutações induzidas.

7.2- Médio prazo:

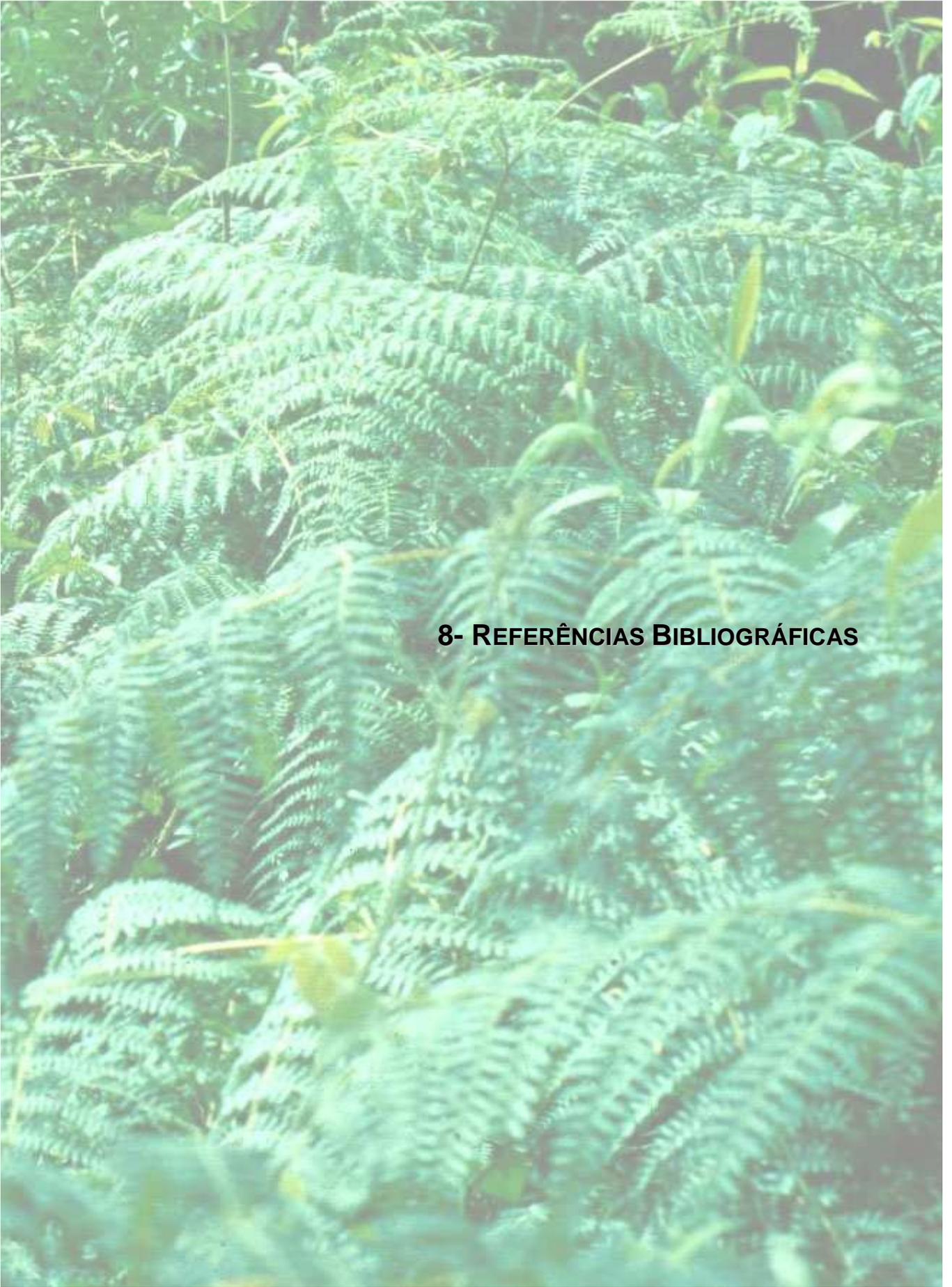
7.2.1- Testar a carcinogenicidade da samambaia coletada na região de Ouro Preto no modelo camundongo e realizar estudos moleculares de tumores malignos.

7.2.2- Identificar e caracterizar adutos formados em camundongos pelo tratamento com samambaia coletada na região de Ouro Preto.

7.2.3- Desenvolver metodologia para detecção e validar biomarcadores da exposição ao ptaquilosídeo para uso em estudos epidemiológicos nos quais a associação entre consumo de samambaia e o risco de desenvolvimento de câncer será examinado. Entre os biomarcadores candidatos encontram-se adutos de DNA e de proteínas, metabólitos do ptaquilosídeo excretados na urina.

7.3- Longo prazo:

7.3.1- Realizar estudo epidemiológico prospectivo com o uso de marcadores biológicos e/ou moleculares para verificar a associação entre consumo de samambaia e o risco de desenvolvimento de câncer em humanos.

A photograph of a dense thicket of green ferns in a forest setting. The ferns are the dominant feature, with their intricate, feathery fronds filling most of the frame. The lighting is natural, highlighting the vibrant green of the leaves. In the center of the image, the text "8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS" is overlaid in a bold, black, sans-serif font.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- Aaltonen L.A., Peltomaki P., Leach F.S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.P., Jarvinen H., Powell S.M., Jen J. and Hamilton S.R. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**: 812-816.
- Aaltonen L.A., Salovaara R., Kristo P., Canzian F., Hemmink A., Peltomaki P., Chadwick R.B., Kaariainen H., Eskelinen M., Jarvinen H., Mecklin J.P., de la Chapelle A. (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *New England Journal of Medicine*, **338**: 1481-1487.
- Ahmadian M.R., Wiesmuller L., Lautwein A., Bischoff F.R., Wittinghofer A. (1996) Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120GAP and neurofibromin. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 16409-16415.
- Ahuja N., Li Q., Mohan A.L., Baylin S.B. and Issa J.J.P. (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Research*, **58**: 5489-5494.
- Albrechtsen N., Dornreiter J., Grosse F., Kim E., Wiesmuller L., Deppert W. (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, **18**: 7706-7717.
- Alonso-Amelot M.E. and Avendano M. (2001) Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: An epidemiologic study. *International Journal of Cancer*, **91**: 252-259.
- Alonso-Amelot M.E, Castillo U, Smith BL and Lauren DR (1996) Bracken ptaquiloside in milk. *Nature*, **382**: 587.
- Ames B.N. (1979) Identifying Environmental Chemicals causing mutations and cancer. *Science*, **204**: 587-593.
- Antequera F., Boyes J. and Bird A. (1990) High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, **62**: 503-514.
- Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M., vanTuinen P., Ledbetter D.H., Barker D.F., Nakamura Y., et al (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**: 217-221.
- Balmain A., Ramsden M., Bowden G.T. and Smith J. (1984) Activation of the mouse cellular Harvey ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, **307**: 658-660.

