

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Bruna dos Santos Paiva Ribeiro

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NA NEOPLASIA
SÓLIDA PSEUDOPAPILAR DO PÂNCREAS**

Rio de Janeiro

2023

Bruna dos Santos Paiva Ribeiro

ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NA NEOPLASIA SÓLIDA
PSEUDOPAPILAR DO PÂNCREAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Heitor Siffert Pereira de Souza
Profa. Dra. Maria da Glória da Costa Carvalho

Rio de Janeiro
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

d722e dos Santos Paiva Ribeiro, Bruna
Estudo de Alterações Moleculares na Neoplasia Sólida
Pseudopapilar do Pâncreas / Bruna dos Santos
Paiva Ribeiro. -- Rio de Janeiro, 2023.
67 f.

Orientador: Heitor Siffert Pereira de Souza.
Coorientador: Maria da Glória da Costa Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina área de concentração em Clínica
Médica, 2023.

1. Neoplasia. 2. Pâncreas. 3. Heterogeneidade
Tumoral. 4. Metilação. 5. Polimorfismo. I. Siffert
Pereira de Souza, Heitor, orient. II. da Costa
Carvalho, Maria da Glória, coorient. III. Título.

ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NA NEOPLASIA SÓLIDA
PSEUDOPAPILAR DO PÂNCREAS

Bruna dos Santos Paiva Ribeiro

Orientador: Prof. Heitor Siffert Pereira de Souza
Profa. Dra Maria da Glória da Costa Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Área de concentração em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Presidente, Prof Marcia Gonçalves Ribeiro

Profa. Dra. Véra Lucia Antunes Chagas

Prof. Dr. Fernando Colonna Rosman

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que sem Ele nada seria possível e que foi minha força no momento que mais precisei.

Agradeço aos meus pais e família que sempre me apoiaram e foram o meu alicerce, minha voz e minhas pernas no ano mais difícil da minha vida durante essa trajetória. Sempre me apoiando e me incentivado a continuar e sempre lutar por mais. Obrigada por nunca desistirem de mim.

Aos amigos, em especial a Luana de Albuquerque e Ana Luiza de Oliveira, que foram responsáveis por todo apoio e incentivo nos momentos de cansaço e insegurança. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu não conseguia e me aliviar o peso quando precisei.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria da Glória da Costa Carvalho e a pelos ensinamentos e paciência comigo.

Agradeço à Profa. Dra. Véra Lucia Antunes Chagas também por todos os ensinamentos, orientação e compreensão comigo antes durante a após o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao professor Heitor Siffert Pereira de Souza por toda a orientação e auxílio durante o processo de organização da defesa.

Ao Dr. Marcelo Soares da Mota e Silva do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, agradeço pelas dicas, revisões para submissão dos artigos e por compartilhar experiência.

Agradeço a Dra. Emília Carvalho, funcionária do Setor de Imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica – HUCFF-UFRJ, mas antes de tudo grande amiga, por todo auxílio no processo de desenvolvimento deste trabalho e conversas e desabafos.

As amigas adquiridas nesse processo de realização de mestrado Mariângela e Juliana pelo companheirismo e trabalho em equipe nas disciplinas cursadas juntas e o dia a dia no setor.

A Dra. Mariana Chantre e Profa. Dra Gilda Brown da UERJ por acreditarem nesse projeto e embarcaram comigo nesse trabalho.

Um agradecimento especial a Siane Rosa pela disponibilidade, ensinamentos de técnicas e análises e realização de reações para que esse trabalho pudesse ser realizado.

E a mim mesma, que mesmo com todos os problemas passados nesse período tive forças para levantar e continuar.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família por todo o apoio, em especial ao meu avô que hoje infelizmente uma doença levou parte de suas memórias e consciência, mas que mesmo como sua pouca instrução sempre foi um grande incentivador dos meus estudos.

“O maior erro que um homem pode cometer é sacrificar a sua saúde a qualquer outra vantagem.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A neoplasia sólida pseudopapilar do pâncreas (NSPP) é rara e de baixa malignidade. Constitui cerca de 1-2% de todas as neoplasias pancreáticas exócrinas e ocorre principalmente em mulheres jovens. A heterogeneidade intratumoral tem sido descrita em vários tipos de tumor, incluindo a NSPP.

MÉTODOS: Neste trabalho, investigamos a heterogeneidade molecular de três diferentes áreas (periférica, intermediária e central) de uma NSPP em um paciente pediátrico submetido à cirurgia de Whipple no HUCFF/UFRJ. O polimorfismo dos genes de desintoxicação *GSTP1*, *CYP1A1* e *CYP1A2* foi investigado pela técnica de PCR-polimorfismo de fragmento de restrição (PCR-RFLP) e o perfil de metilação do promotor dos genes *p14ARF*, *GSTP1*, *hTERT* e *MGMT* foi acessado por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) específico de metilação (MSP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Nas 3 regiões estudadas, os resultados revelaram *CYP1A1* e *CYP1A2* com genótipo de tipo selvagem e *GSTP1* com genótipo heterozigoto. Em relação ao estado de metilação dos genes investigados, o *MGMT* não apresentou metilação detectável em nenhuma das três regiões analisadas; em contraste, tanto *p14ARF* quanto *hTERT* mostraram metilação detectável em todas as três regiões. *GSTP1* mostrou metilação nas áreas 1 e 2, porém foi negativa na 3.

CONCLUSÃO: Com base em nosso estudo, concluímos que há heterogeneidade da biologia tumoral da NSPP, representada pela inativação epigenética de genes críticos e pela atividade de desintoxicação reduzida, o que pode contribuir para identificar novos marcadores tumorais e para a melhor compreensão da biologia dessa neoplasia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The solid pseudopapillary neoplasia of the pancreas (NSPP) is rare and of low malignancy. It constitutes about 1-2% of all exocrine pancreatic neoplasms and occurs mainly in young women. Intratumoral heterogeneity has been described in several tumor types, including an NSPP.

METHODS: In this work, we investigated the molecular heterogeneity of three different areas (peripheral, intermediate and central) of an NSPP in a pediatric patient who underwent Whipple surgery at HUCFF/UFRJ. The polymorphism of the detoxification genes *GSTP1*, *CYP11m1* and *CYP11m2* was investigated by the technique of PCR-restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP) and the promoter methylation profile of the genes *p14ARF*, *GSTP1*, *hTERT* and *MGMT* was accessed by PCR (Polymerase Chain Reaction) specific methylation (MSP).

RESULTS AND DISCUSSION: In the 3 studied regions, the results revealed *CYP11m1* and *CYP11m2* with wild-type genotype and *GSTP1* with heterozygous genotype. Regarding the methylation state of the investigated genes, *MGMT* did not show detectable methylation in any of the three analyzed regions; in contrast, both *p14ARF* and *hTERT* found detectable methylation in all three regions. *GSTP1* showed methylation in areas 1 and 2, but was negative in 3.

CONCLUSION: Based on our study, we conclude that there is heterogeneity in the tumor biology of NSPP, represented by the epigenetic inactivation of critical genes and reduced detoxification activity, which may contribute to the identification of new tumor markers and to a better understanding of the biology of this neoplasm.

ÍNDICE

Introdução.....	4
2. Fundamentação teórica.....	5
2.1 Aspectos clínicos e diagnósticos	5
2.2 Heterogeneidade.....	8
2.3 CYP	11
2.4 Glutathiona S-Transferases	13
2.5 Polimorfismo.....	15
2.6 Epigenética	16
2.7 P14 ^{ARF}	18
2.8 hTERT	19
2.9 MGMT	21
3. Justificativa	22
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo Primário.....	23
4.2 Objetivos Secundários	23
5. Material e Métodos.....	23
5.1 Tipo de estudo	23
5.2 Período do Estudo	23
5.3 Local do estudo	24
5.4 Amostras.....	24
5.5 Extração de DNA.....	26
5.6 Técnicas aplicadas.....	27
5.6.1 Teste de funcionalidade do DNA por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	27
5.6.2 Polimorfismo.....	27
5.6.3 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida....	28
5.6.4 Metilação	29
6. Resultados.....	32
7. Discussão	35
8. Limitações do Estudo.....	39
9. Considerações finais e sugestões.....	39
10. Conclusões	40
Referências.....	41
Apêndice I -	52

Apêndice II	54
Apêndice III	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Bp – Pares de Base (*Base Pair*)

CDKN2A – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CpG – Pequena sequência de DNA palindrômica

CTNNB1 – Gene codificante β -Catenina

CYP – Citocromo P450 (Enzima)

DDR – Reparo de danos no DNA (*DNA damage repair*)

DNA – Ácido Dexossiribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

GSH – Glutathiona Reduzida

GST - Glutathiona S-Transferase

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IHC – Imuno-histoquímica

hTERT - Transcriptase Reversa da Telomerase Humana

KRAS - Oncogene homólogo viral do sarcoma de rato Kirsten (*Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene*)

mRNA – RNA mensageiro

MSP - *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*

NSPP- Neoplasia Sólida Pseudopapilar de Pâncreas

PAHs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (*Polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

Rb - Retinoblastoma

RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA – Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

rs – Referência de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*reference single nucleotide polymorphism*)

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SPNP - *Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas*

STR – Sequências Curtas Repetidas em Tandem (*Short Tandem Repeat*)

TP53 – Proteína do tumor P53 (*Tumor protein P53*)

UDP – Uridina Difosfato (*Uridine Diphosphate*)

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1	Macroscopia da NSPP, fixada em formalina	7
Figura 2	Cortes Histológicos da Neoplasia Sólida Pseudopapilar do Pâncreas corados pelo método da Hematoxilina e Eosina.	7
Figura 3	Teorias de heterogeneidade tumoral	10
Figura 4	Exemplo de uma Adição de Michael	12
Figura 5	Desintoxicação Celular	13
Figura 6	Desintoxicação fase II	15
Figura 7	Esquema de rede de sinalização de supressão tumoral	19
Figura 8	Tomografia computadorizada do abdômen	25
Figura 9	Macroscopia da NSPP, não fixada em formalina	26
Tabela 1	Sequência de <i>Primers</i> , temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos e enzimas de restrição das análises de polimorfismo	28
Figura 10	Fluxo de processamento e análise das amostras de NSPP	29
Tabela 2	Sequência de <i>Primers</i> , temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos das análises de metilação	31
Figura 11	Conversão pelo Bissulfito	32
Figura 12	Análises de PCR-RFLP para <i>CYP1A1 m1 e m2</i>	33
Figura 13	Análise de PCR-RFLP de <i>GSTP1</i>	33
Figura 14	Resultados das análises de metilação dos genes <i>hTERT</i> , <i>P14ARF</i> e <i>GSTP1</i>	34
Figura 15	Resultados das análises de metilação do gene <i>MGMT</i>	34

Introdução

A neoplasia sólida pseudopapilar do pâncreas (NSPP) é rara e de baixa malignidade. Constitui cerca de 1-2% de todas as neoplasias pancreáticas exócrinas e ocorre principalmente em mulheres jovens, com um curso clínico prolongado e indolente (IGBINOSA, 2011; NGUYEN et al., 2011; NOTOHARA et al., 2000). Devido à escassez do número de casos observados, a história natural da doença não é totalmente compreendida. Os sinais e sintomas, quando presentes, não são específicos como: dor abdominal, náusea e vômito, causados pela compressão de estruturas no abdome, sendo raros os casos de icterícia (VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003). No entanto, atualmente, o conhecimento da existência da doença, a utilização da imuno-histoquímica, e a reavaliação retrospectiva de tumores não identificados, o diagnóstico de NSPP tem sido mais frequente (SANTINI; POLI; LEGA, 2006). Esta neoplasia recebeu diferentes denominações ao longo dos anos, incluindo "tumor de Frantz", "tumor sólido cístico", "tumor cístico papilar", "neoplasia epitelial papilar", entre outros (IGBINOSA, 2011). Também foi considerada como um carcinoma incomum ou carcinoma não funcional das ilhotas pancreáticas. Através da descrição de Frantz, em 1959, foi reconhecida como uma entidade específica (NOTOHARA et al., 2000) e em 1996 foi definida pela OMS como "tumor sólido pseudopapilar" (IGBINOSA, 2011).

A NSPP é caracterizada por um crescimento sólido-cístico, com estruturas pseudopapilares, podendo ser descoberta por acaso durante exames de imagem ou pela presença de massa abdominal palpável. Dependendo da posição do tumor (cabeça, corpo ou cauda do pâncreas), o diagnóstico diferencial inclui massa adrenal, tumor endócrino pancreático, cisto ou tumor hepático ou pancreático (PATIL et al., 2006). Os tumores primários em sua maioria (85-90%) se encontram no pâncreas quando diagnosticados (VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003). A ressecção cirúrgica é o tratamento de escolha, mesmo que implique em ressecções de órgãos adjacentes, e, geralmente, leva a um bom prognóstico, ainda que haja metástases ou recidivas, (GUO et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; NOTOHARA et al., 2000; PATIL et al., 2006; VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003).

O diagnóstico desses tumores às vezes é difícil, pois sua histomorfologia e o seu imunofenótipo podem sugerir outros tumores pancreáticos exócrinos e endócrinos (GUO et al., 2011). Uma taxa de recorrência local de 6,2% é relatada em casos tratados por

excisão cirúrgica, e metástases hepáticas ou do tipo Krukenberg se desenvolvem em 5,6% dos casos. Poucos autores relataram efetividade no tratamento com o uso de quimioterapias e radioterapias (VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003; ZURIARRAIN et al., 2011). Os estudos feitos até o presente momento, não apontam nenhum tipo de associação com síndromes clínicas ou genéticas nem nenhum tipo de relação com etnicidade, no entanto, alguns casos foram relatados em pacientes com polipose e adenoma familiar do cólon (CHAGAS; ROSMAN; CARVALHO, 2020; KLÖPPEL et al., 2010). Embora apresente baixo potencial de malignidade, o tumor pode invadir localmente. Por causa de sua biologia e a raridade da ocorrência de metástases, não existe um tratamento definido para esses casos (VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003; ZURIARRAIN et al., 2011).

No presente estudo, nos propusemos a estudar a heterogeneidade molecular da neoplasia sólida pseudopapilar do pâncreas através da análise do polimorfismo de enzimas fase 1, *CYP11B1* e *CYP11B2* e da enzima de fase 2, *GSTP1* e da análise de metilação na região promotora dos genes *P14*, *GSTP1*, *hTERT* e *MGMT* de três regiões distintas de uma amostra de NSPP.

2. Fundamentação teórica

2.1 Aspectos clínicos e diagnósticos

Apesar dos diversos estudos com microscopia eletrônica e imuno-histoquímica, a origem celular deste tumor permanece incerta, favorecendo para muitos pesquisadores a hipótese de sua origem em uma célula primitiva multipotencial, especialmente pela ausência de uma linhagem predominante de diferenciação encontrada (BALERCIA et al., 1995; CHAGAS; ROSMAN; CARVALHO, 2020). Em um estudo recente com 14 pacientes pediátricos, que possuía o objetivo de entender a patogênese da NSPP, não foram encontradas evidências de expressão dos fatores de transcrição PDX1, SOX9, PTF1A e NKX2.2 que estão associados ao desenvolvimento pancreático (CALVANI et al., 2019). A origem extrapancreática tem sido sugerida por alguns autores levando em consideração a ocorrência de casos de tumores primários em órgãos e estruturas diferentes do pâncreas, como por exemplo nos ovários, o que leva à suposição da origem de células primitivas no sistema genital (CHAGAS; ROSMAN; CARVALHO, 2020; GAHLOT et

al., 2016; KOSMAHL et al., 2000). Devido à sua raridade, os dados clínicos desses tumores são principalmente limitados a relatos de casos ou séries pequenas, principalmente realizadas em populações asiáticas (NGUYEN et al., 2011; NOTOHARA et al., 2000).

