



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS**  
**FACULDADE DE BIOMEDICINA**

**CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR**

**SCREENING DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO “*HOT SPOT*”  
DO GENE *TP53* EM TUMORES ASTROCÍTICOS**

**BELÉM**

**2009**

**CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR**

**SCREENING DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO “HOT SPOT”  
DO GENE *TP53* EM TUMORES ASTROCÍTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito  
obrigatório para a obtenção do grau  
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia  
Anselmo

**BELÉM**

**2009**

**CARLOS ANTONIO DA COSTA JUNIOR**

**SCREENING DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO “HOT SPOT”  
DO GENE *TP53* EM TUMORES ASTROCÍTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito  
obrigatório para a obtenção do grau  
de Bacharel em Biomedicina.

**Belém (PA), 17 de dezembro de 2009.**

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo  
(ICB – UFPA)  
(Orientador)

---

Prof. Dr. André Salim Khayat  
(ICB – UFPA)

---

Prof. Dr. Edivaldo H. C. de Oliveira  
(ICB – UFPA)

**BELÉM**

**2009**

*"A única coisa necessária para o triunfo do mal...  
é que os homens de bem não façam nada."*

**Edmund Burke**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos companheiros do dia-a-dia, os que nos aturam, quer estejamos de bom ou mau humor, tristes ou alegres, dispostos ou não, aqueles que, embora não consigamos ter sido tão cordiais todos os dias, sempre estiveram dispostos a nos ajudar.

Agradeço ao meu orientador Professor Nilson Praia Anselmo que guiou meus primeiros passos no laboratório, repassando conhecimento, aparando as arestas de um aluno novato (embora ainda existam muitas) e partilhando de sua experiência laboral, sem dúvida foi o período de maior aprendizagem em minha vida.

À Professora Lúcia, por construir esse ambiente saudável e acolhedor que é o Labiomol. À Dra Bárbara Borges (babita) que, mais do que ninguém, aturou com enorme paciência esses alunos chatos de iniciação científica (sendo eu o mais chato deles), pelas idéias e sugestões, sempre quando nada funcionava, nos passando conhecimentos de valor imensurável.

Agradeço aos colegas de laboratório, cujos nomes são tantos que dividi em grupos: à gang do CSN, à gang do gástrico, à gang dos vegetais e à gang da filogenia, pela companhia, apoio e motivação, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento de nossos trabalhos. À UFPA por possibilitar, através de sua estrutura, o desenvolvimento deste e de muitos outros trabalhos, estimulando cada vez mais a pesquisa científica em nosso estado.

À Equipe de Neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola, pela parceria que foi toda a base de nosso trabalho. À família, que suporta nossa ausência por longos períodos, apostando em nós. À minha fiel companheira, pela paciência e tolerância que, embora conta sua vontade, se via obrigada a abrir mão do pouco tempo de lazer em favor da atividade científica.

Aos mestres que, com toda paciência e dedicação, ergueram seus cinzéis e martelos para esculpirem de dentro da matéria bruta da rocha o profissional bem moldado de conhecimento e acima de tudo caráter.

Se hoje sou Biomédico, a culpa é de vocês!

## RESUMO

As neoplasias do sistema nervoso central afetam 1 em cada 10.000 pessoas em todo mundo e corresponde a cerca de 3% de todos os tipos de câncer na população brasileira e 3,3% na população paraense. Os gliomas somam mais de 70% dos tumores cerebrais humanos, e destes, os mais freqüentes são os tipos histopatológicos malignos classificados como Astrocitoma de Grau IV. Os astrocitomas são tumores cujas células predominantes são originadas de astrócitos (constituem cerca de 75% dos gliomas). O *TP53* é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma, sendo ativado pelo surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Neste gene há uma região de alta taxa de mutação conhecida como *hot spot* compreendida do éxon 4 ao 10. Já foram descritas oito isoformas diferentes e uma nova região promotora no éxon 4 e a expressão diferencial destas isoformas pode explicar a dificuldade em associar o *status* da p53 com suas propriedades biológicas em cânceres humanos. Através da técnica de PCR-SSCP, identificamos um total de 23,52% de alterações nas amostras estudadas, nas quais 5,89% no éxons 4, a mesma taxa no éxon 5 e 17,65% no éxon 7, predominante nos astrocitomas de graus II e III. O estudo sugere associação da prevalência de tumores astrocíticos ao risco ocupacional e que as mutações de ponto no gene *TP53* não são determinantes para a oncogênese, mas podem estar associada à progressão tumoral dos astrocitomas, devendo levar-se em consideração os casos associados à síndrome de Li-Fraumeni. Além disso, os monoformismos aparentes do *TP53* em astrocitomas podem estar relacionados a outros mecanismos de inativação como eventos epigenéticos ou mutações fora da região de *hot spot*.