-
- Barbacid M. *In: De Vita V., Hellman S. and Rosenberg S. (eds.) Important Advances in Oncology*, pp. 3-22. Philadelphia: Lippincott, 1985.
- Barbacid M. (1987) *ras Genes*. Annual Review of Biochemistry, **56**: 779-827.
- Barbarella G., Tugnoli V. and Zambianchi M. (1991) Imidazole ring opening of 7-methylguanosine at physiologic pH. Nucleosides and Nucleotides, **10**: 1759-1769.
- Bargonetti J., Manfredi J.J., Chen X., Marshak D.R. and Prives C. (1993) A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. Genes Development, **7**: 2565-2574.
- Baylin S.B., Herman J.G., Herman J.R., Vertino P.M. and Issa J.P. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Advances in Cancer Research, **72**: 141-196.
- Beach, A.C and Gupta, R.C. (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. Carcinogenesis, **7**: 1053-1074.
- Beniston, R.G., Morgan, I.M., O'Brien, V., Campo, M.S. (2001) Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. Carcinogenesis, **22**: 1069-1073.
- Bjeldanes L.F. and Chang G.W. (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. Science, **197**: 577- 578.
- Berenblum I. (1981) Cancer prevention as a realizable goal. Cancer, **47**: 2346-2348.
- Bhattacharyya N.P., Skandalis A., Ganesh A., Groden J., Meuth M. (1994) Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A, **91**: 6319-6323.
- Bizub D., Wood A.W., Skalka A.M. (1986) Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A, **83**: 6048-6052.
- Bootsma D., Kraemer K.H., Cleaver, J.E. and Hoeijmakers J.H.J. *In: Kinzler K.W. and Vogelstein B. (eds.) The Genetics Basis of Human Cancer*, pp 245-274. McGraw-Hill, New York, 1998.

- Bos J.L., Toksoz D., Marshall C.J., Verlaan-de Vries M., Veeneman G.H., van der Eb A.J., van Boom J.H., Janssen J.W., Steenvoorden A.C. (1985) Amino-acid substitutions at codon 13 of the *N-ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, **315**: 726-730.
- Bressac B., Kew M., Wands J. and Ozturk M. (1991) Selective G to T mutations of *p53* gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, **350**: 429 - 431.
- Bronner C.E. (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, **368**: 258-261.
- Brown R., Marshall C.J., Pennie S.G., Hall A. (1984) Mechanism of activation of an *N-ras* gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *EMBO Journal*, **3**: 1321-1326.
- Bryan, G.T. and Pamukcu, A.M. Sources of carcinogens and mutagens in edible plants: production of urinary bladder and intestinal tumors by bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *In*: Stich H.F. (ed.) *Carcinogens and Mutagens in the Environment*, Vol. **1**, pp. 75-82. Boca Raton, FL, CRC Press.1982.
- Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B. and Lengauer C. (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in Cell Biology*, **9**: M57-M60.
- Campo M. S., McCaffery R. E., Doherty I., Kennedy I. M. and Jarret W.F. The Harvey ras gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. *Oncogene*, **3**: 303-308, 1990.
- Campo M.S., Beniston R.G., Connoly J.A. and Grindlay G.J. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. *In*: J.A Taylor and R.T Smith (eds) *Bracken fern: toxicity, biology and control*, pp 116-122. International Bracken Group, Special Publication no. **4**, 2000.
- Campos Neto O., Barros H.M., Bicudo, P.L. Estudo do carcinoma do trato digestivo superior e da hematuria enzoótica dos bovinos na região de Botucatu, São Paulo. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*, v.27, p.125-139, 1975.
- Canitrot Y., Frechet M., Servant L., Cazaux C. and Hoffmann J.S. (1999) Overexpression of DNA polymerase β : a genomic instability enhancer process. *FASEB Journal*, **13**: 1107-1111.

- Canzian F., Ushijima T., Serikawa T., Wakabayashi K., Sugimura T. and Nagao M. Instability of microsatellites in rat colon tumors induced by heterocyclic amines. *Cancer Research*, **54**: 6315-6317, 1994.
- Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P., Hayflick J.S., Edman U., Levinson A.D., Goeddel D.V. (1983) Activation of *Ki-ras2* gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature*, **304**: 507-513.
- Caron de Fromentel C. and Soussi T. (1992) *TP53* tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, **4**: 1-15.
- Castillo U.F., Ojika M., Alonso-Amelot M. and Sakagami Y. (1998) Ptaquiloside Z, a new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Bioorganic Medical Chemistry*, **6**: 2229-22333.
- Castillo U.F., Sakagami Y.A-A.M and Ojika M. (1999) Pteridanoside, the first protoilludane sesquiterpene glucoside as a toxic component of the neotropical bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Tetrahedron*, **55**: 12295-12300.
- Castillo U.F., Wilkins A.L., Lauren, D.R., Smith, B.L., Towers N.R., Alonso-Amelot M.E. and Jaimes-Espinoza R. (1997) Isoptaquiloside and caudatoside, illudane-type sesquiterpene glucosides from *Pteridium aquilinum* var *caudatum*. *Phytochemistry*, **44**: 901-906.
- Chipperfield R.G., Jones S.S., Lo K.M., Weinberg R.A. (1985) Activation of *Ha-ras* p21 by substitution, deletion, and insertion mutations. *Molecular Cell Biology*, **5**: 1809-1813.
- Clairmont C.A. and Sweasy J.B. (1996) Dominant negative rat DNA polymerase α mutants interfere with base excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **178**: 656-661.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **69**: 2110.
- Connolly J.A., Morgan I.M., Jackson M.E., Campo M.S. (1998) The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. *Oncogene*, **16**: 2739-2746.

- Cooper D.P., O'Connor P.J., Povey A.C. and Rafferty J.A. Cell and molecular mechanisms in chemical carcinogenesis. *In*: Peckam M, Pinedo H and Veronesi U. (eds.) Oxford Textbook of Oncology.vol 1, pp 135-147. Oxford University Press, Oxford, 1995.
- Cotelle N., Bernier J-L., Catteau J-P., Pommery J., Wallet J-C. and Gaydou E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biological Medicine* **20**: 35-43.
- Cotton R.G.H. Scanning methods. *In*: Mutation Dtection pp 45-58. Oxford University Press, Oxford,1997.
- Currial O. Hematúria enzoótica dos bovinos. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná, v.8, p. 157-182, 1965.
- DeFeo D., Gonda M.A., Young H.A., Chang E.H., Lowry D.R., Scolnick E.M. and Ellis W. (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **78**: 3328-3332.
- DeFeo-Jones D., Tatchell K., Robinson L.C., Sigal I.S., Vass W.C., Lowy D.R., Scolnick E.M. (1985) Mammalian and yeast ras gene products: biological function in their heterologous systems. *Science*, **228**: 179-184.
- Der C.J., Finkel T., Cooper G.M. (1986) Biological and biochemical properties of human *rasH* genes mutated at codon 61. *Cell*, **44**: 167-176.
- De Weerd-Kastelein E.A., Keijzer W. and Bootsma D. (1972) Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. *Nature: New Biology*, **238**: 80-83.
- Dhar R., Ellis R.W., Shih T.Y., Oroszlan S., Shapiro B., Maizel J., Lowy D., Scolnick E. (1982) Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science*, **217**: 934-936.
- Dipple A., Moschel R.C., Pgott M.A. and Tondeur Y. (1985) Acid lability of the hydrocarbon-dexyribonucleoside linkages in 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene - modified deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **24**: 2291-2298.
- Dobereiner J., Tokarnia H.C., Canella C.F.C. Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.2, pp. 489-504., 1967.