O estudo anatomopatológico evidencia, na macroscopia (Figura 1), que o tumor é geralmente bem circunscrito com regiões sólidas, outras hemorrágicas, ou ainda com degeneração cística, podendo apresentar calcificações. Uma cápsula fibrosa espessa está frequentemente presente, porém à microscopia, (Figura 1) células neoplásicas podem ser vistas infiltrando o parênquima pancreático, permeando ácinos e ilhotas pancreáticas (CHAGAS; ROSMAN; CARVALHO, 2020). Microscopicamente, componentes sólidos e pseudopapilares são reconhecidos, caracterizando a natureza sólida e pseudopapilar da neoplasia (CHAGAS; ROSMAN; CARVALHO, 2020; DINARVAND; LAI, 2017). Nas áreas sólidas, as células são pouco coesas, poligonais, com citoplasma eosinofílico, ou ainda claro e, por vezes, espumoso e permeadas por pequenos vasos sanguíneos. Os núcleos são, geralmente redondos ou ovais, e demonstram pleomorfismo mínimo, sendo este relatado em tumores mais agressivos (VOLLMER; DIXON; GRANT, 2003) (Figura 2: A, B) As pseudopapilas são formadas pela degeneração das células menos coesas, restando as que estão mais próximas do eixo conjuntivo-vascular (Figura 2 C).



Figura 1 – Neoplasia Sólida Pseudopapilar do Pâncreas: Corte transversal da neoplasia sólida pseudopapilar do pâncreas após ressecção e fixação em formol, com limites regulares, encapsulada, de aspecto heterogêneo, com áreas sólidas branco-amareladas e outras granulosas e acastanhadas. Fonte: Adaptado de CHAGAS et al 2018a.

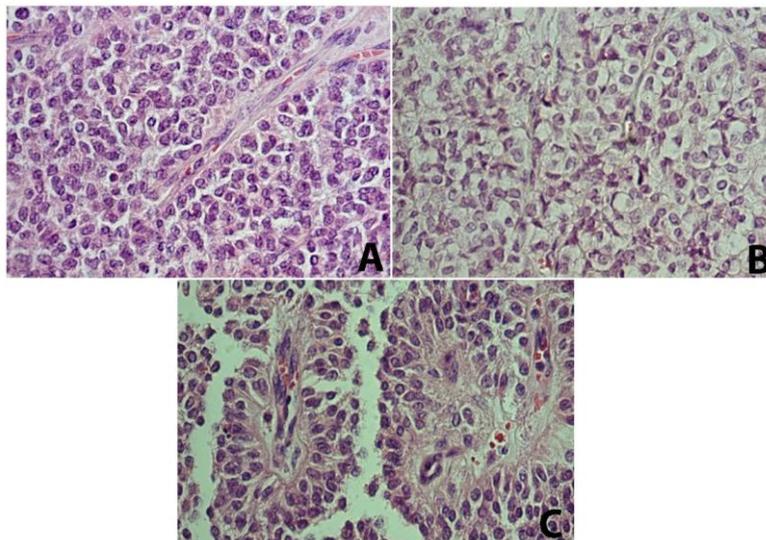


Figura 2 - Cortes Histológicos da Neoplasia sólida pseudopapilar de pâncreas, corados pelo método da Hematoxilina e Eosina. A: Padrão sólido com células pouco coesas apresentando poucos núcleos pleomórficos e citoplasma eosinofílico. B. Padrão sólido mostrando células com citoplasma claro. C. Padrão pseudopapilar, com células distribuídas em torno do eixo conectivo vascular, sendo os núcleos dispostos na porção apical. Fonte :Adaptada de CHAGAS et al. 2018a.

Na análise molecular, a NSPP se mostra diferente dos outros adenocarcinomas pancreáticos. Alterações em alguns genes com *KRAS*, *TP53* e *CDKN2A/p16* presentes

nos carcinomas ductais, não são encontradas em NSPP, entretanto eles apresentam mutações somáticas pontuais no exon 3 do gene codificante de beta-catenina (*CTNNB1*). As mutações nesse gene estão relacionadas com a via de sinalização Wnt/ β -catenina, que quando alterada, leva ao acúmulo de beta-catenina no núcleo das células neoplásicas. Noventa por cento (90%) dos NSPP apresentam padrão anormal de marcação nuclear de beta-catenina, enquanto que em pâncreas saudáveis a marcação é membranar. O acúmulo nuclear de beta-catenina tem relação direta com a proliferação e perda de adesão celulares (ABRAHAM et al., 2002).

2.2 Heterogeneidade

A heterogeneidade tumoral consiste em heterogeneidade intertumoral (tumor por tumor) e intratumoral (dentro de um tumor). Heterogeneidade intertumoral acontece devido à diferença genética entre pacientes e fatores ambientais. Já a heterogeneidade intratumoral refere-se às variações genômicas e biológicas dentro de uma lesão tumoral pela evolução de células tumorais sob diversos microambientes e diferentes etiologias (LIU; DANG; WANG, 2018).

Um tumor é uma população heterogênea de células, contendo células cancerosas transformadas, células de suporte e células infiltrantes de tumor. Essa heterogeneidade intratumoral é ainda aumentada pela variação clonal e influências microambientais nas células cancerígenas, que também representam um conjunto heterogêneo de células (PRASETYANTI; MEDEMA, 2017).

De acordo com a seleção da evolução darwiniana, também conhecida como teoria célula tronco tumoral, uma lesão tumoral evolui de uma única célula maligna para uma massa tumoral funcionalmente heterogênea, com uma comunidade de células tumorais organizada hierarquicamente, promovendo sua sobrevivência e adequação em resposta aos vários microambientes (Figura 3A), (LIU; DANG; WANG, 2018; MARUSYK; POLYAK, 2010; MERLO et al., 2006).

A teoria da evolução clonal afirma que cada pequena população existente dentro do tumor que acumulou mutações ao longo do tempo possui capacidade tumorigênica. Sendo assim cada região tumoral, com características genéticas diferentes é capaz de gerar novos tumores diferentes dos originais. A partir dessa teoria, foi idealizado que essa

evolução pudesse ocorrer de duas formas: linear ou ramificada (Figura 3B). A evolução linear acumula sequencialmente mutações levando às variações encontradas por pressões microambientais. Na evolução ramificada subpopulações são formadas separadamente, tendo essas a capacidade de formar novas populações. A teoria ramificada é mais condizente com a heterogeneidade tumoral do que a teoria célula tronco tumoral, pelo fato de mais rapidamente levar à formação de populações geneticamente diferentes em um mesmo tumor (GERLINGER et al., 2012; LIU; DANG; WANG, 2018; SWANTON, 2012).

Os cânceres em humanos exibem frequentemente heterogeneidade intratumoral substancial representada por todas as características fenotípicas distintas, como morfologia celular, expressão gênica (incluindo a expressão de marcadores de superfície celular e fator de crescimento e receptores hormonais), metabolismo, motilidade e angiogênese, potencial proliferativo, resistência imunológica, e potencial metastático (MARUSYK; POLYAK, 2010). É importante ressaltar que a natureza da heterogeneidade não é limitada à população de células cancerosas malignas, um tumor é um ecossistema complexo que contém células tumorais e outros tipos de células, como células endoteliais, células imunes infiltrantes, células estromais e matriz extracelular, que definem diferenças no microambiente tumoral (PRASETYANTI; MEDEMA, 2017).

A heterogeneidade dentro do tumor foi descrita para vários tipos de câncer. Anormalidades cromossômicas, translocação cromossômica desequilibrada, características geralmente relacionadas com a heterogeneidade, foram relatados por vários autores para NSPP (GRANT et al., 1996; KEMPSKI et al., 2006; MAITRA et al., 2000; MATSUBARA et al., 1997; STRINGER et al., 2003).

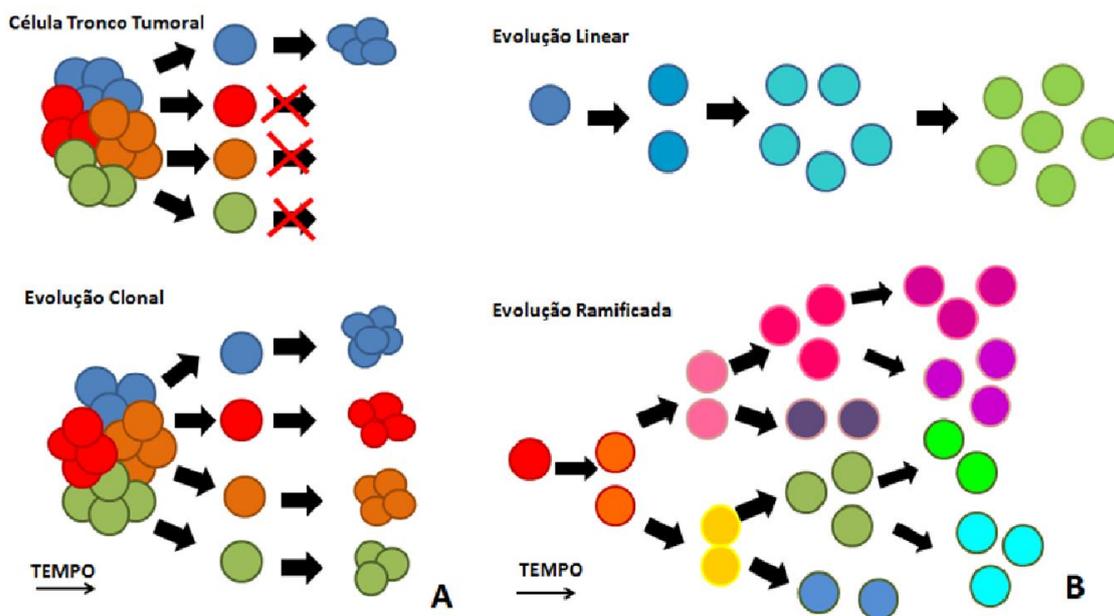


Figura 3 - Teorias de heterogeneidade tumoral: A figura 3A mostra as duas teorias: célula tronco tumoral e evolução clonal. A teoria da célula tronco tumoral diz que dentro do universo de células tumorais apenas um grupo restrito tem capacidade de tumorigênese. A teoria da evolução clonal diz que cada pequena população dentro do tumor que acumulou mutações ao longo do tempo, é capaz de gerar novos tumores. A evolução tumoral nesse caso pode acontecer de duas formas representadas em 3B. A evolução linear acumula sequencialmente mutações e na evolução ramificada subpopulações são formadas separadamente. Essa teoria é mais condizente com a heterogeneidade tumoral do que a teoria da célula tronco tumoral. (Figura de autoria própria)

A heterogeneidade intertumoral tem como causa a heterogeneidade intratumoral do tumor primário (GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017). Os tumores metastáticos podem ter origem de pequenas populações celulares de um tumor, o que torna possível a existência de tumores diferentes em um mesmo indivíduo com um mesmo tumor de origem (GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017; (LIU; DANG; WANG, 2018; MARUSYK; POLYAK, 2010).

A heterogeneidade tumoral está fortemente relacionada com a resposta do tumor aos quimioterápicos. Segundo Dagogo-Jack I (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018), a heterogeneidade é um importante fator para a resistência tumoral. Isso ocorre devido às subpopulações de células tumorais que não respondem ao tratamento, sendo essas subpopulações selecionadas durante o tratamento restaurando a atividade dos genes supressores de tumor e a capacidade de reparo do DNA dessas células cancerosas (PRIBLUDA; DE LA CRUZ; JACKSON, 2015; TURNER; REIS-FILHO, 2012). No

adenocarcinoma ductal pancreático, foi demonstrado que a resistência rápida aos medicamentos está relacionada à sua heterogeneidade (SWAYDEN; IOVANNA; SOUBEYRAN, 2018).

2.3 CYP

As células possuem vários mecanismos de proteção contra substâncias tóxicas ao seu funcionamento que podem ser adquiridas através da alimentação ou respiração. Enzimas são as principais responsáveis por esse papel, como por exemplo, as enzimas de desintoxicação. O processo de desintoxicação foi dividido em três fases, sendo as duas primeiras fases de conversão de uma substância lipofílica em hidrofílica para que possa ser eliminada do organismo pela urina (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; SHEEHAN et al., 2001). A fase I é catalisada principalmente pelo sistema do citocromo P450. Esta família de proteínas microsossomais é responsável principalmente pela oxidação dos xenobióticos. As enzimas de Fase II catalisam a conjugação de xenobióticos ativados com um substrato endógeno, solúvel em água, como glutathiona reduzida (GSH), ácido UDP-glucurônico ou glicina (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; SHEEHAN et al., 2001). Quantitativamente, a conjugação com GSH, que é catalisada pelas Glutathiona S-Transferases (GSTs), é a principal reação de fase II em muitas espécies. As GSTs podem catalisar substituições aromáticas nucleofílicas, adições de Michael (reação fácil entre nucleófilos e olefinas e alcinos ativados nos quais o nucleófilo se soma através de uma ligação múltipla carbono-carbono (Figura 4), (MATHER et al., 2006)) a cetonas α , β -insaturadas e reações de abertura de anel epóxido, todas originando a formação de conjugados de GSH e na redução de hidroperóxidos, resultando na formação de glutathiona oxidada (SHEEHAN et al., 2001).

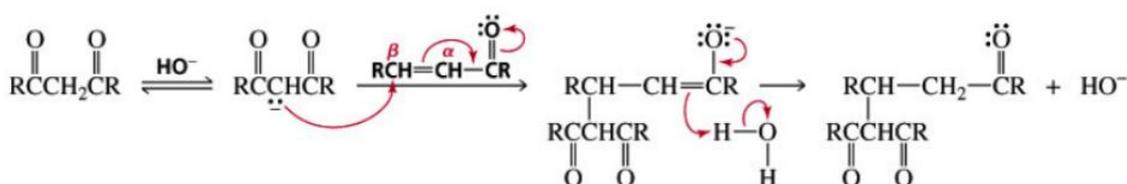


Figura 4 – Exemplo de uma Adição de Michael: Mostrando a adição de um nucleófilo ao produto final através de ligações de carbono.

Fonte: Adaptada de https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4115125/mod_resource/content/0/QFL-0343_2017%20Aula%2003%20Ad_Conjug.pdf

As CYPs são enzimas de destoxificação de fase I, e são responsáveis principalmente pela oxidação dos xenobióticos, (Figura 5) como relatado no tópico anterior (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; ROHR et al., 2004). A atividade de CYP é localizada em, praticamente, todos os tecidos do corpo. Mutação nessa família já foi relacionada ao aumento do risco de vários tipos de câncer diferentes como leucemias, câncer de pulmão induzido pelo cigarro e, principalmente, quando combinado com mutações nos genes de GSTs (NEBERT et al., 2004; ROHR et al., 2004).

Muitos nucleotídeos de polimorfismo único (SNPs) importantes já foram identificados em genes *CYP*, e tais polimorfismos dentro desses genes podem desempenhar um papel importante na determinação da suscetibilidade individual a muitos cânceres sendo o Citocromo P450 1A1 o mais estudado (WU et al., 2013).