## SUMÁRIO

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1.1. GLIOMAS .....                                              | 2         |
| 1.2. ASTROCITOMAS.....                                          | 3         |
| 1.3. PROTO-ONCOGENES E ONCOGENES.....                           | 6         |
| 1.4. GENES SUPRESSORES DE TUMOR.....                            | 8         |
| 1.5. <i>TP53</i> : CONTROLE DO CICLO CELULAR E APOPTOSE .....   | 8         |
| 1.6. POLIMORFISMO DO <i>TP53</i> .....                          | 11        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                        | <b>14</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                              | <b>15</b> |
| 4.1. EXTRAÇÃO DO DNA DO TECIDO TUMORAL.....                     | 16        |
| 4.2. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....                  | 17        |
| 4.3. POLIMORFISMOS CONFORMACIONAIS DE FITA SIMPLES (SSCP) ..... | 17        |
| 4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....                                | 18        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                       | <b>19</b> |
| 5.1. ÉXON 4 .....                                               | 20        |
| 5.2. ÉXON 5 .....                                               | 21        |
| 5.3. ÉXON 7 .....                                               | 21        |
| 5.4. ÉXONS 8-10.....                                            | 22        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                       | <b>23</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                       | <b>27</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                      | <b>28</b> |

## Lista de Figuras

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1a: Astrocitoma anaplásico grau III .....                         | 5  |
| Figura 1b: Tomografia Computadorizada de Astrocitoma difuso grau II..... | 5  |
| Figura 2: Desenvolvimento tumoral de células gliais.....                 | 7  |
| Figura 3a: Cromossomo 17 e o <i>loci</i> do <i>TP53</i> .....            | 9  |
| Figura 3b: Proteína p53.....                                             | 9  |
| Figura 4: Vias de ativação do <i>TP53</i> .....                          | 10 |
| Figura 5: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 4) .....             | 20 |
| Figura 6: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 5) .....             | 21 |
| Figura 7: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 7) .....             | 21 |
| Figura 8: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 8) .....             | 22 |
| Figura 9: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 9) .....             | 22 |
| Figura 10: Fotografia de gel de poliacrilamida (éxon 10).....            | 22 |
| Figura 11: <i>Box-plot</i> grau x sexo pacientes .....                   | 23 |
| Figura 12: <i>Box-plot</i> grau x padrão de migração amostral.....       | 24 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Classificação dos Astrocitomas e grau de malignidade.....                  | 4  |
| Tabela 2: Classificação histológica dos Astrocitomas - estimativa de sobrevida ..... | 4  |
| Tabela 3: Caracterização das amostras.....                                           | 15 |
| Tabela 4: Iniciadores .....                                                          | 16 |
| Tabela 5: Condições de execução do gel de SSCP .....                                 | 17 |
| Tabela 6: Comparação grau x idade nos testes estatísticos de MW e KS .....           | 19 |
| Tabela 7: <i>Screening</i> das amostras por PCR-SSCP .....                           | 20 |
| Anexo I: Termo de Consentimento e Livre Esclarecido.....                             | 34 |

## 1. INTRODUÇÃO

A palavra câncer, do grego *karkinos* (caranguejo), significa, segundo o *Michaelis Moderno Dicionário da Língua Portuguesa*, neoplasma, um novo tecido que destrói as partes onde se desenvolve, tomando-lhes o lugar e tendendo a se generalizar (Fernandes Junior *et al.*, 2009).