-
- Dobrovic A. and Simpfendorfer D. (1997) Methylation of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. *Cancer Research*, **57**: 3347-3350.
- Doerge D.R., Yi P., Churchwell M.I., Preece S.W., Langridge J. and Fu P.P. (1998) Mass spectrometric analysis of 2-deoxyribonucleoside and 2'-deoxyribonucleotide adducts with aldehydes derived from lipid peroxidation. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **12**: 1665-1672.
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr, Butel J.S., Bradley A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**: 215-221.
- Duesberg P., Rausch C., Rasnick D. and Hehlmann R. (1998) Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **95**: 13692-13697.
- Dunn B.P. and San R.C.H. (1988) HPLC enrichment of hydrophobic DNA-carcinogen adducts for enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis*, **9**: 1055-1060.
- Eadie J.S., Conrad M., Toorchen D., Topal M.D. (1984) Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine. *Nature*, **308**: 201-203.
- Ellis R.W., Defeo D., Shih T.Y., Gonda M.A., Young H.A., Tsuchida N., Lowy D.R. and Scolnick E.M. (1981) The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature*, **292**: 506-511.
- Eshelman J.R., Lang E., Bowerfind G., Parsons R., Vogelstein B., Willson J., Veigl M., Sedwick W., Markowitz S. (1995) Increased mutation rate at the *hprt* locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*, **10**: 33-37.
- Evans I.A. Bracken Carcinogenicity. *In*: Searle C.E. (ed) *Chemical Carcinogens*. 2 ed. ACS Monograph **182**, Vol. 2, pp 1171-1204. University of Birmingham, England, 1984.
- Evans I.A. (1987) Bracken carcinogenicity. *Reviews in Environmental Health*, **7**: 161-99.
- Evans I.A. and Mason J. (1965) Carcinogenic activity of bracken. *Nature*, **208**: 913-914.

- Evans I.A., Jones R.S. and Mainwaring-Burton R. (1972) Passage of bracken fern toxicity into milk. *Nature*, **237**: 107-108.
- Fasano O., Aldrich T., Tamanoi F., Taparowsky E., Furth M., Wigler M. (1984) Analysis of the transforming potential of the human H-ras gene by random mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **81**: 4008-4012.
- Feramisco J.R., Clark R., Wong G., Arnheim N., Milley R., McCormick F. (1985) Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. *Nature*, **314**: 639-642.
- Fishel R., Lescoe M.K., Rao M.R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Garber J., Kane M., Kolodner R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, **75**: 1027-1038.
- Formica J.V. and Regelson W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*, **33**: 1061-1080.
- Friedberg E., Walker G.C. and Siede W. DNA repair and mutagenesis. ASM press: Washington, D.C., 1995.
- Galpin O.P., Whitaker C.J., Whitaker R.L. and Kassaab J.Y. (1990) Gastric cancer in Gwynedd: possible links with bracken. *British Journal of Cancer*, **61**: 737-740.
- Gardiner-Garden M. and Frommer M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, **196**: 261-282.
- Gentil A., Cabral Neto J.B., Mariage Samson R., Margot A., Imbach J.L., Rayner B. and Sarasin A. (1992) Mutagenicity of a unique apurinic/apyrimidinic site in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, **227**: 981-984.
- Gibbs J.B., Sigal I.S., Poe M., Scolnick E.M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **81**: 5704-5708.
- Gilman A.G. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, **36**: 577-579.
- Gliessman S.R. (1976) Allelopathy in a broad spectrum of environments as illustrated by bracken. *Botanic Journal Linn. Society*, **73**: 95-104.

- Greenblast M.S., Bennet W.P., Hollstein M., Harris C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, **54**: 4855-4878.
- Goelz S.E., Vogelstein B., Hamiltos S.R. and Feinberg A.P. (1985) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, **228**: 187-190.
- Gupta R.C. (1985) Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen:DNA adducts. *Cancer Research*, **45**: 5656-5662.
- Gupta R.C. ³²P-Postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. *In*: Phillips D.H., Castegnaro M. and Bartsch H. (eds) *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*. IARC Scientific Publications n° **124** pp. 11-23. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 1993.
- Gupta R.C. and Early K. (1988) ³²P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis*, **9**: 1687-1693.
- Haque K., Cooper D.P., Van Delft J.H.M., Lee S.L. and Povey A.C. (1997) Accurate and sensitive quantitation of N7-methyldeoxyguanosine-3 -monophosphate by ³²P-postlabeling and storage-phosphor imaging. *Chemical Research and Toxicology*, **10**: 660-666.
- Harris C.C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Research*, **51**: 5023s – 5044s.
- Harris C.C. (1993) *p53*: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, **262**: 1980-1981.
- Harris C.C. (1985) Future directions in the use of DNA adducts as internal dosimeters for monitoring human exposure to environmental mutagens and carcinogens. *Environmental Health Perspectives*, **62**:185-191.
- Hartmann A., Blaszyk H., Kovach J.S., Sommer S.S. (1997) The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends in Genetic*, **13**: 27-33.
- Hartwell L. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, **71**: 543-546.

- Hemminki K., Szyfter K. and Kadublar F.F. (1991) Quantitation of the ^{32}P -postlabeling reaction using cyclic N1,N² and C8 modified deoxyguanosine-3'-monophosphates as substrates. *Chemical-Biology Interactions*, **77**: 51-61.
- Henderson R.F., Bechtold W.E., Bond J.A. and Sun J.D. (1989) The use of biochemical markers in toxicology. *CRC Critical Review in Toxicology*, **20**: 65-82.
- Hennings H., Shores R., Wenk M.L., Spangler E.R., Tarone R. and Yuspa S.H. (1983) Malignant conversions of mouse skin tumors is increased by tumors initiators and inactivated by tumors promoters. *Nature*, **304**:67-69.
- Herman J.G., Latif F., Weng Y., Lerman M.I. Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D-S.R, Gnarr J.R., Linehan W.M. and Baylin S.B. (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **91**: 9700-9704.
- Herman J.G., Jen J., Merlo A. and Baylin S.B. (1996) Hypermethylation associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Research*, **54**: 722-727.
- Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz J.K., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B. (1998) Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **98**: 6870-6875.
- Hethcote H.W. and Knudson A.G.I.R (1978) Model for the incidence of embryonal cancers: Application to retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **75**: 2453-2457.
- Hiltunen M.O., Alhonen L., Koistinaho J., Myohanen S., Paakkonen M., Marin S., Kosma V.M. and Janne J. (1997) Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *International Journal of Cancer*, **70**: 644-648.
- Hindges R. and Hubscher U. (1995) Production of active mouse DNA polymerase delta in bacteria. *Gene*, **158**: 241-246.
- Hirayama T. (1979) Diet and Cancer. *Nutrition and Cancer*, **1**: 67-81.