A *CYP1A1* tem expressão principalmente extra-hepática, especialmente em tecidos epiteliais, e é crítica para o metabolismo de muitos substratos endógenos e carcinógenos exógenos. Devido à capacidade do CYP450 1A1 de catalisar a primeira etapa do metabolismo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs, também presentes na fumaça do tabaco) (SILVA et al., 2013; WU et al., 2013), o *CYP1A1* pode contribuir para a formação de intermediários altamente reativos que podem formar adutos de DNA, que, se não reparados, podem iniciar ou acelerar a carcinogênese (ZHAN et al., 2011). O acúmulo de evidências sugere que os polimorfismos genéticos estão relacionados à variação individual na suscetibilidade ao câncer. Variações nos genes que codificam enzimas envolvidas na carcinogênese poderiam alterar sua expressão e função, potencialmente influenciando o equilíbrio entre a ativação metabólica e a desintoxicação de agentes agressores, levando às suscetibilidades individuais ao câncer (WU et al., 2013; ZHUO et al., 2012)

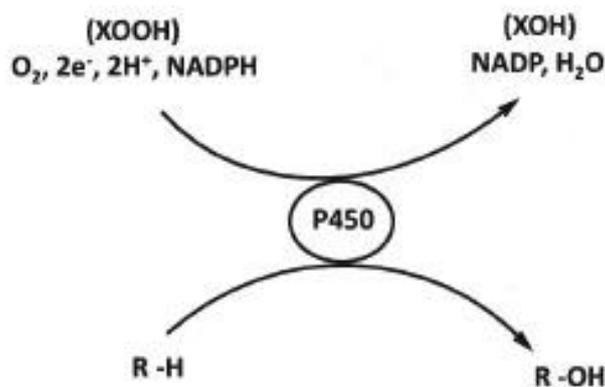


Figura 5 – Desintoxicação Celular: Esquema geral e simplificado ilustrando a fase I do processo de desintoxicação celular. Fonte: Adaptada de GONÇALVES et al., 2014

2.4 Glutathione S-Transferases

As Glutathione S-Transferases (GSTs) são enzimas de desintoxicação da fase II que protegem as macromoléculas celulares do ataque de eletrófilos reativos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; ROHR et al., 2004; TOWNSEND; TEW, 2003). As GSTs são enzimas diméricas, principalmente citosólicas, que possuem propriedades extensivas de ligação ao ligante, além de seu papel catalítico na desintoxicação (SHEEHAN et al., 2001). A conjugação da glutathione é o primeiro passo na via do ácido mercaptúrico que leva à eliminação de compostos tóxicos (Figura 6), (TOWNSEND; TEW, 2003). Elas também estão relacionadas com uma série de mecanismos de resistência envolvendo agentes quimioterápicos de câncer, inseticidas, herbicidas e antibióticos microbianos (SHEEHAN et al., 2001). As GSTs são divididas em duas famílias, microsossomais e citossólicas, sendo as citossólicas divididas em seis classes, suscetíveis aos polimorfismos genéticos (TOWNSEND; TEW, 2003). Apesar de terem surgido de um único ancestral comum, sua especificidade e diversidade de substrato foram remodeladas por duplicação de genes, recombinação genética e acúmulo de mutações. Essas alterações conferem propriedades às GSTs que garantem a atuação das enzimas em grupos funcionais, ao invés de em compostos específicos. Em geral, substratos de GST são hidrofóbicos e possuem carbono no centro eletrofílico; no entanto, alguns contêm nitrogênio, oxigênio ou enxofre (TOWNSEND; TEW, 2003). Pessoas de diferentes origens possuem diferentes padrões de silenciamento desses genes, variando de região para região (ROHR et al., 2004).

A variação na expressão e atividade de *GSTP1* foi associada a uma variedade de cânceres humanos (CUI et al., 2020; ESTELLER et al., 1998; LEE, 2007; MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006) . O *GSTP1* pode metabolizar e inativar uma série de drogas antineoplásicas, mas também pode ativar pró-drogas antineoplásicas, como TLK286 / TER286 (MORGAN et al., 1998). *GSTP1* também pode funcionar como um regulador de proteínas quinases ativadas por um gene mitótico (MOYER et al., 2008).

Em alguns trabalhos já foi relatada a hipermetilação do promotor de *GSTP1* no câncer da próstata, da mama, do rim, do pulmão e de colón, assim como em alguns linfomas (BAN et al., 1996; ESTELLER et al., 1998; LEE, 2007; LEE et al., 1994; ZHONG et al., 2002). A hipermetilação resulta na expressão reduzida de *GSTP1* (CUI et al., 2020). Quando a expressão de *GSTP1* diminui, especula-se que as células se tornam mais suscetíveis a mutações e danos como resultado da exposição a eletrófilos e do estresse oxidativo (MOYER et al., 2008).

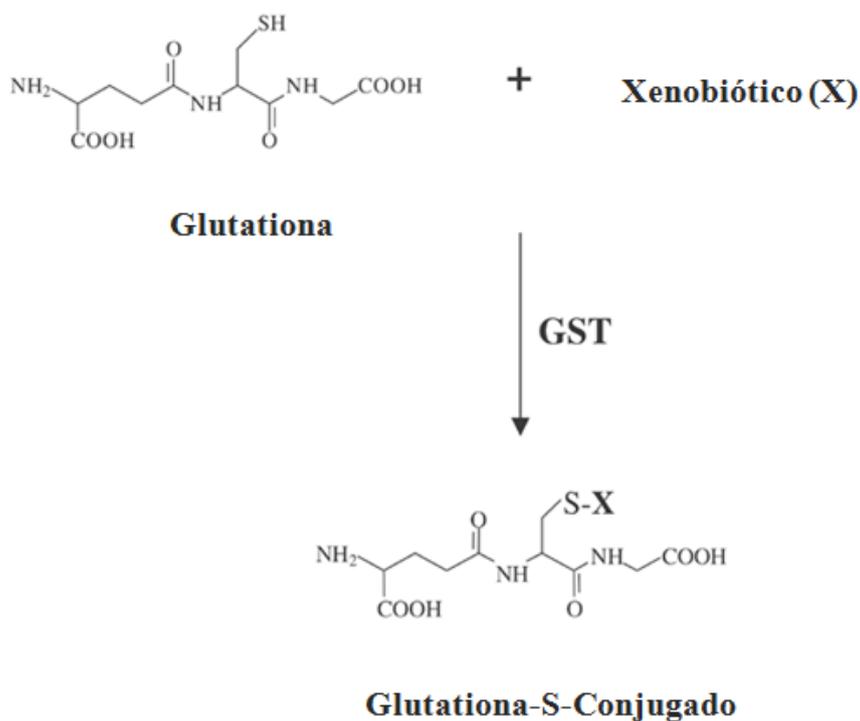


Figura 6 – Desintoxicação fase II: Mecanismo de destoxificação por Glutathiona S- Transferases, onde a Glutathiona se associa com o xenobiótico mediado pela transferase (GST) formando um conjugado que é excretado pelo organismo.

Fonte: Adaptada de Townsend 2003

2.5 Polimorfismo

No genoma humano há pelo menos 3,1 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Para entender a base mecanicista pela qual um polimorfismo está associado a um fenótipo particular ou a um resultado comportamental, é necessário saber se esse polimorfismo é funcional, ou seja, se altera a função de um gene ou conjunto de genes. Na maioria dos casos, a função de um polimorfismo associado não é definida e deve ser suposta ou extrapolada como um efeito no gene que contém este polimorfismo. Em casos raros, um polimorfismo pode ser uma variação na região codificadora não sinônima que altera a estrutura da proteína do produto gênico (ALBERT, 2011). Os polimorfismos mais comuns são potenciais polimorfismos reguladores localizados em regiões não codificantes, incluindo regiões promotoras que podem afetar a transcrição e em regiões intrônicas e não traduzidas transcritas como RNA que podem afetar a transcrição, edição (splicing) de RNA, estabilidade ou translação (ALBERT, 2011).

A principal causa da variabilidade genética são as mutações. Mutações são alterações que ocorrem em alguns indivíduos com baixa frequência (menos que 1%). Estas, ao se perpetuarem com frequência acima de 1% na população (são comuns nas populações), passam a ser reconhecidas como polimorfismos genéticos. Alguns polimorfismos podem ser utilizados como marcadores e os STR (*short tandem repeat*), ou microssatélites, são os mais comumente aplicados em testes de paternidade por DNA (FRIDOLFSSON; GYLLENSTEN; JAKOBSSON, 2004; PEREIRA et al., 2009).

Algumas das variações encontradas nas diferentes espécies são causadas por polimorfismos genéticos como o dimorfismo sexual, a evolução para a reprodução sexuada que leva ao aumento da diversidade populacional. Ou os tipos sanguíneos, o sistema humano ABO são polimorfismos genéticos onde as variações alélicas de um único locus geram quatro fenótipos possíveis (A, B, AB e O). Pesquisas mostraram que essa variação se manteve devido à resistência de fenótipos distintos a diferentes doenças (CROW, 1993).

O polimorfismo dos genes *GSTP1* (rs1695) é uma transição G313A, troca da base nitrogenada guanina (G) pela adenina (A) na posição 313, causando uma troca de isoleucina para valina e essa mutação cria sítios de enzimas resultando em 2 fragmentos (MOYER et al., 2008). O *CYP1A1m1* (rs4646903), uma transição T6235C em uma região não codificante, 250 bp a jusante do local de poliadenilação, e *m2* (rs1048943), uma transição A4889G no exon 7 levando à troca de isoleucina por valina (WU et al., 2013). O rs é o número correspondente a um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) específico (NCBI, 2023).

2.6 Epigenética

Epigenética estuda as alterações hereditárias na atividade e expressão gênica que ocorrem sem alteração na sequência de DNA (BIRD, 2007). Os eventos epigenéticos são uma característica do câncer humano. Eventos epigenéticos, como a metilação do DNA levam à alteração da expressão gênica, resultando em controle alterado da proliferação celular (NARAYAN et al., 2003). A metilação do DNA é uma rotulagem epigenética hereditária que envolve a transferência de um grupo metil para o carbono 5 da citosina no DNA (JIN; LI; ROBERTSON, 2011). A hipermetilação aberrante de DNA em cânceres geralmente ocorre em ilhas CpG, que são regiões do DNA ricas em dinucleotídeos CpG.

As regiões promotoras são geralmente enriquecidas com dinucleotídeos CpG (TAN et al., 2009). As ilhas CpG de genes supressores de tumor que normalmente não são metilados são alvos potenciais de hipermetilação aberrante durante a tumorigênese (TAN et al., 2009; THOMPSON et al., 2015; UEKI et al., 2000). A metilação é uma das modificações epigenéticas mais estudadas em mamíferos. Geralmente é removida durante a formação do zigoto e depois restabelecida em torno do estágio de implantação (JIN; LI; ROBERTSON, 2011; KULIS; ESTELLER, 2010; THOMPSON et al., 2015). Essas mudanças são reversíveis, no entanto, são muito estáveis e têm um grande impacto na regulação da expressão gênica (LUCZAK; JAGODZIŃSKI, 2006). Uma vez que esses padrões de metilação do DNA são adquiridos no estágio inicial do embrião, são herdados e mantidos em gerações sucessivas de células (TAN et al., 2009). A hipermetilação do DNA pode inibir a transcrição de genes supressores de tumor e de reparo (por exemplo, *P16*, *RB*, *VHL* e *hMLH1*), fornecendo um mecanismo epigenético de seleção durante a tumorigênese (THOMPSON et al., 2015; UEKI et al., 2000).

A DNA-Metiltransferase é responsável pelo padrão de metilação. Sabe-se que a inativação de alguns genes supressores de tumor ocorre por hipermetilação das regiões promotoras. Estas hipermetilações têm o mesmo efeito que uma mutação na região promotora dos genes, e alguns estudos os chamam de mimetismo (KULIS; ESTELLER, 2010; LUCZAK; JAGODZIŃSKI, 2006).

Recente trabalho vem analisando a possibilidade de modificação de alterações epigenéticas com alimentação e uso de alguns fármacos (DAI; RAMESH; LOCASALE, 2020). Muitos estudos sobre epigenética, principalmente sobre metilação, são feitos visando o tratamento personalizado dos casos de câncer, uma vez que diferentes alterações respondem de forma diferenciada a diferentes tipos de tratamento e diferentes quimioterápicos (JUNG et al., 2020; VILLANUEVA; ÁLVAREZ-ERRICO; ESTELLER, 2020). Estudos nessa área também são importantes, pois diferentes padrões de metilação podem levar a um resposta oposta do esperado com a medicação de escolha, inclusive apresentando toxicidade (VILLANUEVA; ÁLVAREZ-ERRICO; ESTELLER, 2020). Já foi comprovado que a metilação de determinado gene em um tipo tumoral pode prever o prognóstico do paciente em relação ao tratamento (CHEN; WANG; SHEN, 2013; RAO; QUDDUSI; SHAMIM, 2018).

2.7 P14^{ARF}

O p14ARF é um produto protéico de quadro de leitura alternativo do gene *CDKN2A* (SHERR, 2006b). A p14ARF é induzida em resposta à estimulação mitogênica elevada, como a sinalização de crescimento aberrante de MYC e Ras (proteína). Acumula-se principalmente no nucléolo onde forma complexos estáveis com outras proteínas. Essas interações permitem que a p14ARF atue como um supressor de tumor inibindo a biogênese do ribossomo ou iniciando a parada do ciclo celular dependente de p53 e apoptose, respectivamente (ABIDA; GU, 2008; SHERR, 2006a). A p14ARF é uma proteína atípica, em termos de sua transcrição, composição de aminoácidos e sua degradação: é transcrita em um quadro de leitura alternativo de uma proteína diferente, e é altamente básica (SHERR, 2006b).

O transcrito p14ARF foi identificado, pela primeira vez, em humanos em 1995 (MAO et al., 1995; STONE et al., 1995). Seu locus gênico está no braço curto do cromossomo 9 (SHERR, 2006b).

Embora as proteínas INK4a (p16) e ARF (p14) sejam estrutural e funcionalmente diferentes, ambas estão envolvidas na progressão do ciclo celular. Juntos, seu amplo papel inibitório pode ajudar a combater os sinais oncogênicos. O INK4a inibe a proliferação indiretamente permitindo que o gene de retinoblastoma (Rb) permaneça associado a fatores de transcrição de E2F. Estas proteínas INK4 inibem diretamente as quinases CDK4 e CDK6 dependentes de ciclina D (MAO et al., 1995). O ARF está envolvido na ativação do p53, inibindo HDM2 (SHERR, 2001). HDM2 liga-se à p53, inibindo sua atividade transcricional. HDM2 também possui atividade de ligase de ubiquitina E3 em relação ao p53 e promove a exportação do núcleo da célula para o citoplasma para degradação. Ao antagonizar HDM2, o ARF permite a atividade transcricional da p53 que levaria à parada do ciclo celular ou à apoptose (Figura 7). Uma perda de ARF ou p53, portanto, daria às células uma vantagem de sobrevivência (SHERR, 2006b). A ARF, no entanto, também inibe a proliferação em células sem p53 ou p53 e HDM2 (BERTWISTLE; SUGIMOTO; SHERR, 2004).

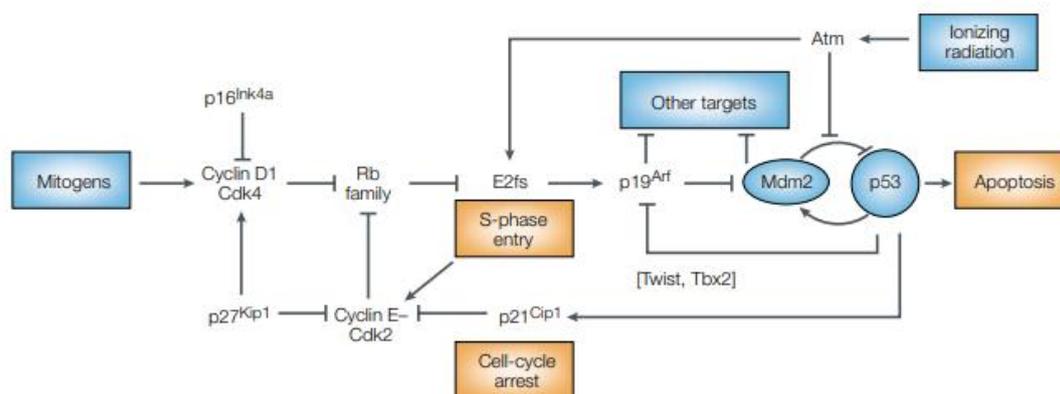


Figura 7 – Esquema de rede de sinalização de supressão tumoral: A sinalização mitogênica por meio de complexos dependentes de ciclina D ajuda a cancelar a supressão de Rb, liberando E2fs e estimulando a entrada na fase S do ciclo celular. Como a ciclina E é um gene responsivo a E2f, o programa transcricional de E2f também reforça a inativação de Rb. Quando expressa em níveis anormalmente altos, E2fs induz p14Arf, inibindo Mdm2 e iniciando uma resposta transcricional de p53 que desencadeia apoptose ou parada do ciclo celular. Fonte: Adaptada de SHERR, 2001

No câncer gástrico foi mostrado que o silenciamento e a degradação de p14ARF por meio de Jab1 favorece a proliferação celular e diminui o nível de apoptose das células tumorais (WANG et al., 2020), em tumores colorretais a perda de p14ARF foi associada com tumores mais avançados e a perda conjunta de p14ARF e USP10 estão associados com uma sobrevivência menor desses casos (KIM et al., 2020).