Diferente das doenças infectocontagiosas e das doenças degenerativas em geral, o câncer destaca-se pela formação de um tecido constituído por células autônomas com habilidade e capacidade bem diferentes das que o antecederam, com possibilidade de invasão tecidual e metastização, marcas reconhecidas das neoplasias malignas. Outras características próprias, historicamente conhecidas, da célula tumoral são a proliferação descontrolada e independente, alterações morfológicas claras diferenciáveis do tecido original, perda da capacidade de adesão juncional às células vizinhas ou à membrana basal, capacidade de invadir tecidos vizinhos, perda de mecanismos de morte celular, entre outros (Fernandes Júnior *et al.*, 2009).

As neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC) afetam 1 em cada 10.000 pessoas em todo mundo (Hodgens, 2007) e cerca de 24 mil tumores primários do SNC, um número igual de tumores metastáticos são diagnosticados nos EUA anualmente, admitindo-se uma população de 300 milhões de habitantes, sendo que a maioria é comprovada histologicamente (Carr *et al.*, 2006). Esta doença corresponde a cerca de 3% de todos os tipos de câncer na população brasileira e 3,3% na população paraense (INCA, 2009).

No Brasil, segundo taxas de dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), entre o período de 1980-1990, houve um aumento anual superior a 0,5%, na mortalidade por neoplasias cerebrais na população em geral, com elevação dos índices em pacientes maiores de 65 anos de idade. No Pará, estima-se uma taxa de 66,15 novos casos para cada 100 mil homens em 2010, e 82,76 para mulheres nestes mesmos parâmetros (INCA, 2009).

Os tumores do sistema nervoso representam 3% dos casos confirmados de câncer no Brasil, onde os astrocitomas abrangem grande espectro de neoplasias desde lesões que crescem lentamente, até tumores altamente agressivos e fatais. Uma característica importante desse grupo de neoplasias é a tendência à

recorrência, freqüentemente acompanhada da progressão para fenótipos mais malignos (Martins, 2001).

A distribuição e o tipo histológico de tumores cerebrais diferem em crianças e adultos. Em crianças, os tumores cerebrais mais freqüentes surgem a partir da fossa posterior do crânio, onde os tipos histológicos mais comuns são meduloblastomas, espongiblastomas (incluindo astrocitoma cerebelar e glioma do nervo óptico) e ependimomas. Já nos adultos, os tumores cerebrais mais comuns são meningiomas e gliomas (Hodgens, 2007)

### 1.1. GLIOMAS

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores originários das células da glia encefálica. A glia é uma unidade formada por várias células e tem como principal função dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Essas células se encontram ao redor dos neurônios assim como em meio aos axônios neuronais. A maior parte das células gliais em termos quantitativos pode ser encontrada na substância branca encefálica (FMC-UNICAMP, 2009).

A glia é formada principalmente por quatro linhagens celulares: astrócitos, oligodentrócitos, microglia e epêndima. São dessas células que as neoplasias se originam. Os astrócitos desempenham funções muito importantes como a sustentação e a nutrição dos neurônios. Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação e manutenção da bainha de mielina nos axônios do SNC. A micrógliia tem a função específica de defesa contra invasões externas ou mutações gênicas. O epêndima tem a função de revestimento das cavidades ventriculares encefálicas e do canal medular, e participa da dinâmica do fluxo liquorico (FMC-UNICAMP, 2009).

Os gliomas somam mais de 70% dos tumores cerebrais humanos, e destes, o mais freqüente é o tipo histopatológico maligno classificado como Grau IV (**tabela 1**). Existe uma tendência crescente na incidência de gliomas em cidades desenvolvidas e industrializadas, onde alguns relatos indicam uma taxa maior em caucasóides que em populações africanas ou asiáticas. Menos de 3% dos pacientes diagnosticados com glioblastoma têm sobrevida de mais de cinco anos (**tabela 2**), sendo considerada a idade avançada um fator significativo e bastante consistente no prognóstico (Ohgaki, 2009).

Além da idade, fatores como etnia, sexo e ocupação podem ser considerados fatores de risco para o surgimento de gliomas conforme trabalho realizado nos EUA por Fan & Pezeshkpour (1992) através de uma análise étnica de 8.947 casos de tumores primários de câncer do SNC registrados de 1971 a 1985 no Instituto de Patologia das Forças Armadas dos EUA. Este trabalho mostrou que gliomas são duas vezes mais freqüentes em afro-americanos que em caucasóides. E, de acordo com Ohgaki (2009), no leste europeu, América do Norte e Austrália surgem de 6 a 11 novos casos de tumores cerebrais a cada 100 mil pessoas todo ano em homens e de 4 a 11 em mulheres nos mesmos modos. No mesmo estudo o autor revela um alto risco de desenvolvimento de tumores cerebrais em certas ocupações, dentre as quais existe uma alta incidência de gliomas em anatomistas, patologistas e embalsamadores, o que sugere relação com o formaldeído. Zheng *et al.* (2001) apontam o risco de desenvolvimento de glioma relacionado ao uso de plásticos, látex e produtos de arsênio, mercúrio e petróleo.