- Hirono I., Yamada K., Niwa N., Shizuri M., Ojika M., Hasaka S., Yamaji T., Wakamatsu K., Kigashi H., Nuyama K., Uosakki Y. (1984) Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. *Cancer Letters*, **21**: 239-246.
- Hirono I., Ojino H., Fujimoto M., Yamada K., Yoshida Y., Igawa M. and Okumura M. (1987) Induction of tumours in ACI rats given a diet containing ptaquiloside, a bracken carcinogen. *Journal of the National Cancer Institute*, **79**: 1143-1149.
- Hirono I., Ushimaru Y., Kato K., Mori H. and Sasaoka I. (1978) Carcinogenicity of boiling water extract of bracken, *Pteridium aquilinum*. *Gann*, **69**: 383-388.
- Hoang J.M., Cottu P.H., Thuille B., Salmon R.J., Thomas G. and Hamelin R. (1997) Bat-26, na indicator of the replication error phenotype in colorectal cancer and cell lines. *Cancer Research*, **57**: 300-303.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **5**: 49-53.
- Horsfall, M.J., Gordon, A.J., Burns, P.A., Zielenska, M., van der Vliet, G.M. and Glickman, B.W. (1990). Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **15**: 107-122.
- Hsu I.C., Metcalf R.A., Sun T., Welsh J., Wang N.J., Harris C.C. (1991) p53 gene mutational hotspot in human hepatocellular carcinomas from Qidong, China. *Nature*, **350**: 427-428.
- Hyland J.K., Rogers C.M., Scolnick E.M., Stein R.B., Ellis R., Baserga R. (1985) Microinjected ras family oncogenes stimulate DNA synthesis in quiescent mammalian cells. *Virology*, **141**: 333-336.
- IARC An evaluation of chemicals and industrial processes associated with cancer in humans based on human and animal data. *In: IARC Monographs*, vol **1-20**. Lyon, 1980.
- IARC Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents. *In: IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furoumarins and ultraviolet radiation*, vol. **40**, pp.47-65. Lyon, 1986.
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D. and Perucho M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, **363**: 558-561.

-
- Ishidate M. Data Book on Chromosomal Aberration Tests In Vitro. Amsterdam: Elsevier, 1988.
- Ishikawa M., Okada F., Hamada J., Hosokawa M. and Kobayashi A. (1987) Changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cells treated with quercetin or 5-azacytidine. *International Journal of Cancer*, **39**: 338-341 .
- Jacoby R.F., Llor X., Teng B.B., Davidson N.O. and Brasitus T.A. (1991) Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *Journal of Clinical Investigation*, **87**: 624-630.
- Jarret W.F.H., McNeil P.E., Gremshaw W.T.R. (1978) High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. *Nature*, **274**: 215-217.
- Jackson M.E., Campo M.S. and Gaukroger J.M. (1993) Cooperation between papillomavirus and chemical cofactors in oncogenesis. *Critical Review in Oncogenes* **4**: 277-291.
- Johnson R.E., Prakash S. and Prakash L. (1999) Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 15975-15977.
- Jones P.A. and Laird P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetic*, **21**: 163-166.
- Kadulbar F.F., Beranek D.T., Weis C.C., Evans F.E., Cox R. and Irving C.C. (1984) Characterisation of the purine ring-opened 7-methylguanine and its persistence in rat bladder epithelial DNA after treatment with the carcinogen *N*-methylnitrosourea. *Carcinogenesis*, **5**: 587-592.
- Kane M.F., Loda M., Gaida G.M., Lipman J., Mishra R., Goldman H., Jessup J.M., Kolodner R. (1997) Methylation of *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, **57**: 808-811.
- Khosravi-Far R., Der C.J. (1994) The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Review*, **13**: 67-89.

- Knudsen A.G. (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, **45**: 1437-1443.
- Kolodner R. (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Development*, **10**: 1433-1442.
- Kumar V., Sukumar S. and Barbacid M. (1990) Activation of *ras* oncogene preceding the onset of neoplasia. *Science*, **248**: 1101-1104.
- Kushida T., Uesugi M., Sugiura Y., Kigoshi H., Tanaka H., Hirokawa J., Ojika M. and Yamada K. (1994) DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. *Journal of American Chemical Society*, **116**: 479-486.
- Lavigueur A., Maltby V., Mock D., Rossant J., Pawson T., Bernstein A. (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Molecular Cell Biology*, **9**: 3982-3991.
- Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**: 643-649.
- Levine A.J. (1993) The tumor suppressor genes. *Annual Review of Biochemistry*, **62**: 623-651.
- Levine A.J., Momand J., Finlay C.A. (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **6**: 453-456.
- Li E., Beard C. and Jaenisch R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, **366**: 362-365.
- Li F.P. (1988) Cancer families: human models of susceptibility to neoplasia - the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Research*, **48**: 5381-5386.
- Li F.P., Fraumeni J.F. Jr, Mulvihill J.J., Blattner W.A., Dreyfus M.G., Tucker M.A., Miller R.W. (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Research*, **15**: 5358-5362.
- Lindahl T. (1982) DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, **51**: 61-87.

-
- Lindblom A., Tannergard P., Werelius B. and Nordenskjold M. (1993) Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature Genetic*, **5**: 279-282.
- Liu B., Parsons R., Papadopoulos N., Nicolaidis N.C., Lynch H.T., Watson P., Jass J.R., Dunlop M., Wyllie A., Peltomaki P., de la Chapelle A., Hamilton S.R., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1996) Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature Medicine*, **2**: 169-174.
- Loeb L.A. (1985) Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell*, **40**: 483-484.
- Loeb L.A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Research*, **51**: 3075-3079.
- Loeb K.R. and Loeb A.L. (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, **21**: 379-385.
- Loechler E.L., Green C.L., Essigmann J.M. (1984) In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **81**: 6271-6275.
- Ludlum, D.B. Alkylating agents and the nitrosoureas. In: Becker, F.F. (ed.) *Cancer, A comprehensive Treatise*, vol. 5. pp. 285-307. Plenum Press, 1977.
- Lutz W.K. (1986) Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*, **112**: 85-91.
- Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F. Jr, Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A., et al (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, **250**: 1233-1238.
- Margison, G. and O'Connor, P. Biological consequences of reactions with DNA: role of specific lesions. In: Cooper C.S. and Grover P.L. (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. **941**, pp. 547-571. Springer-Verlag: Berlin, 1990.
- Marlière A.C., Santos R.C., Galvão M.A.M., Silva M.L.C., Kawamoto M., Castro M.C.F.M., Soares J.F, Von Krueger E.R. Barreto J.M.A. & Gomes R.Q.F. Gastric and oesophageal cancer related to bracken ingestion: a case control study from Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. In: Smith R.T. and Taylor J.A. (eds.) *Bracken: an environmental issue*. International Bracken Group Special Publication no. **2**. pp. 99-101, 1995.