2.8 hTERT

A capacidade replicativa é uma das características mais críticas nas células cancerosas. Os telômeros protegem as extremidades dos cromossomos da degradação e das fusões ponta-a-ponta, contribuindo para a estabilidade genômica. A telomerase, uma DNA polimerase especializada, é responsável pela manutenção dos telômeros, mas sua atividade está ausente na maioria dos tecidos somáticos normais. Esse papel diferencial torna a telomerase e seus mecanismos reguladores bons biomarcadores de câncer (LEÃO et al., 2018).

Os telômeros são os complexos nucleoprotéicos localizados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos. Os telômeros consistem em 5 a 20kb da sequência repetitiva do DNA hexanucleotídeo TTAGGG (DNA telomérico), (BLACKBURN, 1991;

MOYZIS et al., 1988). As repetições do DNA telomérico são seguidas por um terminal 3' ricos em Guanina de fita simples formando um loop telomérico (T-loop), que fornece proteção à ponta 3' (DE LANGE, 2005). O DNA telomérico é mascarado com capas protetoras e esses complexos permitem que o mecanismo de reparo de danos no DNA (DDR) distinga o DNA telomérico dos danos no DNA genômico. Ao longo da vida celular, o DNA telomérico é encurtado após cada ciclo replicativo devido ao “problema de replicação final”, dano oxidativo, idade e estilo de vida (incluindo dieta, tabagismo, ambiente profissional e estresse), (HARLEY, 1991; LEÃO et al., 2018; SHAMMAS, 2011). O encurtamento dos telômeros leva a um estágio de parada do crescimento celular (GORBUNOVA; SELUANOV; PEREIRA-SMITH, 2002). Quando nesse estágio, a célula é sinalizada para iniciar o processo de senescência celular que levará à morte celular, no entanto em alguns casos a célula pode driblar esse processo e as fases de checagem do ciclo celular e ativar a telomerase levando à imortalidade celular com a replicação contínua dos telômeros, como acontece na maioria dos cânceres (GORBUNOVA; SELUANOV; PEREIRA-SMITH, 2002; LEÃO et al., 2018).

A telomerase é uma enzima que consiste em um grande complexo ribonucleoprotéico responsável pela síntese progressiva de repetições de DNA telomérico. A telomerase é uma DNA polimerase, que consiste de duas subunidades diferentes: uma subunidade de proteína catalítica funcional chamada transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) codificada pelo gene *TERT*, posicionada no cromossomo 5p15.33; e um componente de RNA conhecido como componente de RNA da telomerase humana (hTERC ou hTR), codificado pelo gene *TERC* na região cromossômica 3q26. Mutações no gene *TERC* foram encontradas em tumores em estágios iniciais e tardios, o que é consistente com a possibilidade de que desempenhem um papel no início da tumorigênese (CHIBA et al., 2017; LEÃO et al., 2018)

Apesar da extensa pesquisa sobre essas proteínas, a estrutura tridimensional da telomerase humana ainda não foi completamente compreendida. Entretanto, sabemos que apenas hTERC e hTERT são necessários para o restabelecimento da atividade da telomerase (LEÃO et al., 2018).

A expressão de mRNA da hTERT é estritamente controlada e intimamente associada à atividade da telomerase, o que sugere que a hTERT é o principal determinante

para a atividade da enzima (AKINCILAR; UNAL; TERGAONKAR, 2016; LEÃO et al., 2018). A hTERC atua como um modelo para a síntese do DNA telomérico e, diferentemente da hTERT, é expressa de maneira onipresente em todos os tecidos. Portanto, tem sido considerado por alguns autores como um fator não limitante da atividade da telomerase. No entanto, outro estudo realizado em células HT1080, derivadas do fibrossarcoma, revelou que a hTERC é mais abundante nos tumores do que nas células normais com o seu locus amplificado e é essencial para a atividade da telomerase e pode ser um fator limitante (CRISTOFARI; LINGNER, 2006).

A regulação da hTERT é um processo multifacetado que ainda não foi totalmente entendido quando os mecanismos transcricionais e pós-transcricionais estão envolvidos. Estes incluem pré-mRNA *splicing* alternativo do gene *hTERT*, que foi encontrado para estar envolvido na regulação da atividade telomerase e tem sido associado com diagnóstico, prognóstico e parâmetros clínicos de câncer (LEÃO et al., 2018).

Em meningiomas a atividade da telomerase e a frequência de mutação se mostram alteradas, assim como tem alta relação com prognóstico.(STÖGBAUER et al., 2020). Estudos recentes também mostram que a metilação da região promotora da *hTERT* induz a formação do carcinoma de pequenas células de pulmão, assim como está relacionada com a resistência à quimioterapia (ZHAI et al., 2020). Recentemente, também foi encontrada relação da infecção por HPV e expressão de hTERT em mulheres com câncer cervical (MORENO-ACOSTA et al., 2020).

2.9 MGMT

O gene *MGMT*, também conhecido como *AGT* e *AGAT*, é um dos componentes do sistema de reparo do DNA, codifica a O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). Esta é uma das mais importantes proteínas de reparo do DNA, específica para correção da incorporação de radicais CH₃ (metil) na base guanina que leva à formação da base metilada O6 –metilguanina. A DNA metiltransferase de O6-metilguanina é crucial para a estabilidade do genoma. Ele repara a lesão natural do DNA mutagênico O6-metilguanina de volta à guanina e evita erros de emparelhamento e erros durante a replicação e transcrição do DNA. (CORDEIRO et al., 2012; SHIRAIISHI; SAKUMI; SEKIGUCHI, 2000; TANO et al., 1990).

A menor transcrição da proteína MGMT reduz a capacidade de correção dos erros de pareamento de bases decorrentes da hipermetilação. A menor capacidade de reparo aumenta a possibilidade de surgirem mutações capazes de formarem clones de células com autonomia proliferativa e resistência à apoptose, as principais características das células neoplásicas (CORDEIRO et al., 2012).

A utilização de substâncias com poder alquilante (capazes de transferir radicais CH₃ para bases do DNA) para induzir a apoptose das células neoplásicas, é uma das estratégias mais antigas empregadas para o tratamento quimioterápico do Câncer Colorretal . Essas drogas incorporam radicais CH₃ na base guanina, formando grandes quantidades de O₆-metilguanina que por exceder a capacidade dos sistemas de reparo do DNA, induz a apoptose celular (ISSA, 2004; SABHARWAL et al., 2010). Essa possibilidade ficou mais evidente quando se demonstrou que o aumento do conteúdo tecidual da proteína MGMT, pela maior remoção da guanina oxidada, encontrava-se relacionado à menor resposta terapêutica ao tratamento quimioterápico (CORDEIRO et al., 2012; SABHARWAL et al., 2010).

A associação de substâncias que inibem a proteína *MGMT* aumentaram significativamente a resposta a essas drogas. É possível que a importância da expressão tecidual do gene *MGMT* na resposta aos quimioterápicos possa estar relacionada ao papel desempenhado pelos genes de reparo no ciclo celular (CORDEIRO et al., 2012).

Em glioblastomas o status de metilação de *MGMT* é um marcador preditivo para resposta a quimioterápicos, sua metilação está associada a uma melhor resposta ao tratamento com temozolomida (CHEN et al., 2013; RAO; QUDDUSI; SHAMIM, 2018). Um recente estudo mostrou que no câncer gástrico, *MGMT* está relacionado com o processo de autofagia que aumenta a resistência a quimioterápicos (LEI et al., 2020).

3. Justificativa

Este projeto faz parte de uma das linhas de estudo do nosso grupo que visa compreender as bases moleculares da heterogeneidade tumoral. Escolhemos como modelo de estudo o tumor sólido pseudopapilar do pâncreas por se tratar de uma neoplasia rara e com potencial de malignização. Participei de dois trabalhos iniciais, onde no primeiro analisamos alterações epigenéticas e polimorfismos dos genes *GSTT1/GSTM1*

em três regiões distintas do tumor e observamos heterogeneidade molecular entre as regiões estudadas, tanto em relação ao padrão epigenético para o gene associado à malignização, quanto ao polimorfismo das enzimas de fase 2 (CHAGAS et al., 2018a). No segundo trabalho, essas mesmas amostras foram confrontadas com os marcadores de rotina de diagnóstico por imunohistoquímica versus uma técnica de proteômica, para o conjunto de proteínas em cada região. Os achados de heterogeneidade intratumoral foram confirmados (CHAGAS et al., 2018b).

4. Objetivos

4.1 Objetivo Primário

Estudar a heterogeneidade molecular da neoplasia sólida pseudopapilar do pâncreas.

4.2 Objetivos Secundários

1. Estudar a biologia molecular de três regiões macroscopicamente distintas da NSPP em uma amostra não fixada em formol:

A - Analisar o polimorfismo de enzimas fase 1, *CYP1A1* e *CYP1A2* e da enzima de fase 2, *GSTP1*

B - Estudar a metilação na região promotora dos genes *P14*, *GSTP1*, *hTERT* e *MGMT*.

5. Material e Métodos

5.1 Tipo de estudo

O trabalho em questão trata-se de um estudo de caso.

5.2 Período do Estudo

O estudo foi realizado no período entre 2018 e 2023.

5.3 Local do estudo

Esse trabalho foi realizado em colaboração com os Professores Vera Chagas e Fernando Rosman e com o Dr. Marcelo Mota, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina (UFRJ), no Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF/UFRJ, além das professoras Mariana Chantre e Gilda Alves no Centro Biomédico da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

5.4 Amostras

O estudo da biologia molecular foi realizado na amostra correspondente ao tumor de uma paciente do sexo feminino com 12 anos de idade, com queixa de dor em hipocôndrio direito e náuseas que começaram um mês antes da admissão no hospital. O exame físico revelou uma massa palpável no hipocôndrio direito, com contorno bem definido, dolorosa à palpação. A tomografia computadorizada do abdome havia massa expansiva, heterogênea e arredondada na cabeça do pâncreas. A lesão era predominantemente sólida, não homogênea, sugestiva de NSPP e media aproximadamente 6,7 cm (T) × 6,3 cm (AP) × 6,4 cm (L) (Figura 8).

Paciente foi submetida à cirurgia de Whipple no Serviço de Cirurgia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brasil. A peça cirúrgica foi encaminhada ao Serviço de Anatomia Patológica do referido hospital. À macroscopia, media cerca de 6 cm de diâmetro e era encapsulada (Figura 9). Aos cortes, apresentava coloração branco-amarelada, com áreas de aspecto granuloso ou ainda hemorrágicas. Do material a fresco (não fixado em formalina) foram retiradas amostras de três regiões diferentes: da região central, de aspecto hemorrágico, da região intermediária, com aspecto granuloso, e da região periférica, de aparência sólida (CHAGAS et al., 2018a).



Figura 8 – Tomografia computadorizada do abdome de paciente: Com contraste arterial, mostrando corte transversal da cabeça do pâncreas com massa arredondada e heterogênea, predominantemente sólida, medindo 6,7 cm (Transversal) \times 6,3 cm (Anteroposterior) \times 6,4 cm (Longitudinal), com contraste discreto e heterogêneo. As áreas 1, 2 e 3 são as áreas topográficas onde amostras de tecido fresco foram coletadas para a análise epigenética. Fonte: Adaptado de CHAGAS et al., 2018b

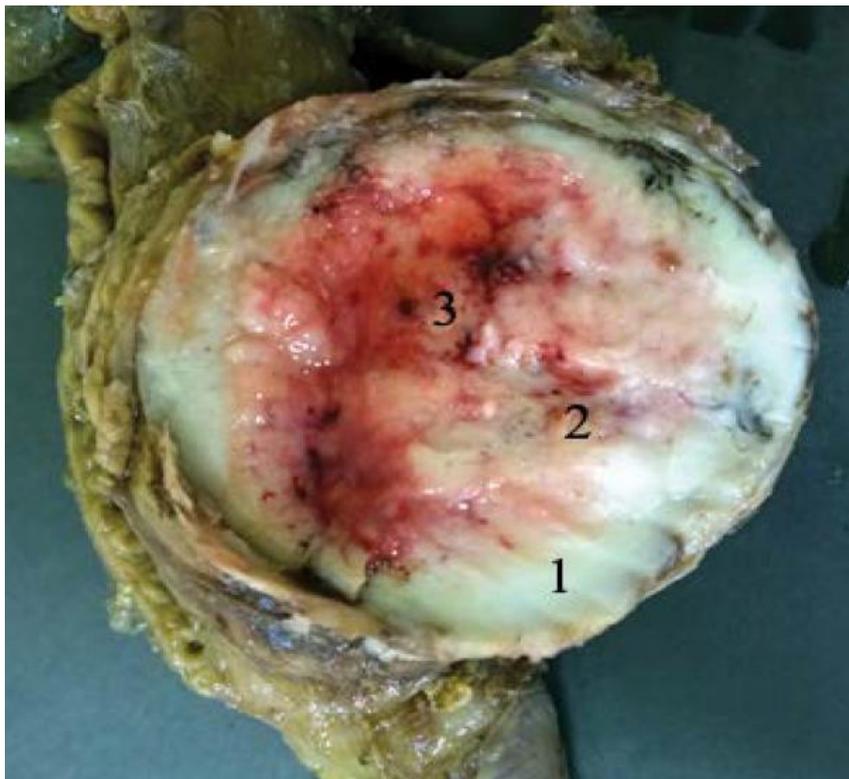


Figura 9 – Macroscopia da NSPP, não fixada em formalina. Massa arredondada localizada na cabeça do pâncreas, após ressecção, seccionada. Apresenta limites regulares e superfície esbranquiçada, predominantemente sólida (1), com áreas granulosas (2) e outras avermelhadas, hemorrágicas (3). Das diferentes regiões assinaladas, foram retiradas as amostras para a análise molecular.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF da UFRJ (# 64915717.0.0000.5257).

5.5 Extração de DNA

Os fragmentos do tumor obtidos a fresco das três áreas macroscopicamente distintas foram colocados em 200 μ L de tampão de lise celular (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 10mM; NaCl 10mM; SDS 2%) e 15 μ L de proteinase K a 10 mg/mL. O material foi transferido para tubo tipo eppendorf de 1.5 mL e incubados por duas horas a 56°C. Após a incubação foram acrescentados 200 μ L de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) a cada tubo, e os tubos agitados por cerca de um minuto. Depois da agitação os tubos foram centrifugados a 7168 RCF durante 5 minutos. Em seguida foi retirada a fase aquosa (fase superior) de cada tubo e transferida para outro tubo onde foram acrescentados 15 μ L de NaCl 5M e 400 uL de etanol a 95%, misturando-se o conteúdo do tubo por inversão. O material foi, então, incubado a -20°C por 12 horas e,

posteriormente, centrifugado durante 20 minutos, a 7168 RCF Após esta centrifugação, o sobrenadante, de cada tubo, foi aspirado e, os tubos, foram mantidos abertos, para secagem, à temperatura ambiente. Por fim, o sedimento de DNA foi ressuspensão em 12µL de água pura e estocado a -20°C, para uso posterior. A concentração de DNA foi feita em aparelho Nanodrop da Thermo (Figura 10).

5.6 Técnicas aplicadas

5.6.1 Teste de funcionalidade do DNA por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi amplificado o exon 5 do gene codificante da proteína p53. Foram utilizados 0,05 µg de DNA, 0,2 µM de *primers* (direto (D): 5' GCAACCAGCCCTGTCGTGTCTCCA 3' e reverso (R): 5' GGAATTCTGTTCACTTGTGCCCTGACTTTCAAC 3'); 0,2 mM de cada dNTP 1,5 mM MgCl₂, 1,0 unidade de Taq polimerase e 5 µL de tampão da enzima (10X *buffer*) para um volume de reação de 50 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação a 94° C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C, 1 minuto, 64°C, 1 minuto, 72°C, 1 minuto. A extensão final foi feita a 72°C durante 5 minutos. O tamanho do produto amplificado é de 274 bp (pares de base), (SILVA et al., 2013).