Outros estudos mostram que casos de síndrome familiar oncológica estão associados à ocorrência de gliomas, uma vez que, membros de famílias de pacientes com glioma podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento deste tipo tumoral do que a população em geral (Louis *et al.*, 2007). É relatado um alto risco de incidência familiar em astrocitomas, porém esse risco é nulo para outro tipo histológico de tumor cerebral (Malmer *et al.*, 1999). Outro estudo do mesmo grupo sugere que a aglomeração familiar ocorre em aproximadamente 5% dos casos de glioma e destes, 1% tem a probabilidade de herança autossômica dominante (Malmer *et al.*, 2001).

## 1.2. ASTROCITOMAS

Os astrocitomas são tumores cujas células predominantes assemelham-se aos astrócitos (**figura 1A**), constituindo aproximadamente 75% dos casos de gliomas. O tumor astrocítico, em particular, causa um aumento anatômico característico nos hemisférios cerebrais dos pacientes, cuja média etária prevalente é de aproximadamente 37 anos (Santos *et al.*, 2001).

Os tumores astrocíticos podem ser classificados seguindo seu grau de estadiamento, de acordo com a OMS, em uma escala de I a IV (**tabela 1 e 2**),

avaliando o grau de malignidade a ser julgado conforme suas características histológicas e alterações genéticas (Louis *et al.*, 2007). Os tumores de **grau I** são biologicamente benignos e sua cura pode ser obtida através de intervenção cirúrgica. Os de **grau II** são considerados neoplasias malignas de baixo grau que podem ocorrer após longo curso clínico. Os de **grau III** apresentam anaplasia e aumento proliferativo comparados aos tumores de grau II, sendo fatais e levando rapidamente ao óbito. Já os de **grau IV**, o maior grau de malignidade, apresentam proliferação vascular e necrose e, pelo fato de poderem ser resistentes a rádio e a quimioterapia, têm uma sobrevida de menos de 12 meses (Furnari *et al.*, 2009).