- Marshall C.J., Vousden K.H. and Philips D.H. (1984) Activation of c-Ha-ras-1 proto-oncogene by *in vitro* modification with a chemical carcinogen, benzo[a]pyrene diol-epoxide. *Nature*, **310**: 586-589.
- Marshall C.J. *In*: Teich R.N., Varmus H., Coffin J. (eds.) *RNA Tumor Viruses*, 2nd ed, vol. **2**, pp. 487-558. Cold Spring Harbor Lab., 1985.
- Maruta A., Enaka K. and Umeda M. (1979) Mutagenicity of quercetin and kaempferol on cultured mammalian cells. *GANN*, **70**: 273-276.
- McGrath J.P., Capon D.J., Smith D.H., Chen E.Y., Seeburg P.H., Goeddel D.V., Levinson A.D. (1983) Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature*, **304**: 11-17.
- Memisoglu, A. and Samson, L. (1996). DNA repair functions in heterologous cells. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*, **31**: 405-447.
- Miller E.C. and Miller J.A. (1981) Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, **47**: 2327-2345.
- Modrich P. and Lahue R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry*, **65**: 101-133.
- Montesano, R. (1981) Alkylation of DNA and tissue specificity in nitrosamine carcinogenesis. *Journal Supramolecular Structural Cell Biochemistry*, **17**: 259-273.
- Moura J.W., Stocco dos Santos R.C., Dagli M.L.Z., D`Angelino J.L., Birgel E.H. and Beçak W. (1988) Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia*, **44**: 785-788.
- Mulcahy L.S., Smith M.R., Stacey D.W. (1985) Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, **313**: 241-243.
- Nakayasu M., Sakamoto H., Terada M., Nagao M. and Sugimura T. (1986) Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutation Research*, **174**, 79-83.
- Nelson M.A., Futscher B.W., Kinsella T., Wymer J. and Bowden G.T. (1992) Detection of mutant *Ha-ras* genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the

development of benign tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, **89**: 6398-6402.

Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P., et al (1989) Mutations in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. Nature, **7**: 705-708.

Niwa H., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Hirono I. and Matsushita K. (1983) Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*). Tetrahedron Letters, **24**: 4117-4120.

Noda M., Ko M., Ogura A., Liu D.G., Amano T., Takano T. and Ikawa Y. (1985) Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. Nature, **318**: 73-75.

O'Brien S.J. Genetics Maps. pp. 1-584. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab., 1984.

Ohgaki H., Kleihues P. and Hard G.C. (1991) Ki-ras mutations in spontaneous and chemically induced renal tumors of the rat. Molecular Carcinogenesis, **4**: 455-459.

Ojika M., Wakamatsu K., Niwa H. & Yamada K. (1987) Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *laticulum*. Structure elucidation based on chemical and spectral evidence and reactions with amino acids, nucleosides and nucleotides. Tetrahedron, **43**: 5261-5274.

Ojika M., Sugimoto K., Okazaki T. and Yamada K. (1989) Modification and cleavage of DNA by ptaquiloside. A new potent carcinogen isolated from bracken fern. Chemical Society Chemistry Communication, 1775-1777.

Page C.N. (1976) The taxonomy and phytogeography of bracken – a review. Botanic Journal Linn. Society, **73**: 1-34.

Pamucku A.M. (1955) Investigations on the pathology of enzootic bovine hematuria in Turkey. Zentralbl. Veterinarmed, **2**: 409-429.

Pamucku A.M. (1963) Epidemiologic studies on urinary bladder tumors in turkish cattle. Annals of the New York Academy of Sciences, **108**: 938-947.

-
- Pamukcu A.M., Erturk E., Yalciner U., Milli U. and Bryan, G.T. (1978) Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilim*). *Cancer Research*, **38**: 1556-1560.
- Pamukcu A.M., Yalciner S., Hatcher J.F. and Bryan G.T. (1980) Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, **40**: 3468-3472.
- Panning B. and Jaenisch R. (1998) RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell*, **93**: 305-308.
- Parenti A.R., Rugge M., Frizzera E., Ruol A., Noventa F., Ancona E. and Ninfo V. (1995) p53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *American Journal of Surgery and Pathology*, **19**: 1418-22.
- Parsons R. (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, **75**: 1227-1236.
- Peltomaki P., Aaltonen L.A., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.P., Jarvinen H., Green J.S., Jass J.R., Weber J.L., Leach F.S., et al. (1993) Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*, **260**: 810-812.
- Peltomaki P. and de la Chapelle A. (1997) Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Advances in Cancer Research*, **71**: 93-119.
- Perera F.P. (1987) Molecular cancer epidemiology: a new tool in cancer prevention. *Journal of National Cancer Institute*, **78**: 887-898.
- Perera F.P. (1988) The significance of DNA and proteins adducts in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, **205**: 255-269.
- Perucho M. (1996) Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biological Chemistry*, **377**: 675-684.
- Pfeifer G.P. and Holmquist G.P. (1997) Mutagenesis in the P53 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**: M1-M8.
- Poirier M.C. (1984) The use of carcinogen-DNA adduct antisera for quantitation and localization of genomic damage in animal models and the human population. *Environmental Mutagenesis*, **6**: 879-887.

-
- Potter D.M and Pitman R.M. The extraction and characterization of carcinogens from bracken and the effect of composting. *In*: Smith R.T. and Taylor J.A. (eds.) Bracken: an environmental issue. International Bracken Group Special Publication no. **2**, pp. 110-115, 1995.
- Potter M. (1963) Percivall Pott's contribution to cancer research (including a reproduction of Pott's original article). National Cancer Institute Monographs, **10**: 1-13.
- Povey A.C., Potter D. and O'Connor P.J. (1996) ³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the upper gastrointestinal tissue of mice fed bracken extract or bracken spores. *British Journal of Cancer*, **74**: 1342-1348.
- Prakash A.S., Pereira T.N., Smith B.L., Shaw G. and Seawright A.A. (1996) Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Natural Toxins*, **4**: 221-227.
- Rahman A., Shahabuddin S.M.H. and Parish J.H. (1990) Complexes involving quercetin, DNA and Cu(II). *Carcinogenesis*, **11**: 2001-2003 .
- Randerath K., Reddy M.V. and Gupta R.C. (1981) ³²P-Labeling test for DNA damage. *Biochemistry*, **78**: 6126-6129.
- Rastogi P. and Levin R. (1987) Induction of sperm abnormalities in mice by quercetin. *Environmental Mutagenesis*, **9**: 79-86.
- Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E., Barbacid M. (1982) A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, **300**: 149-52.
- Reddy M.V. (1991) Nuclease S1-mediated enhancement of the ³²P-postlabeling assay for aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **12**: 1745-1748.
- Reddy M.V., Gupta R.C. and Randerath K. (1981) ³²P-Base analysis of DNA. *Analytic Biochemistry*, **117**: 271-279.
- Reddy M.V., Irvin T.R. and Randerath K. (1985) Formation and persistence of sterigmatocystin-DNA adducts in rat liver determined via ³²P-postlabeling analysis. *Mutation Research*, **152**: 85-96.