5.6.2 Polimorfismo

O polimorfismo nos genes, *GSTP1* (rs1695), *CYP11B1* (rs4646903) e *CYP11B2* (rs1048943) foi detectado através de Reação em Cadeia pela Polimerase do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando a técnica de RFLP, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida. Para a amplificação foi utilizada a metodologia descrita por Joseph e colaboradores (JOSEPH et al., 2006), com algumas adaptações (SILVA et al., 2013), nos genes *CYP*, e de Sá e colaboradores, para o gene *GSTP1* (SÅ et al., 2014), (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de *Primers*, temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos e enzimas de restrição das análises de polimorfismo

Gene	Primer	Anelamento (°C)	Tamanho do Fragmento	Enzima
<i>CYP1A1m1</i>	D: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT R: TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT	64°C	200 e 140 bp homozigotos 340,140 e 200 bp heterozigotos	MspI
<i>CYP1A1m2</i>	D: GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT R: CCAGGAAGAGAAAGACCTCCCAGCGGGCCA	64°C	232 bp selvagem e 263 bp variante	NcoI
<i>GSTP1</i>	D: TCCTTCCACGCACATCCTCT R: AGCCCCTTTCTTTGTTTCAGC	68°C (primeiros 20 ciclos) 51°C (10 ciclos finais)	294pb, 234pb e 60pb	BsmAI

5.6.3 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo: 4,44 mL de H₂O; 2,0 mL de TBE 5x; 3,32 mL de (30:0,8) Acrilamida-Bisacrilamida; 240 µL de 10% AMP e 3 µL de TEMED). A cada 10 µL de produto amplificado de DNA foram adicionados 3 µL de tampão de amostra (Ficoll a 5%, 25% azul de bromofenol) e essas misturas foram aplicadas no gel de poliacrilamida. A eletroforese foi feita a 80 V.

Após a corrida, o gel foi impregnado com nitrato de prata. Inicialmente o gel é imerso na solução fixadora (5 mL de etanol, 0,4 mL de ácido acético, 45 mL de água destilada) por 10 minutos. Em seguida a solução fixadora é retirada e o gel é imerso na solução de prata (0,1 g de AgNO₃, 50 mL de água destilada) por 10 minutos (impregnação pela prata) e por fim, após lavagem, com 50 mL de água destilada, o gel é revelado em solução de revelação (1,5g de NaOH, 0,4 mL de formaldeído 37%, 50 mL de água destilada). A revelação é interrompida pela solução fixadora.

O tamanho aproximado dos fragmentos amplificados foi estimado utilizando-se o marcador de peso molecular *100 Base Pair Ladder* (Pharmacia Biotech, EUA).

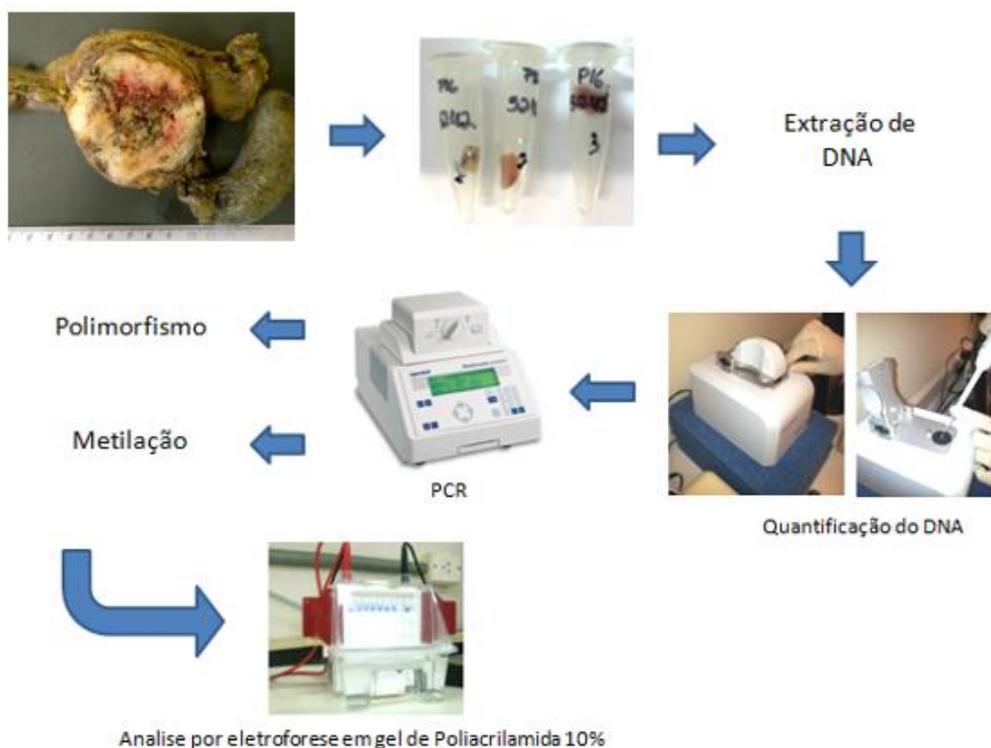


Figura 10 – Fluxo de processamento e análise das amostras de NSPP: Esquema com resumo do processo de análise molecular utilizados nas amostras. Primeiro temos uma imagem do tumor de onde foram extraídos os fragmentos das três regiões seguindo para extração de DNA e logo após a quantificação desse material. O material preparado seguiu para os testes de polimorfismo e de metilação através do PCR, que foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. (Figura de autoria própria)

5.6.4 Metilação

Para analisar o estado de metilação dos sítios CpGs da região promotora dos genes que codificam *p14^{ARF}*, *h-TERT*, *MGMT* e *GSTP1*, 1µg do DNA genômico das células das amostras foi tratada com o reagente químico bissulfito de sódio e depois analisado pelo método MSP (do inglês, *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica é baseada no princípio de que as sequências de DNA de regiões genômicas metiladas e desmetiladas, após o tratamento com o bissulfito de sódio e podem, assim, ser distinguidas por PCR sequência-específica (Figura 11). Foi utilizado o EZ DNA Methylation Kit (The Epigenetics Company) conforme as instruções do fabricante. Neste

procedimento, o DNA tratado foi utilizado como modelo para a amplificação por PCR, utilizando iniciadores específicos para os genes *hTERT*, *MGMT*, *P14^{ARF}* e *GSTP1*, DNA metilado e desmetilado. Para a amplificação, 4 µL de DNA tratado foi adicionado a 50 µL de volume final de mistura de reação, contendo 1 X Tampão de PCR, dNTPs (1,25 mM cada), *primers* (300 ng cada por reação), 1,5 mM MgCl₂, e 1,25 unidades de Taq polimerase. Ambas as amplificações foram realizadas no termociclador (Eppendorf). O protocolo para a análise de *MGMT*: 5 minutos de desnaturação inicial a 96°C, 35 ciclos a 95°C, a 55°C e a 72°C por 1 minuto, cada temperatura, seguidos de uma etapa final de alongamento a 72°C, por 7 minutos. As sequências dos iniciadores para avaliação dos genes por MSP estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de *Primers*, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos das análises de metilação

Gene	Primers	Anelamento (°C)	Tamanho do Fragmento (bp)
<i>GSTP1</i> M	D: TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC R: GCCCCAATACTAAATCACGACG	55°C	91
<i>GSTP1</i> U	D: GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT R: CCACCCAATACTAAATCACAACA	55°C	97
<i>hTERT</i> M	D:GAGGTATTTTCGGGAGGTTTCGC R:ACTCCGAACACCACGAATACCG	62°C	121
<i>hTERT</i> U	D: GGGAGGTATTTTGGGAGGTTTTGT R:CAAACCTCAAACACCACAAATACCA	62°C	126
<i>P14^{ARF}</i> M	D:TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT R: CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	60 °C	122
<i>P14^{ARF}</i> U	D: GTGTAAAGGGCGGCGTAGC R: AAAACCCTCACTCGCGACGA	60 °C	132
<i>MGMT</i> M	D: TTCGACGTTCGTAGGTTTTTCGC R: GCACTCTCCGAAAACGAAACG	59°C	80
<i>MGMT</i> U	D: TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT R:AACTCCCACTCTTCCAAAAACAAAACA	59°C	94

A análise de PCR específica de metilação (MSP) foi utilizada para determinar o estado de metilação, como descrito anteriormente, por modificação pelo bissulfito (Figura 11) dos genes *P14^{ARF}* (ESTELLER et al., 2000), *GSTP1* (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al., 2001), *hTERT* (HARAGUCHI et al., 2017) e *MGMT* com pequena alteração na ciclagem (anelamento a 55 °C, mostra melhores resultados), (ROSAS et al., 2001).

Para todas as análises, os produtos amplificados foram detectados por 10% de gel de poliacrilamida de eletroforese, utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Pharmacia Biotech, EUA).

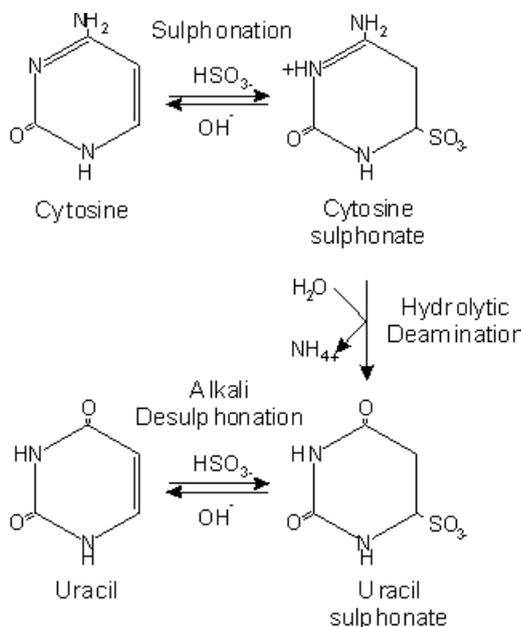


Figura 11 - Conversão pelo bissulfito de citosinas não metiladas. As citosinas não metiladas passam por uma sulfonação em seguida o produto dessa reação sofre uma desaminação e logo em seguida uma desulfonação gerando como produto final uma Uracila

Fonte: Adaptado de Google Imagens

(http://www.methods.info/Methods/DNA_methylation/Bisulphite_sequencing.html)

6. Resultados

A análise de PCR-RFLP revelou *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* com genótipo de tipo selvagem (Figura 12), enquanto *GSTP1* mostrou genótipo heterozigoto (Figura 13). As três regiões do tumor mostraram o mesmo resultado representado pela área 2 na Figura 13.

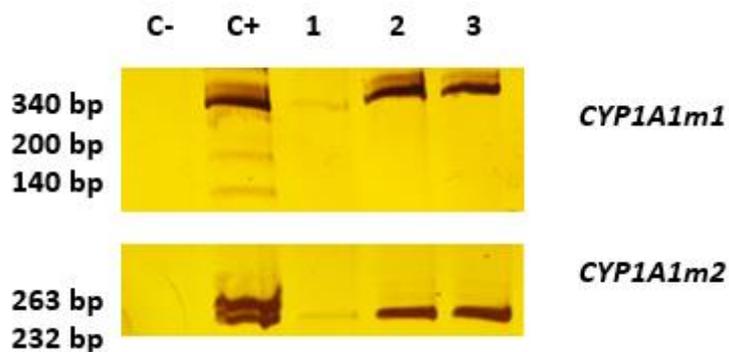


Figura 12 - Análises de PCR-RFLP para *CYP1A1 m1* e *m2*. Análises do polimorfismo de *CYP1A1 m1* e *m2* nas três áreas tumorais e uma amostra previamente conhecida usada como controle positivo. As três áreas mostram um fragmento único que representa a não digestão para as enzimas *MspI* e *NcoI* para as variações *m1* e *m2*, respectivamente. Na área 1, as bandas eram mais fracas, mas ainda é possível ver o resultado. Nenhuma das amostras apresentou polimorfismo para CYP.

Nota: Bp = pares de base

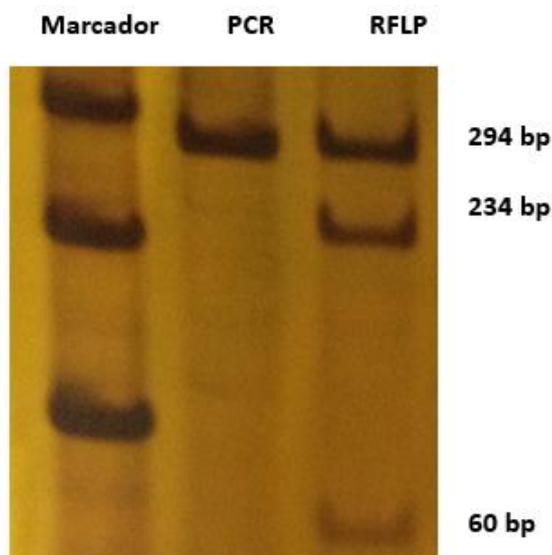


Figura 13 – Análise de PCR-RFLP de *GSTP1*: Análise do polimorfismo *GSTP1* representativo da área tumoral 2 mostrando genótipo heterozigoto (294/234/60 pb), as outras duas áreas tumorais mostraram o mesmo resultado da área 2. Bp- pares de bases

Em relação à análise de metilação, foi observada a presença de metilação nas três áreas tumorais para os genes *hTERT* e *PI4ARF* (Figura 14). Para *GSTP1*, apenas as regiões 1 e 2 mostraram metilação (Figura 14), enquanto que para *MGMT* a metilação foi

indetectável nas três regiões. Em 2 e 3, a banda não metilada foi representada. Embora o experimento tenha sido repetido várias vezes, nenhuma banda foi evidenciada no fragmento 1 (Figura 15).

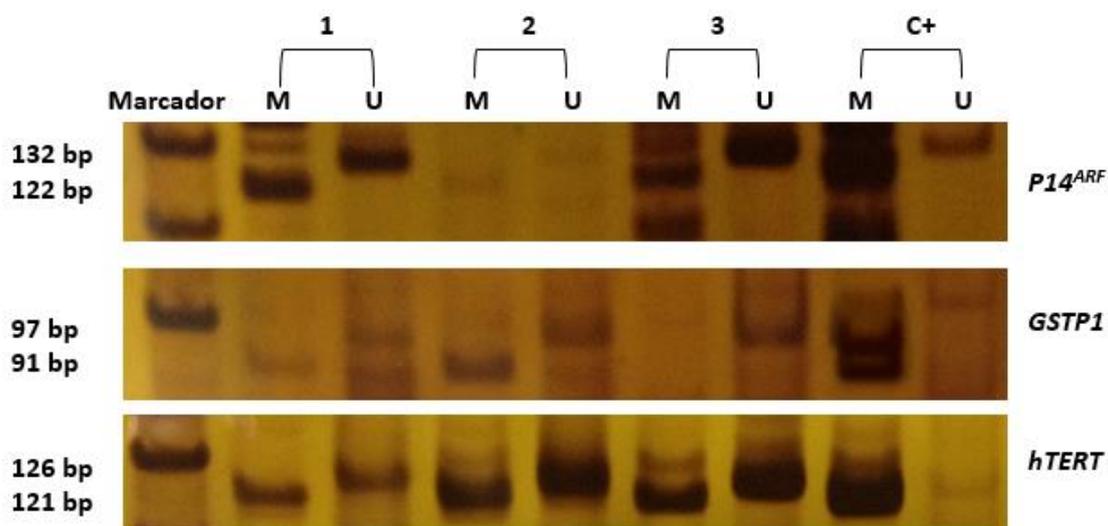


Figura 14 - Resultados das análises de metilação dos genes *hTERT*, *P14^{ARF}* e *GSTP1*: Na amostra 2 para o gene *P14^{ARF}*, as bandas eram mais fracas, mas foi possível observar uma banda metilada. Controle positivo (Universal Methylated Human DNA Standards - Zymo Research, Cat. Number: D5011). Marcador: 50 sc.