**Tabela 1:** Classificação dos Astrocitomas e grau de malignidade (WHO – 2009)

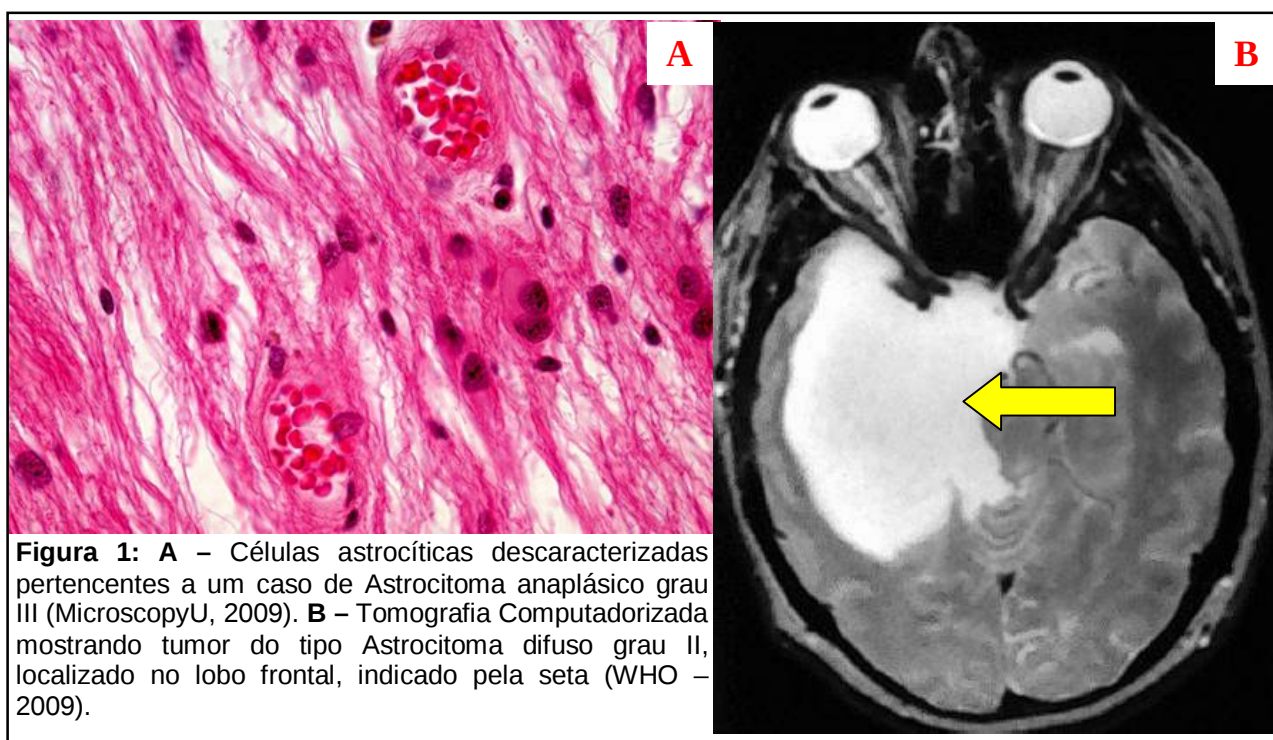
| Tumores Astrocíticos                         | Grau |    |     |    |
|----------------------------------------------|------|----|-----|----|
|                                              | I    | II | III | IV |
| Astrocitoma subependimal de células gigantes | ■    |    |     |    |
| Astrocitoma pilocítico                       | ■    |    |     |    |
| Astrocitoma pilomixóide                      |      | ■  |     |    |
| Astrocitoma difuso                           |      | ■  |     |    |
| Xanthoastrocitoma pleomórfico                |      | ■  |     |    |
| Astrocitoma anaplásico                       |      |    | ■   |    |
| Glioblastoma                                 |      |    |     | ■  |
| Glioblastoma de células gigantes             |      |    |     | ■  |
| Gliossarcoma                                 |      |    |     | ■  |

**Tabela 2:** Classificação histológica dos Astrocitomas - estimativa de sobrevida (Pompéia-RS, 2006)

| Critérios (feições) histológicos                                       | Nome                             | Graduação | Sobrevida  |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|------------|
| 1 critério, geralmente atipias nucleares                               | Astrocitoma difuso de baixo grau | Grau II   | > 5 anos   |
| 2 critérios, geralmente atipias nucleares e mitoses                    | Astrocitoma anaplásico           | Grau III  | 2 a 5 anos |
| 3 ou 4 critérios: atipias, mitoses, proliferação vascular e/ou necrose | Glioblastoma multiforme          | Grau IV   | < 1 ano    |

A distribuição entre os sexos é igual, sendo sua localização topográfica mais comum no lobo frontal (43%) (**figura 1B**), temporal (31%) ou parietal (15%); ocorrendo raramente em outras áreas (Santos *et al.*, 2001).

A maioria dos astrocitomas infiltrativos é anaplásica e os astrocitomas não-anaplásicos possuem um crescimento lento, no qual o tempo entre o início dos sintomas e o estabelecimento do diagnóstico pode se dar em média em até 3 anos (Santos *et al.*, 2001).



**Figura 1:** A – Células astrocíticas descaracterizadas pertencentes a um caso de Astrocitoma anaplásico grau III (MicroscopyU, 2009). B – Tomografia Computadorizada mostrando tumor do tipo Astrocitoma difuso grau II, localizado no lobo frontal, indicado pela seta (WHO – 2009).

Em 50% dos pacientes, o início dos sintomas pode ser súbito. Sintomas como cefaléia, vômitos, astenia psicomotora, depressão da consciência, disfasia, perda somato-sensorial e danos no campo visual podem ocorrer (INCA, 2009).

Estudos já relataram alterações genéticas e citogenéticas em diversos tipos de tumores cerebrais inclusive gliomas, porém, em tumores astrocíticos, poucos estudos foram realizados até o momento, cujos resultados relatam ausência das mutações mais comuns nos demais tipos tumorais (Hodgens, 2007). Por outro lado, Fukushima *et al* (2006) realizaram um estudo associando alterações genéticas de oncogenes e genes supressores de tumor diretamente à gênese tumoral dos astrocitomas.