- Reddy M.V. and Randerath K. (1986) Nuclease P1- mediated enhancement of sensitivity of ^{32}P -postlabelling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, **7**: 1543-1551.
- Redmond Jr D.E. (1970) Tobacco and cancer: The first clinical report,1761. *New England Journal of Medicine*, **282**: 18-23.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicine* **20**: 933-956.
- Rosemberger G., Heecheen W., Adlerfarn H. (1960) (*Pteris aquilina*) die ursache des sog stallrottes der rinder (hematuria vesicalis bovis chronica) *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **67**: 201-208.
- Ruas M. and Peters G. (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1378**: F115-F177.
- Ruddon R.W. Causes of Cancer. *In: Cancer Biology*. Cap. 6, pp:231-276. Oxford University Press, 1995.
- Rymer L. (1976) The history and ethnobotany of bracken. *Botanic Journal of Linn. Society*, **73**: 151-176.
- Saffhill R., Margison G.P. and O'Connor P.J. (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, **823**: 111-145.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2^o ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- Sankila R., Aaltonen L.A., Järvinen H.J. and Mecklin J-P (1996) Better survival rates in patients with *MLH1*-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology*, **110**: 682-687.
- Santos R.C., Brasileiro-Filho G., Hojo E.S. (1987) Induction of tumours in rats by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) from Ouro Preto (Minas Gerais, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **20**: 73-77.
- Santos R. C., Brasileiro-Filho G., and Silva, M.E. Oncogenicity of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) from Ouro Preto, Brazil, for rats fed low animal protein diets. *In: Bracken*

- Biology and Management. Thomson J.A. and Smith R.T. (eds.), Australian Institute of Agricultural Science pp. 253-257. Sydney, 1990.
- Santos R.C., Brasileiro-Filho G., Silva M.E. (1992) Tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **12**: 72-76.
- Satoh T, Kaziro Y. (1992) Ras in signal transduction. *Seminars in Cancer Biology* **3**: 169-177.
- Scherer E. (1984) Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **738**: 219-236.
- Schulte P.A. (1989) A conceptual framework for the validation and use of biologic markers. *Environmental Research*, **48**: 129-144.
- Scolnick E.M., Papageorge A.G., Shih T.Y. (1979) Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **76**: 5355-5359.
- Seeburg P.H., Colby W.W., Capon D.J., Goeddel D.V., Levinson A.D. (1984) Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature*, **312**: 71-75.
- Sekowski J.W., Malkas L.H., Schnaper L., Bechtel P.E., Long B.J. and Hickey R.J. (1998) Human breast cancer cells contain an error-prone DNA replication apparatus. *Cancer Research*, **58**: 3259-3263.
- Serikawa T., Kuramoto T., Hilbert P., Mori M., Yamada J., Dubay C.J., Lindpainter K., Ganten D., Guénet J.L., Lathrop G.M. and Beckmann J.S. (1992) Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, **131**: 701-721.
- Shahin M., Moore M.R., Worrall S., Smith B.L., Seawright A.A. and Prakash A.S. (1998) H-ras activation is an early event in the ptaquiloside-induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **250**: 491-497.
- Shields M.J., Kevin P., McFall A., Shaub A. and Der C.J. (2000) Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over. *Trends in Cell Biology*, **10**: 147-154.

-
- Shih T.Y., Papageorge A.G., Stokes P.E., Weeks M.O., Scolnick E.M. (1980) Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, **287**: 686-691.
- Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A., Scolnick E.M. (1979) Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology*, **96**: 64-79.
- Shimizu K., Birnbaum D., Ruley M.A., Fasano O., Suard Y., Edlund L., Taparowsky E., Goldfarb M., Wigler M. (1983) Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature*, **304**: 497-500.
- Shinozaki R., Inoue S. and Choi K.S. (1998) Flow cytometric measurement of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in normal human peripheral lymphocytes and cultured human lung cancer cells. *Cytometry*, **31**: 300-306.
- Sigal I.S., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Scolnick E.M. (1986) Identification of effector residues and a neutralizing epitope of Ha-ras-encoded p21. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A*, **83**: 4725-4729.
- Silva M. E., Brasileiro-Filho G., Santos R. C. and Freitas R. N. The effect of pretreatment with vitamin E on bracken tumorigenicity in rats. *In: Smith R. T. and Taylor J.A. (eds.), Bracken fern: toxicity, biology and control pp. 128-131. International Bracken Group Special Publication no. 4, 2000.*
- Simán S.E., Povey A.C., Ward T.H., Margison G.P. and Sheffield E. (2000) Fern spore extracts can damage DNA. *British Journal of Cancer*, **83**: 69-73.
- Singer B., Kusmierek J.T. (1982) Chemical mutagenesis. *Annual Review of Biochemistry*, **51**: 655-693.
- Smith B.L., Shaw G., Prakash A.S. and Seawright A.A. Studies on DNA adduct formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (*Pteridium* Spp.) *In: Colgate, S.M. and Dorling, P.R. (eds.) Plant Associated Toxins, Cap.31., pp. 167-172. CAB International: Wallingford, UK, 1994.*
- Soussi T., Caron de Fromentel C., Mechali M., May P., Kress M. (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*, **1**: 71-8.

- Srivastava S., Zou Z.Q., Pirollo K., Blattner W., Chang E.H. (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*, **348**: 747-749.
- Stoewsand G.S., Anderson J.L., Boyd J.N., Hrazdina G., Babish J.G., Walsh K.M. and Losco P. (1984) Quercetin: a mutagen, not a carcinogen, in Fischer rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **14**: 105-114.
- Stirzaker C., Millar D.S., Paul C.L., Warnecke P.M., Harrison J., Vicent P.C., Frommer M. and Clark S.J. (1997) Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Research*, **57**: 2229-2237.
- Suemasu K., Harris C.C., Melamed M.R., Shimosato Y., Watanabe S., Mukai K. and Sugimura T. (1990) Report of the meeting on fundamental and clinical research in multiple primary cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **20**: 436-440.
- Sukumar S., Natario V., Martin-Zanca D. and Barbacid M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, **306**: 658-661.
- Sukumar S., Armstrong B., Bruyntjes J.P., Leav I. and Bosland M.C. (1991) Frequent activation of the Ki-ras oncogene at codon 12 in N-methyl-N-nitrosurea-induced rat prostate adenocarcinomas and neurogenic sarcomas. *Molecular Carcinogenesis*, **4**: 362-368.
- Syvaoja J., Suomensaari S., Nishida C., Goldsmith J.S., Chui G.S.J., Jain S. and Linn S. (1990) DNA polymerase α , β and δ : three distinct enzymes from HeLa cells. *Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A.*, **87**: 6664-6668.
- Szyfter K., Hemminki K., Crane A.E. and Watson W.P. (1991) Quantitative and kinetic examination of ^{32}P -postlabelling of etheno-substituted nucleotides. *Chemical-Biological Interactions*, **80**: 99-107.
- Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R., Chang E.H. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, **300**: 143-149.
- Tamanoi F., Walsh M., Kataoka T., Wigler M. (1984) A product of yeast RAS2 gene is a guanine nucleotide binding protein. *Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A.*, **81**: 6924-6928.