Nota: M = metilado; U = não metilado; bp = pares de bases

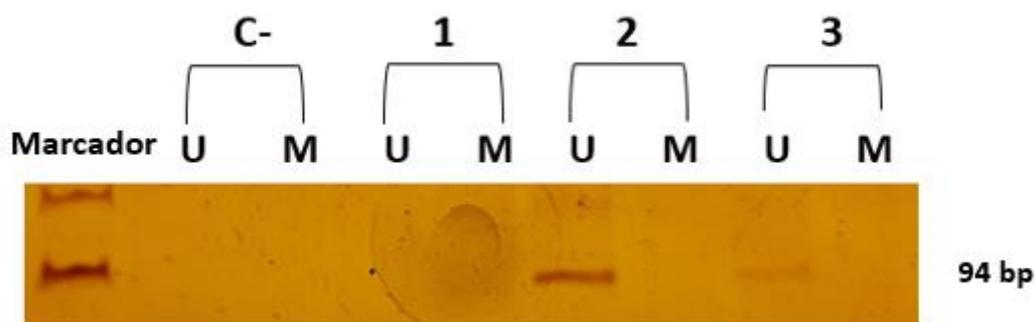


Figura 15 - Resultados das análises de metilação do gene *MGMT*: Na amostra 1 não foi possível ver nenhuma banda e na amostra 3 a banda era mais fraca, mas ainda visível. As amostras 2 e 3 mostram apenas bandas não metiladas como resultado.

Nota: M = metilado; U = não metilado.

7. Discussão

O objetivo primário desse estudo foi analisar a heterogeneidade molecular do NSPP que está amplamente relacionada com a terapia medicamentosa (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013). Até onde sabemos, é a primeira vez que as análises do estado de metilação e do polimorfismo são feitas para os genes abordados no presente estudo em NSPP.

A heterogeneidade tumoral refere-se à existência de subpopulações de células, com genótipos e fenótipos distintos que podem levar a diferentes comportamentos celulares (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013). Os tumores se desenvolvem por meio de um processo evolutivo, durante a expansão da população celular, a heterogeneidade intratumoral surge como consequência de erros de replicação do DNA provocados por mudanças aberrantes no microambiente tumoral. Essas alterações tumorais também pode ser causadas por resultado de intervenção terapêutica que aumenta a pressão seletiva a favor de subpopulações resistentes (EL-SAYES; VITO; MOSSMAN, 2021; REITER et al., 2019). Essas alterações no DNA levam ao aumento da proliferação celular, evasão e supressão do sinal de morte celular. Ao final desse processo, temos a conversão de uma célula não maligna em maligna (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

O reconhecimento da possibilidade de cânceres originários do mesmo órgão abrigarem um espectro de alterações oncogênicas e supressoras de tumor entre os indivíduos, direcionou pesquisas a tentativa de compreensão da diversidade e a frequência das características moleculares patogênicas presentes em doenças malignas humanas comuns (BRADY et al., 2021).

A questão da heterogeneidade do tumor, incluindo as relações entre a subpopulação dentro e entre as lesões tumorais, pode ter implicações profundas para a terapia medicamentosa no câncer. A terapia direcionada, que tenta se concentrar no caminho crítico para o tratamento da doença, melhorou significativamente os resultados dos pacientes em uma variedade de tipos de tumor sólido, mas em casos de doença avançada, parece não ajudar todos os pacientes selecionados e, quando tem benefícios clínicos, são por um tempo limitado. Isso pode ser explicado pela heterogeneidade do tumor (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013). Em uma tentativa de combate aos mecanismos de resistência, as terapias frequentemente combinam uma abordagem

multifacetada para atingir várias vias simultaneamente (EL-SAYES; VITO; MOSSMAN, 2021). A NSPP é uma neoplasia rara e, portanto, os eventos moleculares precisam ser melhor explorados. No presente estudo, avaliamos os polimorfismos genéticos e o estado de metilação, de vias cruciais na formação de proliferação celular de tumores, em um caso pediátrico de NSPP para avaliar a heterogeneidade do tumor em três áreas tumorais distintas.

As enzimas CYP são responsáveis pelo metabolismo de muitos agentes quimioterápicos, e sua atividade demonstrou ser modificada por citocinas inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. As alterações no metabolismo do CYP podem causar alterações na resposta ao tratamento quimioterápico (CRAKE et al., 2021). Já foi demonstrado que a atividade e a expressão do CYP1A1 estão relacionadas à proliferação e sobrevivência das células tumorais (RODRIGUEZ; POTTER, 2013) e o polimorfismo desse gene de desintoxicação pode estar relacionado com a suscetibilidade a alguns tipos tumorais (HONMA et al., 2009; SINGH et al., 2007; WU et al., 2013). Fumantes com polimorfismo CYP apresentam taxas mais altas de mutações em P53, e a prevalência dos alelos polimórficos em câncer de pulmão são maiores na população asiática do que na população europeia e afro-americana (HONMA et al., 2009). O polimorfismo *m2* mostrou estar associado ao câncer de mama em mulheres na Índia (SINGH et al., 2007). Um possível envolvimento do polimorfismo de *CYP1A1m4* no câncer cervical também já foi demonstrado (WONGPRATATE et al., 2020). Um estudo recente mostrou eficiência no uso de CYP1A1 como mediador de um quimioterápico no tratamento de células cancerosas (ORTUZAR et al., 2021).

Alterações nos genes de CYP possuem grande impacto no desenvolvimento de cânceres diversos e na resistência a quimioterápicos como mostrado anteriormente. Sendo a NSPP uma neoplasia com baixa resposta a tratamentos medicamentosos; uma alteração nos genes *CYP* poderia estar relacionada com essa resistência. No entanto, no presente trabalho, na análise do polimorfismo nas amostras do material a fresco, as três regiões apresentaram o gene selvagem.

O polimorfismo em *CYP1A1*, *m1* e *m2*, e no gene *GSTP1* pode estar relacionado à suscetibilidade a alguns tipos de tumor e sua progressão (DENG et al., 2015; SAXENA et al., 2012). O polimorfismo em *GSTP1* foi anteriormente demonstrado resultar em menor atividade da enzima, capacidade de desintoxicação reduzida e afetar o prognóstico

e o tratamento de pacientes com câncer (DENG et al., 2015; SAXENA et al., 2012). O genótipo polimórfico GG também se mostrou menos estável do que o gene selvagem (DENG et al., 2015). No presente trabalho, os resultados mostraram que o gene é heterozigoto, possui um tamanho de banda correspondente ao tipo selvagem e as bandas correspondentes ao gene polimórfico, o que pode contribuir para aumentar a instabilidade molecular e facilitar o desenvolvimento neoplásico neste caso de NSPP.

A metilação também mostrou relações com a tumorigênese e a progressão do tumor (LASABOVA et al., 2010; SAXENA et al., 2012). A hipermetilação do promotor *GSTP1*, assim como o polimorfismo, afeta a atividade da enzima (SAXENA et al., 2012). Sua hipermetilação está relacionada ao câncer de mama invasivo e também é um evento precoce no câncer de mama (LASABOVA et al., 2010; SAXENA et al., 2012). Estudos recentes mostraram que polimorfismos e a metilação mediada por super expressão de outros genes em *GSTP* podem aumentar o risco de câncer de próstata (SANTRIC et al., 2020; ZHANG et al., 2020). No presente estudo, *GSTP1* apresentou metilação nas regiões 1 e 2, o que corrobora a heterogeneidade tumoral já apresentada em nossos trabalhos anteriores com essas amostras (CHAGAS et al., 2018a, 2018b). Portanto, a inativação epigenética de *GSTP1* pela metilação do DNA também pode ter contribuído para aumentar a instabilidade genômica e desencadear eventos neoplásicos em NSPP.

Em trabalhos anteriores no nosso grupo com o mesmo material utilizado para desenvolvimento deste estudo atual, o gene *GSTT1*, do mesmo grupo de genes de desintoxicação de *GSTP1*, apresentou deleção em umas das três regiões estudadas (CHAGAS et al., 2018a, 2018b). Essa recorrência de alterações nos genes GSTs poderia estar relacionada com a baixa eficácia de terapia medicamentosa nos casos de NSPP considerando a literatura já ter demonstrado que alterações nos genes GSTs afetam negativamente a capacidade de desintoxicação conforme dito anteriormente (DENG et al., 2015; SAXENA et al., 2012).

O gene *hTERT* está intimamente relacionado à tumorigênese. Vários estudos ao longo do tempo já demonstraram que sua ativação está relacionada ao processo de formação e progressão tumoral (CHIBA et al., 2017; DUCREST et al., 2002; STEWART et al., 2002). A ativação do promotor do gene *hTERT* é regulada por metilação em um domínio específico (AVIN; UMBRICHT; ZEIGER, 2016). No presente estudo, *hTERT*

mostrou hipermetilação detectável para todas as três áreas de NSPP, o que pode indicar que a expressão de *hTERT* está sendo regulada positivamente em NSPP.

Entretanto, já foi demonstrado que apesar da metilação de sua região promotora, o *hTERT* continua a ser expresso em alguns tipos de tumor (VALLS-BAUTISTA et al., 2011; ZINN et al., 2007). Estudos recentes mostraram que *hTERT* está relacionado com a capacidade de migração e invasão de células do câncer de mama e é um possível alvo terapêutico para câncer de tireoide (LIAO et al., 2020; SANYAL et al., 2020). Outros estudos já mostraram uma associação da metilação do *hTERT* com o potencial metastático (BOUGEL et al., 2013), sendo sua hipermetilação responsável pela ativação da atividade da telomerase (GUILLERET et al., 2002; NOMOTO et al., 2002), porém, em outros casos, também foi visto que isso não é suficiente para sua ativação (VALLS-BAUTISTA et al., 2011). Uma pesquisa recente mostrou que a regulação negativa de *hTERT* aumentou a sensibilidade de células de câncer de mama a duxorrubicina (ROMANIUK-DRAPAŁA et al., 2021), mostrando a relação de *hTERT* com a resistência tumoral. Estudo recente demonstrou a possibilidade de *hTERT*, combinado com mais dois marcadores, atuar como um marcador de câncer de bexiga (YAHYAZADEH et al., 2021). Com os resultados apresentados e informações presentes na literatura quanto a função de *hTERT* no desenvolvimento e resistência tumoral, maiores investigações são necessárias para estabelecer melhor a associação entre a metilação de *hTERT* e a sua expressão em NSPP.

P14ARF codifica uma proteína de supressão tumoral como *P16INK4* e, como na análise anterior realizada com o gene de P16 nas mesmas amostras (CHAGAS et al., 2018a), *P14ARF* mostrou metilação em amostras neoplásicas para as 3 áreas analisadas. É importante ressaltar que a metilação de *P14ARF* mostrou um sinal fraco na área intermediária do tumor (área 2) em comparação com as regiões periférica (área 1) e central (área 3). A metilação do *P14ARF* pode estar relacionada à localização do tumor, chances de desenvolver displasias e tumorigênese (MORIYAMA et al., 2007; ZHOU et al., 2016). Em câncer gástrico, o silenciamento de P14ARF mediado por Jab1 leva ao aumento da proliferação celular (WANG et al., 2020). Embora no mesmo locus, a metilação de p14ARF e p16INK4A pode ocorrer independentemente (ESTELLER et al., 2000). Essa diferenciação nos padrões de metilações de dois genes do mesmo locus entre

as três áreas analisadas, reforçam heterogeneidade tumoral já encontrada nas amostras nos polimorfismos e em trabalhos anteriores (CHAGAS et al., 2018a, 2018b).

De forma macroscópica era possível de ser observado na amostra características únicas de cada região estudada. A heterogeneidade apresentada nas análises, como a diferença de metilação de p14ARF e p16INK4A, de uma única peça tumoral poderia estar relacionada com os diferentes aspectos das três regiões, com uma região mais hemorrágica e degradada e outra mais sólida. Poderia essa diferenciação de expressão de proteínas de supressão de tumor, ou até mesmo a metilação do gene *hTERT*, estar relacionada com os poucos casos malignidade de NSPP como já demonstrado em outros tipos tumorais (BOUGEL et al., 2013; WANG et al., 2020)?

Nas amostras analisadas, o *MGMT* não apresentou metilação em nenhuma das três regiões, possivelmente contribuindo para a baixa malignidade da neoplasia. *MGMT* é uma proteína relacionada ao reparo do DNA, e sua via é usada como um alvo para quimioterapia para induzir apoptose (SHARMA et al., 2009) e sua expressão ajuda a proteger contra a tumorigênese. Seu silenciamento já foi relatado para vários tipos tumorais (CORDEIRO et al., 2012; GERSON, 2004; OLIVER et al., 2014). Em pacientes com glioblastoma, a metilação do *MGMT* está associada a uma melhor sobrevida global, mesmo nos casos em que os tumores não são adequados para ressecção (CHEN et al., 2013; RAO; QUDDUSI; SHAMIM, 2018). A metilação do promotor *MGMT* tem valor preditivo no glioblastoma mutante IDH com valor preditivo maior do que nos selvagens (CHAI et al., 2021).

8. Limitações do Estudo

Não tivemos limitações com o presente estudo.

9. Considerações finais e sugestões

Mais estudos em NSPP são necessários para entender melhor sua biologia e formação. Os eventos moleculares envolvidos na heterogeneidade do NSPP precisam ser melhor explorados. O presente trabalho contribui com informações moleculares até então inéditas na literatura. Com essas descobertas várias perguntas surgem, como até que ponto os

polimorfismos e padrões de metilações apresentados afetam a estrutura tumoral e seu prognóstico. Poderiam esses achados serem utilizados como marcadores genéticos para diagnóstico diferencial e forma mais precoce dos casos de NSPP? Seriam as alterações relacionadas com a origem tumoral ainda desconhecida? Para que essas e outras perguntas possam ser respondidas mais estudos em NSPP se fazem necessários.

Em estudos anteriores, mostramos diferentes padrões entre as regiões tumorais com deleções de genes, diferentes padrões de metilação e diferentes padrões de expressão de proteínas (CHAGAS et al., 2018a, 2018b). No presente trabalho, analisamos 3 regiões do tumor macroscópicas distintas a exemplo de um trabalho anterior (CHAGAS et al., 2018a), e investigamos os genes que podem estar relacionados ao processo de formação do tumor e sua capacidade proliferativa. Este estudo descreveu os múltiplos mecanismos moleculares, como a metilação e polimorfismo, que podem estar associados ao NSPP para melhor caracterizar a heterogeneidade molecular envolvida nesta malignidade, mostrando alvos moleculares relevantes para o tratamento da neoplasia, como por exemplo as alterações no gene de detoxificação *GSTP1*.