Sabe-se que alguns fatores ambientais podem contribuir para a etiologia do câncer, aceita-se também que as neoplasias são originadas através de um processo de múltiplos passos conduzidos por alterações de genes e seleção clonal da progênie variante, que vai adquirindo um comportamento progressivamente mais agressivo. Estas mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes celulares: os **oncogenes** e os **genes supressores de tumor**. A grande maioria das mutações em câncer é somática, e presente apenas nas células tumorais. Uma quantidade relativamente pequena dessas mutações pode estar presente na linhagem germinativa dos indivíduos promovendo a predisposição a vários tipos de câncer (Fearon & Cho; 1996).

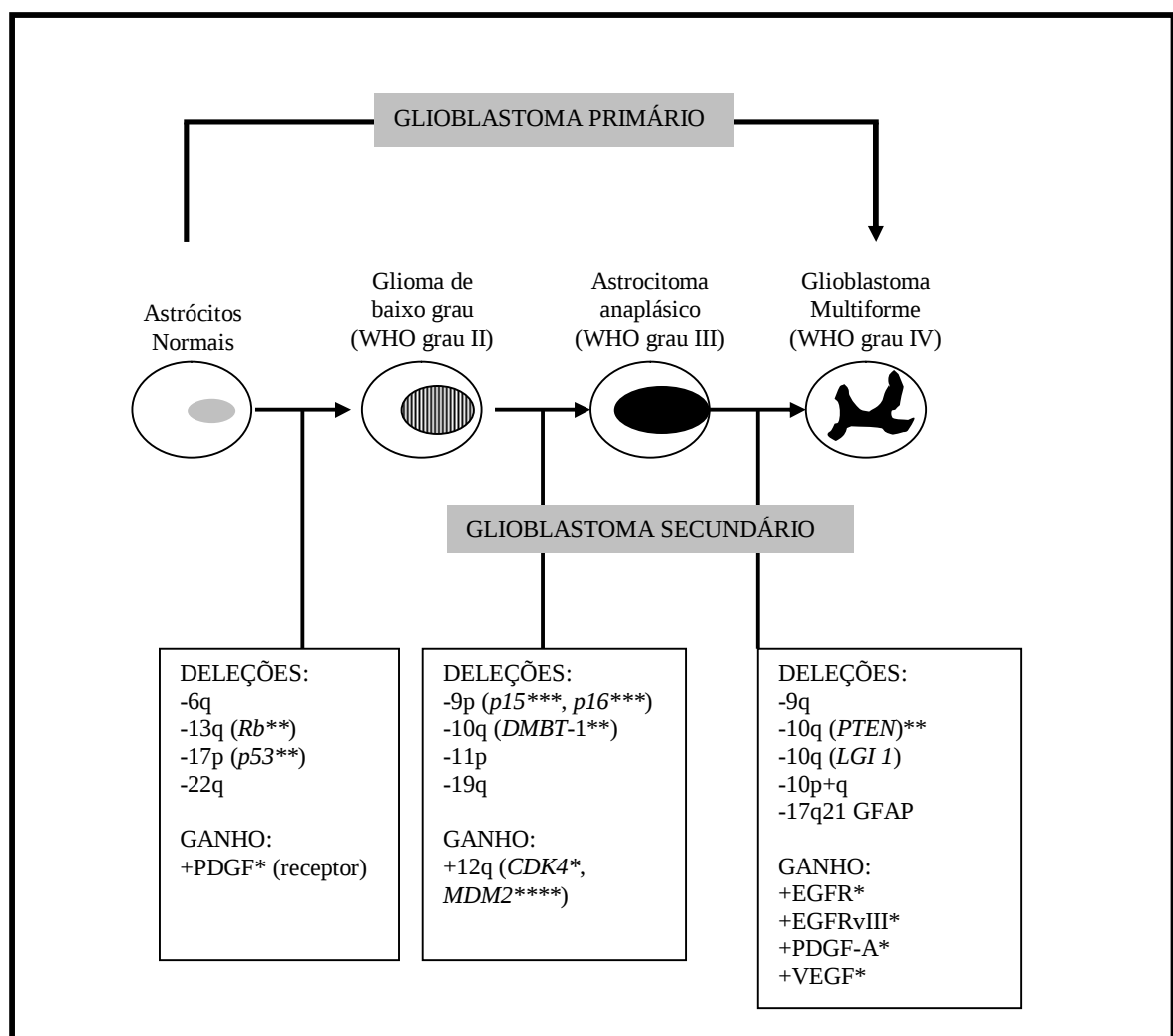
### 1.3. PROTO-ONCOGENES E ONCOGENES

Os proto-oncogenes são genes diretamente relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normal. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA (Lopes *et al.*, 2002).

Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram ativação anormal. Esta ativação é desencadeada através de alterações cromossômicas (translocações e inversões; deleções) e gênicas (amplificações; mutações puntiformes; inserção de DNA viral; *etc.*) conforme exemplifica a **figura 2**. Os mecanismos de ação dos oncogenes não estão totalmente elucidados (Hofee, 2000). Alguns oncogenes produzem oncoproteínas, como a bcl-2, IE84 (Citomegalovírus), SV40-T (vírus SV40), E6 (HPV), EBNA-5 (EBV) e HBx (vírus da hepatite B), que se ligam fortemente e inibem proteínas codificadas por genes supressores do crescimento celular ou indutores da apoptose, como o p53 e o Rb. Com isso, levam à ausência de repressão da divisão ou inibição da morte celular por apoptose, logo, à "imortalidade" celular (Lopes *et al.*, 2002). Outros oncogenes agem levando à produção excessiva de receptores de membrana para fatores de crescimento. Uma terceira via é a produção autócrina de fatores de crescimento, que é observada, por exemplo, na multiplicação e ativação dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-sys* pelo produto do oncogene viral *tax* (HTLV-1). Outras formas de promoção do crescimento neoplásico são a ativação de proto-oncogenes que estimulam a entrada da célula em mitose (ex. *c-myc*) e a produção de proteínas que simulam a ação dos

transdutores de sinal dos receptores de membrana para fatores de crescimento como c-ras e c-abl (Lopes *et al.*, 2000).

Sabe-se que existe uma relação entre câncer e hereditariedade. Muitas neoplasias malignas têm incidência aumentada dentro de uma mesma família em relação a outras, sugerindo algum padrão de herança genética, como por exemplo, o retinoblastoma, o carcinoma de mama, a síndrome de Li Fraumeni e a síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2 (NEM 2). Nesses casos os tumores costumam aparecer em indivíduos mais jovens que nos tumores esporádicos sem relação familiar e se devem à transmissão de um proto-oncogene ou anti-oncogene mutante por um dos pais. No retinoblastoma há herança de um alelo inativo do anti-oncogene *Rb*. Na síndrome de Li Fraumeni ocorre o mesmo com o gene *TP53* (Lopes *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Desenvolvimento tumoral de células gliais (Arquivo pessoal).

\*oncogenes; \*\*genes supressores de tumor, \*\*\*anti-oncogenes, \*\*\*\*anti-supressor de tumor.