-
- Tang M., Bruck I., Eritja R., Turner J., Frank E.G., Woodgate R., O'Donnell M. and Goodman M.F. (1998) Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD'₂C mutagenic complex and RecA protein. Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A, **95**: 9755-9760.
- Tang M., Shen X., Frank E.G., O'Donnell M., Woodgate R. and Goodman M.F. (1999) UmuD'₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A, **96**: 8919-8924.
- Taparowsky E., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M. (1983) Structure and activation of the human N-ras gene. Cell, **34**: 581-586.
- Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M. (1982) Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. Nature, **300**: 762-765.
- Taylor J.A. (1980) Bracken, an increasing problem and a threat to health. Outlook Agricultural, **10**: 298-304.
- Teich N.M. Oncogenes and Cancer. *In*: Franks L.M. and Teich N.M. (eds.) Cellular and Molecular Biology of Cancer. 3^o ed, pp.169-201. Oxford University Press, 1997.
- Temeles G.L., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Sigal I.S. and Scolnick E.M. (1985) Yeast and mammalian ras proteins have conserved biochemical properties. Nature, **313**: 700-703.
- Thibodeau S.N., Bren G. and Schaid D. (1993) Microsatellite instability in cancer of proximal colon. Science, **260**: 816-819.
- Tomlinson I.P., Novelli M.R. and Bodmer W.F. (1996) The mutation rate and cancer. Proceedings of the National Academic Science of U.S.A , **93**: 14800-14803.
- Trotter W.R. (1990) Is bracken a health hazard? Lancet, **336**: 1563-1565.
- Tudek B., Boiteux S. and Laval J. (1992) Biological properties of imidazole ring opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. Nucleic Acids Research, **20**: 3079-3084.
- Umar A. and Kunkel T.A. (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genomic instability in cancer cells. European Journal of Biochemistry, **238**: 297-307.

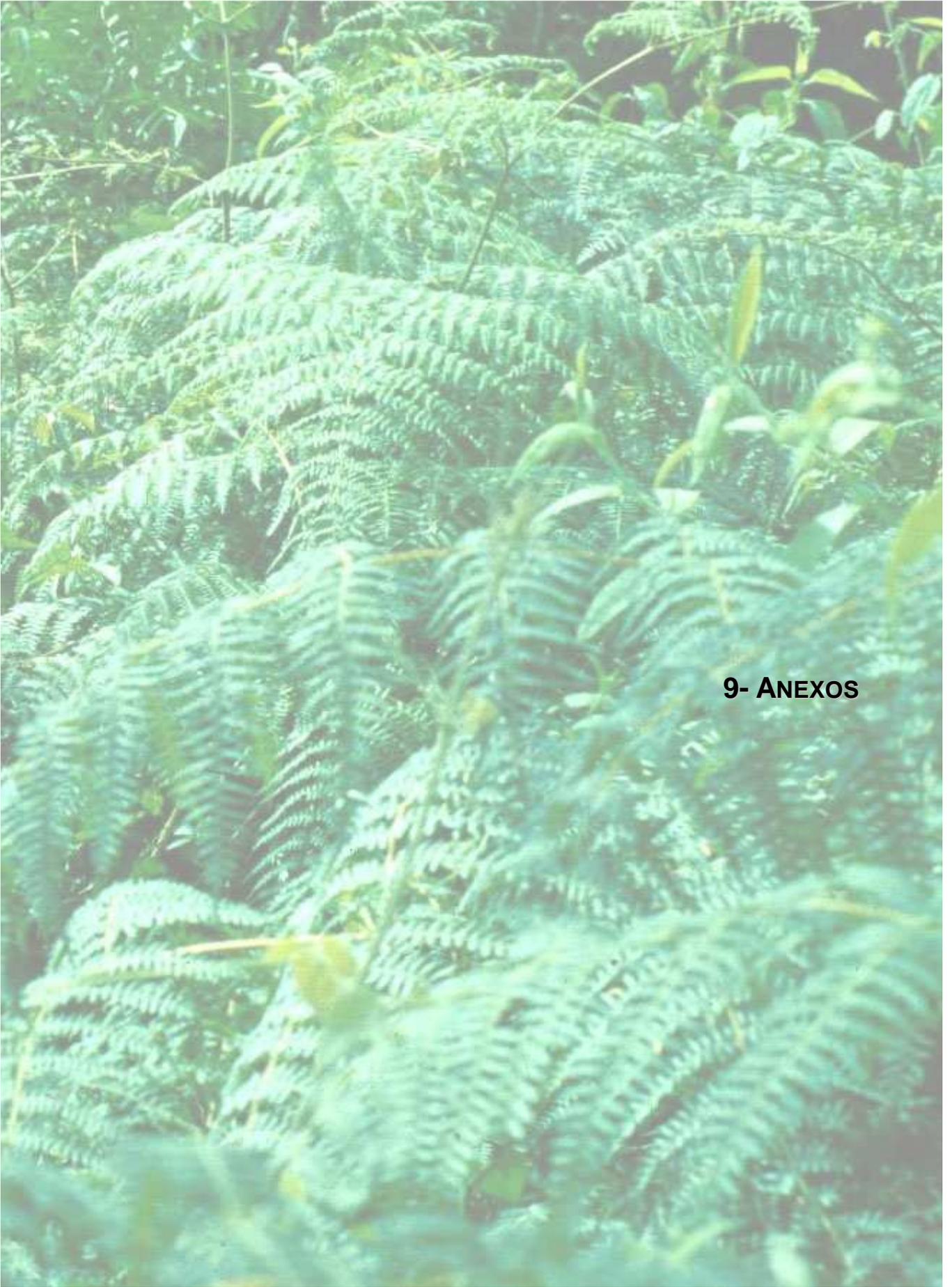
- Upton A.C. Radiations effects. *In*: Hitt H.H., Watson J.D. and Winsten J.A., (eds.) Origins of human cancer, 477-500. Book A. Cold Spring Harbor, N.Y. :Cold Spring Harbor Laboratory,1977.
- Urbach F., Rose D.B., Bonnem M. Genetic and environmental interactions in skin carcinogenesis. *In*: M.D. Anderson (ed) Hospital and Tumor Institute Environment and Cancer, pp. 354-371. Baltimore: Williams and Wilkins, 1972.
- Vaca C.E., Vodicka P. and Hemminki K. (1992) Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabelling. *Carcinogenesis*, **13**: 593-599.
- Vancutsem P.M., Lazarus P. and Williams G.M. (1994) Frequent and specific mutations of the rat *p53* gene in hepatocarcinomas induced by tamoxifen. *Cancer Research*, **54**: 3864-3867.
- van der Hoeven J.C.M., Lagerweij W.J., Posthumus M.A., van Veldhuizen A. and Holterman H.A.J. (1983) Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Carcinogenesis*, **4**: 1587-1590.
- van Kranen H.J., van Steeg H., Schoren L., Faessen P., de Vries A., van Iersel P.W.C. and van Kreijl C.F. (1994) The rat *N-ras* gene; interference of pseudogenes with the detection of activating point mutations. *Carcinogenesis*, **5**: 307-311.
- Varmus H.E. (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annual Review of Genetic*, **18**: 553-612.
- Villalobos-Salazar J., Meneses A., Rojas J.L., Mora J., Porrás R.E. and Herrero M.V. Bracken derived carcinogens as affecting animal and human health in Costa Rica. *In*: Taylor J.A. (ed.) Bracken toxicity and Carcinogenicity as related to Human Health. pp 40-45. International Bracken Group: Aberystwyth, 1989.
- Villalobos-Salazar J., Meneses A. and Salas J. Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern *Pteridium aquilinum*. *In*: Taylor J.A. and Smith R.T.(eds) Bracken Biology and Management, pp 247-251. Australian Institute of Agricultural Science. Occasional Publication nº 40,1990.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R. and Kern S.E. (1988) Genetic alteration during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, **319**: 525-532.
- Vogelstein B., Kinzler K.W. (1992) Carcinogens leave fingerprints. *Nature*, **355**: 209-210.