10. Conclusões

No presente trabalho, a heterogeneidade molecular intratumoral da neoplasia foi evidenciada por:

- 1 – Polimorfismo do gene *GSTP1* nas 3 áreas tumorais estudadas.
- 2 – Inativação, por metilação, do gene *GSTP1* nas áreas periférica e central da neoplasia.
- 3 - Metilação do gene *hTERT* nas três áreas tumorais.
- 4 – Metilação do gene *PI4ARF* nas três regiões tumorais, menos intensa na área intermediária em comparação com a central e a periférica.
- 5 – A metilação dos genes *GSTP1*, *hTERT* e *PI4ARF*, que pode contribuir para o potencial maligno da neoplasia.
- 6 – A não metilação do gene *MGMT*, assim como a presença dos genes *CYP1A1* mi e m2, na forma selvagem, que possivelmente contribuem para o desenvolvimento mais lento da neoplasia

Referências

- ABIDA, W. M.; GU, W. p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 352–357, 15 jan. 2008.
- ABRAHAM, S. C. et al. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 4, p. 1361–1369, abr. 2002.
- AKINCILAR, S. C.; UNAL, B.; TERGAONKAR, V. Reactivation of telomerase in cancer. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 73, n. 8, p. 1659–1670, abr. 2016.
- ALBERT, P. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 36, n. 6, p. 363–365, 1 nov. 2011.
- AVIN, B. A.; UMBRICH, C. B.; ZEIGER, M. A. Human telomerase reverse transcriptase regulation by DNA methylation, transcription factor binding and alternative splicing (Review). **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 6, p. 2199–2205, dez. 2016.
- BALERCIA, G. et al. Solid-cystic tumor of the pancreas. An extensive ultrastructural study of fourteen cases. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 27, n. 3, p. 331–340, jul. 1995.
- BAN, N. et al. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. **Cancer Research**, v. 56, n. 15, p. 3577–3582, 1 ago. 1996.
- BERTWISTLE, D.; SUGIMOTO, M.; SHERR, C. J. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 3, p. 985–996, fev. 2004.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, 24 maio 2007.
- BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v. 350, n. 6319, p. 569–573, 18 abr. 1991.
- BOUGEL, S. et al. Methylation of the hTERT Promoter: A Novel Cancer Biomarker for Leptomeningeal Metastasis Detection in Cerebrospinal Fluids. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 8, p. 2216–2223, 15 abr. 2013.
- BRADY, L. et al. Inter- and intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–16, dez. 2021.

CALVANI, J. et al. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas do not express major pancreatic markers in pediatric patients. **Human Pathology**, v. 83, p. 29–35, jan. 2019.

CHAGAS, V. L. A. et al. Epigenetics of solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas. **JOP: Journal of the pancreas**, v. 19, n. 4, p. 223–227, 2018a.

CHAGAS, V. L. A. et al. A Molecular Study of Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas in a Pediatric Patient. **International Journal of Clinical Pediatrics**, v. 7, n. 4, p. 63–68, 2018b.

CHAGAS, V. L.; ROSMAN, F. C.; CARVALHO, M. DA G. DA C. Solid pseudopapillary neoplasia of the pancreas: a review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 1, p. 87–94, jan. 2020.

CHAI, R. et al. Predictive value of MGMT promoter methylation on the survival of TMZ treated IDH-mutant glioblastoma. **Cancer Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 272–282, 15 fev. 2021.

CHEN, C.-C.; WANG, K.-Y.; SHEN, C.-K. J. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 9084–9091, 29 mar. 2013.

CHEN, Y. et al. MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 281–290, maio 2013.

CHIBA, K. et al. Mutations in the promoter of the telomerase gene *TERT* contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1416–1420, 29 set. 2017.

CORDEIRO, A. T. et al. Avaliação da expressão do gene MGMT nos tecidos normal e neoplásico de doentes com câncer colorretal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 1, p. 48–53, 2012.

CRAKE, R. L. I. et al. Influence of serum inflammatory cytokines on cytochrome P450 drug metabolising activity during breast cancer chemotherapy: a patient feasibility study. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5648, dez. 2021.

CRISTOFARI, G.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. **The EMBO journal**, v. 25, n. 3, p. 565–574, 8 fev. 2006.

CROW, J. F. Felix Bernstein and the first human marker locus. **Genetics**, v. 133, n. 1, p. 4–7, jan. 1993.

CUI, J. et al. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). **International Journal of Oncology**, p. 867-878, 10 fev. 2020.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, fev. 2018.

- DAI, Z.; RAMESH, V.; LOCASALE, J. W. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. **Nature Reviews Genetics**, p. 737–753, 9 set. 2020.
- DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.
- DENG, X. et al. GSTP1 and GSTO1 single nucleotide polymorphisms and the response of bladder cancer patients to intravesical chemotherapy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 867–878, nov. 2015.
- DINARVAND, P.; LAI, J. Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas: A Rare Entity With Unique Features. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 7, p. 990–995, jul. 2017.
- DUCREST, A.-L. et al. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. **Oncogene**, v. 21, n. 4, p. 541–552, 21 jan. 2002.
- EL-SAYES, N.; VITO, A.; MOSSMAN, K. Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 1–14, 15 fev. 2021.
- ESTELLER, M. et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Research**, v. 58, n. 20, p. 4515–4518, 15 out. 1998.
- ESTELLER, M. et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. **Cancer Research**, v. 60, n. 1, p. 129–133, 1 jan. 2000.
- FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 3, p. 479–485, fev. 2013.
- FRIDOLFSSON, A.-K.; GYLLENSTEN, U. B.; JAKOBSSON, S. Microsatellite Markers for Paternity Testing in the Willow Warbler *Phylloscopus Trochilus*: High Frequency of Extra-Pair Young in an Island Population. **Hereditas**, v. 126, n. 2, p. 127–132, 11 maio 2004.
- GAHLOT, G. S. et al. Solid pseudopapillary neoplasm of the ovary with metastases to the omentum and regional lymph nodes. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 348–350, 2016.
- GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 10, p. 883–892, 8 mar. 2012.
- GERSON, S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 296–307, abr. 2004.
- GONÇALVES, E. S. et al. Importance of analytical determination of reactive intermediates and their reaction products with biomacromolecules: a mini review. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 317–322, 2014.

GORBUNOVA, V.; SELUANOV, A.; PEREIRA-SMITH, O. M. Expression of Human Telomerase (hTERT) Does Not Prevent Stress-induced Senescence in Normal Human Fibroblasts but Protects the Cells from Stress-induced Apoptosis and Necrosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38540–38549, 11 out. 2002.

GRANT, L. D. et al. Unbalanced chromosomal translocation, der(17)t(13;17)(q14;p11) in a solid and cystic papillary epithelial neoplasm of the pancreas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 20, n. 3, p. 339–345, mar. 1996.

GRZYWA, T. M.; PASKAL, W.; WŁODARSKI, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. **Translational Oncology**, v. 10, n. 6, p. 956–975, dez. 2017.

GUILLERET, I. et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 4, p. 335–341, 1 out. 2002.

GUO, Y. et al. Paranuclear Dot-like Immunostaining for CD99: A Unique Staining Pattern for Diagnosing Solid-Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 35, n. 6, p. 799–806, jun. 2011.

HARAGUCHI, K. et al. The methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogenesis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 9, p. 797–807, set. 2017.

HARLEY, C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? **Mutation Research**, v. 256, n. 2–6, p. 271–282, nov. 1991.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, fev. 2005.

HONMA, H. N. et al. Polymorphism of the CYP1A1*2A gene and susceptibility to lung cancer in a Brazilian population. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 8, p. 767–772, ago. 2009.

IGBINOSA, O. Pseudopapillary tumor of the pancreas. An algorithmic approach. **JOP: Journal of the pancreas**, v. 12, n. 3, p. 262–265, 6 maio 2011.

ISSA, J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 12, p. 988–993, 2004.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? **Genes & Cancer**, v. 2, n. 6, p. 607–617, jun. 2011.

JOSEPH, T. et al. Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. **Gynecologic Oncology**, v. 101, n. 3, p. 411–417, jun. 2006.

- JUNG, G. et al. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 111–130, fev. 2020.
- KEMPSKI, H. M. et al. Previously unidentified complex cytogenetic changes found in a pediatric case of solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 164, n. 1, p. 54–60, jan. 2006.
- KIM, K. et al. Prognostic significance of USP10 and p14ARF expression in patients with colorectal cancer. **Pathology - Research and Practice**, v. 216, n. 6, p. 1–10, jun. 2020.
- KLÖPPEL, G. et al. **WHO Classification of Tumors of the Digestive System**. 4TH. ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010.
- KOSMAHL, M. et al. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 436, n. 5, p. 473–480, maio 2000.
- KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA Methylation and Cancer. Em: **Advances in Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 70p. 27–56.
- LASABOVA, Z. et al. Hypermethylation of the GSTP1 promoter region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. **Neoplasma**, v. 57, n. 1, p. 35–40, 2010.
- LEÃO, R. et al. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 1–12, dez. 2018.
- LEE, J. S. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. **Virchows Archiv**, v. 450, n. 6, p. 637–642, 20 jun. 2007.
- LEE, W. H. et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 24, p. 11733–11737, 22 nov. 1994.
- LEI, Y. et al. Inhibition of MGMT-mediated autophagy suppression decreases cisplatin chemosensitivity in gastric cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 125, p. 1–10, maio 2020.
- LIAO, Y. et al. Melatonin synergizes BRAF-targeting agent dabrafenib for the treatment of anaplastic thyroid cancer by inhibiting AKT/hTERT signalling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 20, p. 12119–12130, out. 2020.
- LIU, J.; DANG, H.; WANG, X. W. The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 5 jan. 2018.
- LUCZAK, M. W.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 44, n. 3, p. 143–154, 2006.

- MAITRA, A. et al. Detection of t(11;22)(q24;q12) Translocation and EWS-FLI-1 Fusion Transcript in a Case of Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 3, n. 6, p. 603–605, nov. 2000.
- MAO, L. et al. A novel p16INK4A transcript. **Cancer Research**, v. 55, n. 14, p. 2995–2997, 15 jul. 1995.
- MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 105–117, jan. 2010.
- MATHER, B. D. et al. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 5, p. 487–531, maio 2006.
- MATSUBARA, K. et al. Chromosome abnormality in solid and cystic tumor of the pancreas. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 92, n. 7, p. 1219–1221, jul. 1997.
- MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene**, v. 25, n. 11, p. 1639–1648, mar. 2006.
- MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924–935, dez. 2006.
- MORENO-ACOSTA, P. et al. hTERT Protein Expression in Cytoplasm and Nucleus and its Association With HPV Infection in Patients With Cervical Cancer. **Cancer Genomics - Proteomics**, v. 17, n. 5, p. 615–625, 2020.
- MORGAN, A. S. et al. Tumor efficacy and bone marrow-sparing properties of TER286, a cytotoxin activated by glutathione S-transferase. **Cancer Research**, v. 58, n. 12, p. 2568–2575, 15 jun. 1998.
- MORIYAMA, T. et al. Hypermethylation of p14 (ARF) may be predictive of colitic cancer in patients with ulcerative colitis. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 50, n. 9, p. 1384–1392, set. 2007.
- MOYER, A. M. et al. Glutathione S-Transferase P1: Gene Sequence Variation and Functional Genomic Studies. **Cancer Research**, v. 68, n. 12, p. 4791–4801, 15 jun. 2008.
- MOYZIS, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 18, p. 6622–6626, set. 1988.
- NARAYAN, G. et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. **Molecular Cancer**, v. 2, p. 1–12, 13 maio 2003.

- NEBERT, D. W. et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 23847–23850, 4 jun. 2004.
- NGUYEN, N. Q. et al. Clinical and immunohistochemical features of 34 solid pseudopapillary tumors of the pancreas: Solid pseudopapillary pancreatic tumors. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. 2, p. 267–274, fev. 2011.
- NOMOTO, K. et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 1, p. 3–8, jan. 2002.
- NOTOHARA, K. et al. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 10, p. 1361–1371, out. 2000.
- OLIVER, J. A. et al. Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–11, dez. 2014.
- ORTUZAR, N. et al. Probing cytochrome P450 (CYP) bioactivation with chloromethylindoline bioprecursors derived from the duocarmycin family of compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1–8, jun. 2021.
- PATIL, T. B. et al. Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas: a single institution experience of 14 cases. **HPB**, v. 8, n. 2, p. 148–150, abr. 2006.
- PEREIRA, R. et al. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 21, p. 3682–3690, nov. 2009.
- PRASETYANTI, P. R.; MEDEMA, J. P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–9, dez. 2017.
- PRIBLUDA, A.; DE LA CRUZ, C. C.; JACKSON, E. L. Intratumoral Heterogeneity: From Diversity Comes Resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 13, p. 2916–2923, 1 jul. 2015.
- RAO, A. M.; QUDDUSI, A.; SHAMIM, M. S. The significance of MGMT methylation in Glioblastoma Multiforme prognosis. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 68, n. 7, p. 1137–1139, jul. 2018.
- REITER, J. G. et al. An analysis of genetic heterogeneity in untreated cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 11, p. 639–650, nov. 2019.
- RODRIGUEZ, M.; POTTER, D. A. CYP1A1 regulates breast cancer proliferation and survival. **Molecular cancer research: MCR**, v. 11, n. 7, p. 780–792, jul. 2013.
- ROHR, P. et al. Análise dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em pacientes que desenvolveram leucemias agudas. **Revista Brasileira de Biociências= Brazilian Journal of Biosciences**. Vol. 2, n. 3/4 (jul./dez. 2004), p. 143-150, 2004.

ROMANIUK-DRAPAŁA, A. et al. hTERT Downregulation Attenuates Resistance to DOX, Impairs FAK-Mediated Adhesion, and Leads to Autophagy Induction in Breast Cancer Cells. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 10 abr. 2021.

ROSAS, S. L. et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 939–942, 1 fev. 2001.

SÁ, R. A. DE et al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 40, n. 4, p. 463–473, ago. 2014.

SABHARWAL, A. et al. A phase I trial of lomeguatrib and irinotecan in metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 829–835, out. 2010.

SANTINI, D.; POLI, F.; LEGA, S. Solid-papillary tumors of the pancreas: histopathology. **JOP: Journal of the pancreas**, v. 7, n. 1, p. 131–136, 11 jan. 2006.

SANTRIC, V. et al. GSTP1 rs1138272 Polymorphism Affects Prostate Cancer Risk. **Medicina**, v. 56, n. 3, p. 1–10, 13 mar. 2020.

SANYAL, S. et al. SUMO E3 ligase CBX4 regulates hTERT-mediated transcription of CDH1 and promotes breast cancer cell migration and invasion. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 19, p. 3803–3818, 16 out. 2020.

SAXENA, A. et al. GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 4, n. 6, p. 1097–1103, dez. 2012.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 1, p. 28–34, jan. 2011.

SHARMA, S. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. **Anticancer Research**, v. 29, n. 10, p. 3759–3768, out. 2009.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**, v. 360, n. Pt 1, p. 1–16, 15 nov. 2001.

SHERR, C. J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 10, p. 731–737, out. 2001.

SHERR, C. J. Autophagy by ARF: a short story. **Molecular Cell**, v. 22, n. 4, p. 436–437, 19 maio 2006a.

SHERR, C. J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, n. 9, p. 663–673, set. 2006b.

SHIRAIISHI, A.; SAKUMI, K.; SEKIGUCHI, M. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1879–1883, out. 2000.

SILVA, M. M. et al. Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the survival rate of patients with malignant glioma under perillyl alcohol-based therapy. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1621–1630, 2013.

SINGH, N. et al. Association of CYP1A1 polymorphisms with breast cancer in North Indian women. **Oncology Research**, v. 16, n. 12, p. 587–597, 2007.

STEWART, S. A. et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 20, p. 12606–12611, 1 out. 2002.

STÖGBAUER, L. et al. Telomerase activity, TERT expression, hTERT promoter alterations, and alternative lengthening of the telomeres (ALT) in meningiomas – a systematic review. **Neurosurgical Review**, v. 43, n. 3, p. 903–910, jun. 2020.

STONE, S. et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. **Cancer Research**, v. 55, n. 14, p. 2988–2994, 15 jul. 1995.

STRINGER, M. D. et al. A novel cytogenetic abnormality in a solid and cystic papillary tumour of the pancreas. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 41, n. 2, p. 155–158, ago. 2003.

SWANTON, C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer Research**, v. 72, n. 19, p. 4875–4882, 1 out. 2012.

SWAYDEN, M.; IOVANNA, J.; SOUBEYRAN, P. Pancreatic cancer chemo-resistance is driven by tumor phenotype rather than tumor genotype. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. 1–23, dez. 2018.

TAN, A. C. et al. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. **Molecular Oncology**, v. 3, n. 5–6, p. 425–438, out. 2009.

TANO, K. et al. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 2, p. 686–690, jan. 1990.

THOMPSON, M. J. et al. Pancreatic Cancer Patient Survival Correlates with DNA Methylation of Pancreas Development Genes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 3 jun. 2015.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369–7375, out. 2003.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 4, p. e178–e185, abr. 2012.

- UEKI, T. et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 60, n. 7, p. 1835–1839, 1 abr. 2000.
- VALLS-BAUTISTA, C. et al. hTERT methylation is necessary but not sufficient for telomerase activity in colorectal cells. **Oncology Letters**, v. 2, n. 6, p. 1257–1260, nov. 2011.
- VILLANUEVA, L.; ÁLVAREZ-ERRICO, D.; ESTELLER, M. The Contribution of Epigenetics to Cancer Immunotherapy. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 8, p. 676–691, ago. 2020.
- VOLLMER, C.; DIXON, E.; GRANT, D. Management of a solid pseudopapillary tumor of the pancreas with liver metastases. **HPB**, v. 5, n. 4, p. 264–267, nov. 2003.
- WANG, L. et al. Jab1 promotes gastric cancer tumorigenesis via non-ubiquitin proteasomal degradation of p14ARF. **Gastric Cancer**, p. 1003–1017, 26 maio 2020.
- WONGPRATATE, M. et al. Genetic Polymorphisms of the Human Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and Cervical Cancer Susceptibility among Northeast Thai Women. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 21, n. 1, p. 243–248, 1 jan. 2020.
- WU, B. et al. MspI and Ile462Val Polymorphisms in CYP1A1 and Overall Cancer Risk: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 31 dez. 2013.
- YAHYAZADEH, R. et al. Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. **BMC Urology**, v. 21, n. 1, p. 64, dez. 2021.
- ZHAI, G. et al. hTERT promoter methylation promotes small cell lung cancer progression and radiotherapy resistance. **Journal of Radiation Research**, v. 61, n. 5, p. 674–683, 8 set. 2020.
- ZHAN, P. et al. CYP1A1 MspI and exon7 gene polymorphisms and lung cancer risk: An updated meta-analysis and review. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 1–17, 2011.
- ZHANG, T.-J. et al. Expression and prognosis analysis of DNMT family in acute myeloid leukemia. **Aging**, v. 12, n. 14, p. 14677–14690, 26 jun. 2020.
- ZHONG, S. et al. Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1087–1092, abr. 2002.
- ZHOU, Z. et al. Relationships between p14ARF Gene Methylation and Clinicopathological Features of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 21 mar. 2016.

ZHUO, W. et al. Does cytochrome P450 1A1 MspI polymorphism increase acute lymphoblastic leukemia risk? Evidence from 2013 cases and 2903 controls. **Gene**, v. 510, n. 1, p. 14–21, nov. 2012.

ZINN, R. L. et al. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 194–201, 1 jan. 2007.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 249–255, 1 jan. 2001.

ZURIARRAIN, A. et al. Pseudopapillary Tumor of the Pancreas in a 17-Year-Old Girl. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 14, p. e395–e396, 10 maio 2011.

Apêndice I -

Artigo produzido a partir dessa dissertação publicado.



Journal of Medical Sciences

ISSN 1682-4474

science
alert

ANSI*net*
an open access publisher
<http://ansinet.com>



Research Article

Genetic Polymorphisms and DNA Methylation Evaluation in a Rare Pediatric Case Carrying a Solid Pseudo Papillary Neoplasm of the Pancreas

¹Bruna dos Santos Paiva Ribeiro, ¹Vera Lucia Antunes Chagas, ¹Marcelo Soares da Mota e Silva, ²Gilda Alves, ²Mariana Chantre-Justino and ¹Maria da Gloria da Costa Carvalho

¹Department of Pathology and Anatomy Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Circulating Biomarkers, Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Brazil

Abstract

Background and Objectives: Heterogeneity within the tumour has been described for several types of cancer, including Solid Pseudo Papillary Neoplasm of the Pancreas (SPNP). Tumour heterogeneity may provide distinct molecular signatures that can significantly affect treatment response. This study aimed to investigate the molecular heterogeneity of three different tumour areas (peripheral, intermediate and central) from a pediatric case with SPNP submitted to Whipple's surgery in the Clementino Fraga Filho University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. **Materials and Methods:** Polymorphisms of the detoxification genes *GSTP1*, *CYP4A1m1* and *CYP4A1m2* were investigated by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique and the promoter Methylation profile of the genes *p16^{INK4}*, *GSTP1*, *hTERT* and *MGMT* were assessed by Methylation-Specific PCR (MSP). **Results:** The *CYP4A1m1* and *CYP4A1m2* showed wild-type genotype and *GSTP1* showed heterozygote genotype. Regarding the methylation status, *MGMT* showed no detectable methylation in any of the 3 tumour regions; in contrast, both *p16^{INK4}* and *hTERT* showed detectable methylation in all three regions, whereas, *GSTP1* showed methylation in peripheral and intermediate areas. **Conclusion:** Epigenetic inactivation of critical genes and reduced detoxification activity revealed the SPNP tumour biology heterogeneity, which could represent new molecular targets for SPNP treatment.

Key words: Solid pseudopapillary neoplasm of pancreas, tumour heterogeneity, pediatric patient, polymorphism, DNA methylation

Citation: Ribeiro, B.D.S.P., V.L.A. Chagas, M.S. da Mota e Silva, G. Alves, M. Chantre-Justino and M.D.G. da Costa Carvalho, 2022. Genetic polymorphisms and DNA methylation evaluation in a rare pediatric case carrying a solid pseudo papillary neoplasm of the pancreas. *J. Med. Sci.*, 22: 22-28.

Corresponding Author: Mariana Chantre-Justino, Laboratory of Circulating Biomarkers, Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Av. Professor Manoel de Abreu, No. 444, 4th floor, Maracanã, Rio de Janeiro-20550-170, Brazil

Copyright: © 2022 Bruna dos Santos Paiva Ribeiro *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Apêndice II

Artigos publicados anteriormente sobre o mesmo material de coautoria da mestrand.

JOR, J Pancreas (Online) 2010 Jul 30; 19(4):51-57.

CASE REPORT

Epigenetics of Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas

Vera Lucia Antunes Chagas¹, Bruna dos Santos Paiva Ribeiro¹, Marcelo Soares da Mota e Silva¹,
Danielle Nunes Fornay², Fernando Colonna Rosman¹, Maria da Gloria da Costa Carvalho¹

¹Department of Pathology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Physician of the Pediatric Surgery Services of Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Care,
Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Background The solid pseudopapillary neoplasm of pancreas is a rare neoplasm with low-grade malignancy and uncertain origin that constitutes about 1-2% of all exocrine pancreatic neoplasms. Epigenetic events such as deoxyribonucleic acid methylation lead to altered gene expression, resulting in altered control of cell proliferation. Based on the fact that epigenetic changes are reversible, the importance of epigenetic studies lies in the better understanding of tumor progression as well as target therapy. **Objective** This study had the objective to evaluate the intratumor heterogeneity of solid pseudopapillary neoplasm of pancreas in three macroscopically distinct areas, comparing gene polymorphism and gene methylation. **Material and Methods** The samples were collected from three distinct tumor areas from one female patient diagnosed with Solid pseudopapillary neoplasm of pancreas and submitted to a pancreatectomy. Deoxyribonucleic acid was extracted from the fresh tissues by using proteinase K digestion and phenol-chloroform isoamyl alcohol followed by ethanol precipitation. The functionality of deoxyribonucleic acid was investigated for *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1) and *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1) genes by multiplex polymerase chain reaction. Methylation-specific polymerase chain reaction analysis was used to determine the methylation status of *p16*, *RBT*, *E-cadherin*, *TIMP2* and *DAPK* genes promoter by bisulfite modification. **Results and Conclusion** The results show a null genotype for *GSTT1* in tumor areas 1 and 3 when comparing with area 2, showing that there is heterogeneity in the tumor. Tumor fragment 1 was not detected for any investigated genes in methylation, probably due to deoxyribonucleic acid degradation in this region. *TIMP-2* (tissue metalloproteinase inhibitor 2) and *p16* were methylated in areas 2 and 3, and *E-cadherin* presented a small methylation only in fragment 3; *DAPK* and *RBT* (retinoblastoma 1) were unmethylated. As far as we know, this is the first work to show deoxyribonucleic acid methylation in solid pseudopapillary neoplasm of pancreas.

INTRODUCTION

The solid pseudopapillary neoplasm of pancreas (SPTP) is a rare neoplasm with low-grade malignancy. It constitutes about 1-2% of all exocrine pancreatic neoplasms and occurs mainly in young women, having a prolonged, indolent clinical course [1, 2, 3]. This tumor received different denominations, including "Frantz tumor", "cystic solid tumor", "papillary cystic tumor", "papillary epithelial neoplasia", among others [2]. It was also considered as an uncommon carcinoma or non-functioning carcinoma of the pancreatic islets [3]. Through Frantz's description, in 1959, it was recognized as a specific entity [3] and in 1996 it was defined by the World Health Organization (WHO)

as "solid pseudopapillary tumor" [2]. Diagnosis of these tumors is sometimes difficult, since their histomorphology and immunophenotype may suggest other exocrine and endocrine pancreatic tumors [4].

Despite the diverse studies with electron microscopy and immunohistochemistry, the cellular origin of this tumor remains uncertain, favoring for many researchers the hypothesis of its origin of a multipotential primitive cell [1, 3]. The extrapancreatic origin has been suggested by some authors [5, 6]. Because of their rarity, clinical data on these tumors are mostly limited to case reports or small series mainly performed among Asian populations [1].

Heterogeneity within the tumor has been described for several types of cancer. Chromosomal abnormalities and unbalanced chromosomal translocation have been reported by many authors for SPTP [7, 8, 9, 10, 11].

Glutathione S-Transferases (GSTs) are enzymes of detoxification of phase II that block the formation of electrophilic products [12, 13]. People from different origins have different patterns of silencing of these genes, varying from region to region [13].

Epigenetics studies the hereditary changes in gene activity and expression that occur without alteration in the DNA sequence [14]. Epigenetic events are a characteristic of

Received May 30th, 2010 – Accepted July 28th, 2010
Keywords: glutathione S-transferase M1; glutathione S-transferase T1; Methylation; Neoplasms
Abbreviations: DAPK death-associated protein kinase; DNA Deoxyribonucleic acid; MSP methylation-specific polymerase chain reaction; SPTP solid pseudopapillary neoplasm of pancreas;
Correspondence: Maria da Gloria da Costa Carvalho
 Department of Pathology
 Universidade Federal do Rio de Janeiro
 Rua Professor Rodolpho Rocco, 255, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
 Phone +55 21 39382112
 Fax +55 21 39382112
 E-mail: gloria@casimho.org

A Molecular Study of Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas in a Pediatric Patient

Vera Lucia Antunes Chagas^a, Marlon Dias Mariano Santos^b, Juliana de Saldanha da Gama Fischer^b,
Bruna dos Santos Paiva Ribeiro^a, Fernando Colonna Rosman^a, Paulo Costa Carvalho^b,
Danielle Foray^c, Maria da Gloria da Costa Carvalho^{a, d}

Abstract

Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas (SPNP) is considered as a tumor with low malignant potential. Little is known about how its molecular heterogeneity is involved in its pathogenesis. We aim to evaluate tumor heterogeneity by immunohistochemistry (IH) and proteomics in three macroscopically distinct areas. Tumor fragments were obtained from a 12-year-old female patient. We identified by mass spectrometry (MS) 1,427, 5,786, and 4,298 proteins for each sample, 1,337 being common to all fragments. Several MS results were immunohistochemically validated. Our results demonstrate unique intra-tumor protein profiles based on its heterogeneity.

Keywords: Molecular study; Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas; Pediatric patient

Introduction

Intra-tumor heterogeneity has been recognized for a long time in different phenotypic features, such as cellular morphology, metabolism, proliferative and metastatic potential [1]. The intra-tumor phenotypic heterogeneity of solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas (SPNP) is widely described in the literature [2-4], but it is poorly understood at a molecular level. It consists of a heterogeneous mixture of functionally distinct cells [4]. SPNP is a rare neoplasm of uncertain cell line, with

both low potential for malignancy and excellent prognosis for most patients [5]. It accounts for about 1% to 3% of all exocrine pancreatic neoplasms [6]. SPNP occurs mainly, but not exclusively, in young women [7] including those in childhood and adolescence [8]. Its clinical course is prolonged and indolent, and the disease is usually asymptomatic; some signals and symptoms include the appearance of a palpable mass, abdominal pain and discomfort, and nausea [5]. SPNP is characterized by a solid-cystic growth, with pseudopapillary structures [5, 9]. Surgical resection is the treatment of choice and usually leads to a good prognosis, even if there are distant metastases or recurrence [10, 11]. Despite the diverse studies using electron microscopy and immunohistochemistry (IH), the cellular origin of this tumor remains uncertain, and it is hypothetically suggested that its ontogeny is of a multipotential primitive cell [12, 13]. Some authors [14] have suggested an extra-pancreatic origin due to the several reported cases of the primary tumor at different sites, such as ectopic pancreas [15], retroperitoneum [16], gastroduodenal area [17], and ovary [18, 19].

Neoplasia consists of a heterogeneous mixture of functionally distinct cells and the SPNP expresses a variety of immune markers in heterogeneity [4, 5]. Based on these reports we evaluated the molecular heterogeneity of this neoplasia. We used mass spectrometry (MS) to identify proteins in three different areas of the tumor and compared the results with the immunohistochemical panel. This is a rare tumor in a child, which until now has not been reported about a lot. Although this is a tumor of low malignancy, a recent study showed a methylation of *P16* gene that can represent a potential malignancy [20]. As far as we know, this is the first study that compares the results of the proteomics analysis with the routine IH.

Manuscript submitted November 8, 2018, accepted December 12, 2018

^aDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rua Rodolpho Paulo Rocco 255 - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ 21941-590, Brazil

^bComputational Mass Spectrometry & Proteomics Group, Carlos Chagas Institute, Floresta, Rua Professor Alcayr Munhoz Mader 2135-2261 - Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba - PR 81310-020 Paraná, Brazil

^cInstituto de Puericultura e Pediatria Martagao Gesteira, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^dCorresponding Author: Maria da Gloria da Costa Carvalho, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rua Rodolpho Paulo Rocco 255 - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ 21941-590, Brazil. Email: gloria@gcarvalho.org

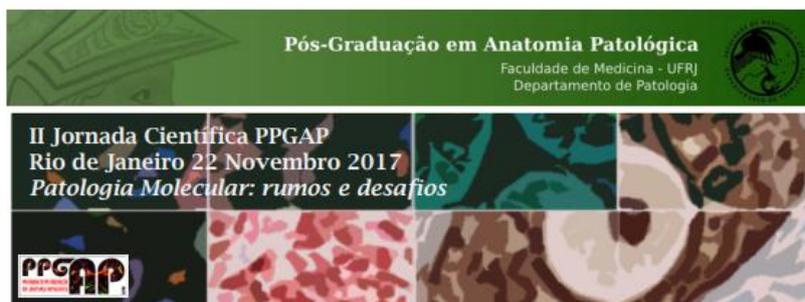
doi: <https://doi.org/10.14740/ijcp320>

Case Report

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clementino Fraga Filho University Hospital (HUCFF) of the Federal University of Rio de Janeiro (UF RJ), with CAAE number 64915717.0.0000.5257. A 12-year-old female patient was admitted to HUCFF's surgical ward complaining of nausea and pain in the right hypochondrium 1 month before admission to hospital. The patient resides at home with basic sanitation, along with her parents and two siblings. All are healthy and there are no reports of chronic diseases or neoplasms in the family. There is no report, in the medical records, of the use of

Apêndice III

Menção honrosa em apresentação de trabalho anterior sobre o projeto.



Certifico que Bruna dos Santos Paiva Ribeiro participou da II Jornada Científica do Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina, ocorrida no dia 22 de novembro de 2017, tendo sido agraciada com a Menção honrosa na categoria Iniciação Científica com o trabalho intitulado "Epigenetic and Gene Polymorphism of Solid Pseudopapillary Tumor of Pancreas."

Katia Carneiro

Profa. Katia Carneiro
Coordenadora PPGAP
Faculdade de Medicina/UFRJ