- Volgestein B. and Kinzler K. W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in Genetic*, **9**: 138-141.
- Yuasa Y., Srivastava S.K., Dunn C.Y., Rhim J.S., Reddy E.P., Aaronson S.A. (1983) Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas/has human proto-oncogene. *Nature*, **303**: 775-779.
- Walter M., Clark S.G. and Levinson A.D. (1986) The oncogenic activation of human p21ras by a novel mechanism. *Science*, **233**: 649-652.
- Wang Y., You M., Reynolds S.H., Stoner G.D. and Anderson M.W. (1990) Mutational activation of the cellular Harvey *ras* oncogene in rat esophageal papillomas induced by methylbenzyl nitrosamine. *Cancer Research*, **50**: 1591-1595.
- Watt A.S. (1976) The ecological status of bracken. *Botanic Journal Linn. Society*, **73**: 217-239.
- Watson W.P. (1987) Post-labelling for detecting DNA damage. *Mutagenesis*, **2**: 319-331.
- Watzinger F. and Lion T. (1999) RAS family. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/ras.html>
- Weinstein J.B. (1981) Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*, **17**: 107-128.
- Weinstein J.B. (1983) The monitoring of DNA adducts as an approach to carcinogen detection. *Annual Review of Public Health*, **4**: 409-413.
- Willumsen B.M., Papageorge A.G., Kung H.F., Bekesi E., Robins T., Johnsen M., Vass W.C. and Lowy D.R. (1986) Mutational analysis of a ras catalytic domain. *Molecular Cell Biology*, **6**: 2646-2654.
- Winter E. and Perucho M. (1986) Oncogene amplification during tumorigenesis of established rat fibroblasts reversibly transformed by activated human ras oncogenes. *Molecular Cell Biology*, **6**: 2562-2570.
- Witkin E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriology Review*, **40**: 869-907.

Wogan G.N. (1989) Markers of exposure to carcinogens: methods for human biomonitoring. *Journal of the American College of Toxicology*, **8**: 871-881.

Wogan G.N. and Gorelick N.J. (1985) Chemical and biochemical dosimetry of exposure to genotoxic chemicals. *Environmental Health Perspectives*, **62**: 5-18.

Zarbl H., Sukumar S., Arthur A.V., Martin-Zanca D. and Barbacid M. (1985) Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature*, **315**: 382-385.

A photograph of a dense thicket of green ferns in a forest setting. The ferns are the dominant feature, with their intricate, feathery fronds filling most of the frame. The lighting is soft and natural, highlighting the various shades of green. In the lower right quadrant, the text "9- ANEXOS" is printed in a bold, black, sans-serif font.

9- ANEXOS

ABSTRACT

Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) toxicity and carcinogenicity properties have been extensively described in domestic and experimental animals. Some epidemiologic studies have associated the human exposition to the bracken fern and /or to its toxins with a higher risk for the occurrence of esophagus cancer in Venezuela and stomach cancer in Japan, Brazil, Costa Rica, United Kingdom and Venezuela. However, these epidemiologic studies are not enough to unequivocally establish a causal relationship between bracken fern and cancer development in human beings. In the present work we proposed to investigate the presence of molecular markers of the bracken fern toxins on the animals genome which, if found, would be used in the assessment of the risk to the bracken exposure for humans. Initially, we investigated DNA adducts formation in normal targets tissues of female rats treated by gavage with a single dose of alcoholic extracts or other different preparations obtained from young fronds of freshly collected bracken for medium and long term. We used ^{32}P -postlabeling method to identify the DNA adducts. Our results indicate that DNA adducts detectable by ^{32}P -postlabeling are not formed in stomach or ileum of rats treated with bracken fern via digestive tube. We evaluate the presence of adducts in DNA samples obtained from upper digestive tube of mice treated with an acute single dose of bracken extract and spores and we found three adducts that had been previously described and also other four adducts which were not characterized. None of these adducts presented chromatography mobility similar to the single adduct obtained from *in vitro* modified DNA with activated ptaquiloside (a carcinogenic glycoside extracted from bracken). We conclude that other substances, besides ptaquiloside, are able to induce DNA adducts formation, which might contribute to the bracken carcinogenicity in mice. Following the strategy to identify molecular markers of the bracken action in the rat genome, and considering colorectal tumors carcinogenesis in humans as model, we examined eight malignant tumors induced by bracken treatment in rats for the presence of mutations in genes related to the "classical pathway" for the colorectal cancer, *p53* and *ras* and also evaluated the "mutator pathway" by studying microsatellites stability. The exons 5 – 9 of the *p53* and exons 1 and 2 of the *K-ras* and *H-ras* genes were sequenced and none mutation was found in the eight tumors. The amplification of five microsatellites *loci* previously validated (one mononucleotide repeat, three dinucleotide repeat and one tetranucleotide repeat) in the

malignant tumors and in normal adjacent tissue did not reveal any microsatellite instability. The involvement of mutations occurring in other tumor suppressor genes or oncogenes of the “classical pathway” as well as in genes required for chromosomal segregation and epigenetic events still must be investigated in the search for molecular markers of the bracken fern induced tumors.

Artigo 1

R.N. Freitas, P.J. O'Connor, A. S. Prakash, M. Shahin, and A. C. Povey. Bracken (*Pteridium aquilinum*)-Induced DNA Adducts in Mouse Tissues Are Different from the Adduct Induced by the Activated Form of the Bracken Carcinogen, Ptaquiloside. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281**, 589-594 (2001).

Artigo 2

R. N. Freitas, G. Brasileiro-Filho, M.E. Silva, S. D. J. Pena. Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in *p53*, *H-ras* and *K-ras* and no microsatellite instability. *Mutation Research* **499**, 189-196 (2002).