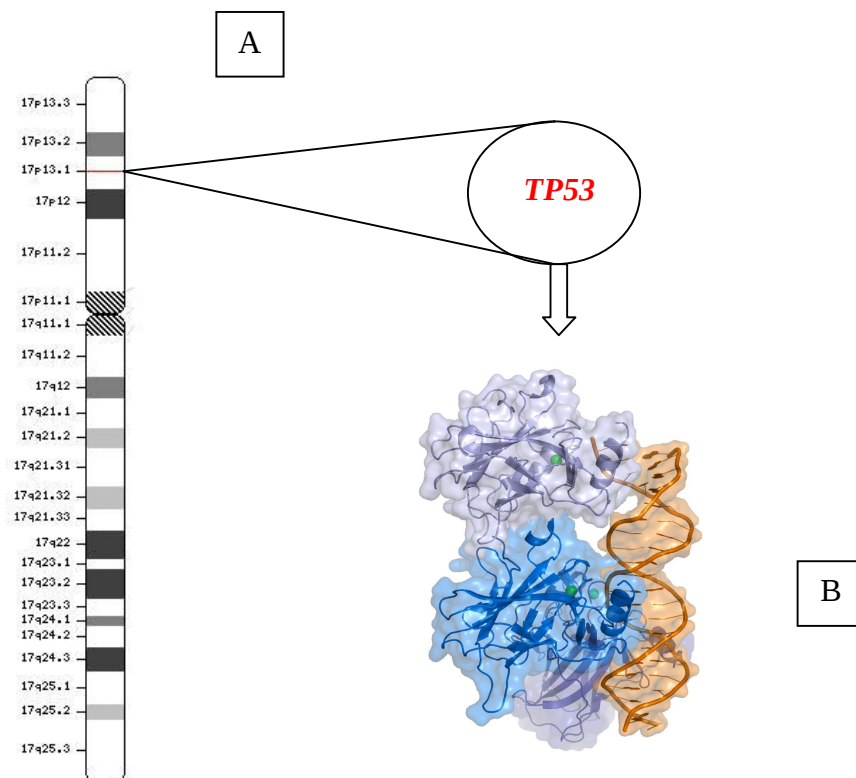
#### 1.4. GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Por uma definição operacional, os genes supressores de tumor são elementos genéticos cuja perda ou inativação permite à célula apresentar algum dos vários fenótipos da transformação neoplásica (FMRP-USP, 2009). Neoplasias como retinoblastoma, tumor de Wilms, meningioma, etc., podem ter uma perda genética de ambos os alelos de um dado gene. A ação recessiva de alelos mutantes de genes supressores de tumor permite que os efeitos resultantes sejam retardados por longos períodos de tempo após a concepção (FMRP-USP, 2009). O retinoblastoma é um tumor da infância e em 20-30% dos casos, ambos os olhos são afetados. Todos esses casos bilaterais e 15% dos casos unilaterais são herdados como um caráter autossômico dominante. O retinoblastoma forneceu a primeira sugestão de que a inativação de um gene específico poderia ser importante para o desenvolvimento do câncer humano. O envolvimento da região cromossômica 13q14 na etiologia do Retinoblastoma foi primeiro inferida pela observação de deleções constitucionais intersticiais de 13q14 em pacientes apresentando retinoblastoma e anomalias congênitas. Tanto as formas hereditárias quanto as esporádicas de retinoblastoma envolvem anormalidades nesta região. Utilizando-se retinoblastoma como modelo, postulou-se que ele é desencadeado por duas lesões sucessivas no genoma celular. No retinoblastoma esporádico, ambas as lesões ocorreriam na linhagem de células da retina como mutações somáticas, mas bem depois da concepção. No retinoblastoma familiar, uma das duas mutações seria herdada de um dos pais ou se originaria durante a gametogênese; a segunda mutação requerida ocorreria então como um evento somático. O primeiro passo seria a inativação de um gene supressor de tumor e o segundo passo seria a inativação de seu alelo. Estas inativações poderiam ser qualquer disfunção epigenética (ex. metilação) ou ausência (monossomia, deleção) do gene (Hofee, 2000). Em gliomas esporádicos (incluindo astrocitomas) a via da p53 está quase invariavelmente alterada, seja por mutações de ponto ou perda cromossômica, evento freqüentemente associado à progressão da doença (Furnari *et al.*, 2009).

#### 1.5. TP53: CONTROLE DO CICLO CELULAR E APOPTOSE

O *TP53*, situado no *loci* 17p13.1 (**figura 3a**), é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma (Pinto *et al.*, 2008). É ativado pelo

surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Sua ativação produz uma proteína (**figura 3b**) que estimula a síntese de outras proteínas, que, por vez, atuarão inibindo a replicação celular através da ligação com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e estimulando as enzimas de reparo do DNA genômico. Caso o reparo do DNA seja completo, o *TP53* é inativado e a célula retorna ao estado normal. Caso não haja reparo satisfatório, a célula permanece impedida de replicar-se e é induzida à apoptose (FMRP-USP, 2009). A apoptose é um tipo de morte celular, desencadeada, entre outros estímulos, por mutações potencialmente lesivas. Outra forma de atuação da proteína p53 é no envelhecimento celular. Durante este processo, as células vão reduzindo gradativamente a produção de mdm2, um inibidor fisiológico da p53. Com isso, células senescentes e diferenciadas continuam sua existência, mas perdem a capacidade de se multiplicar, protegendo o organismo contra tumores (Hoffe, 2000).

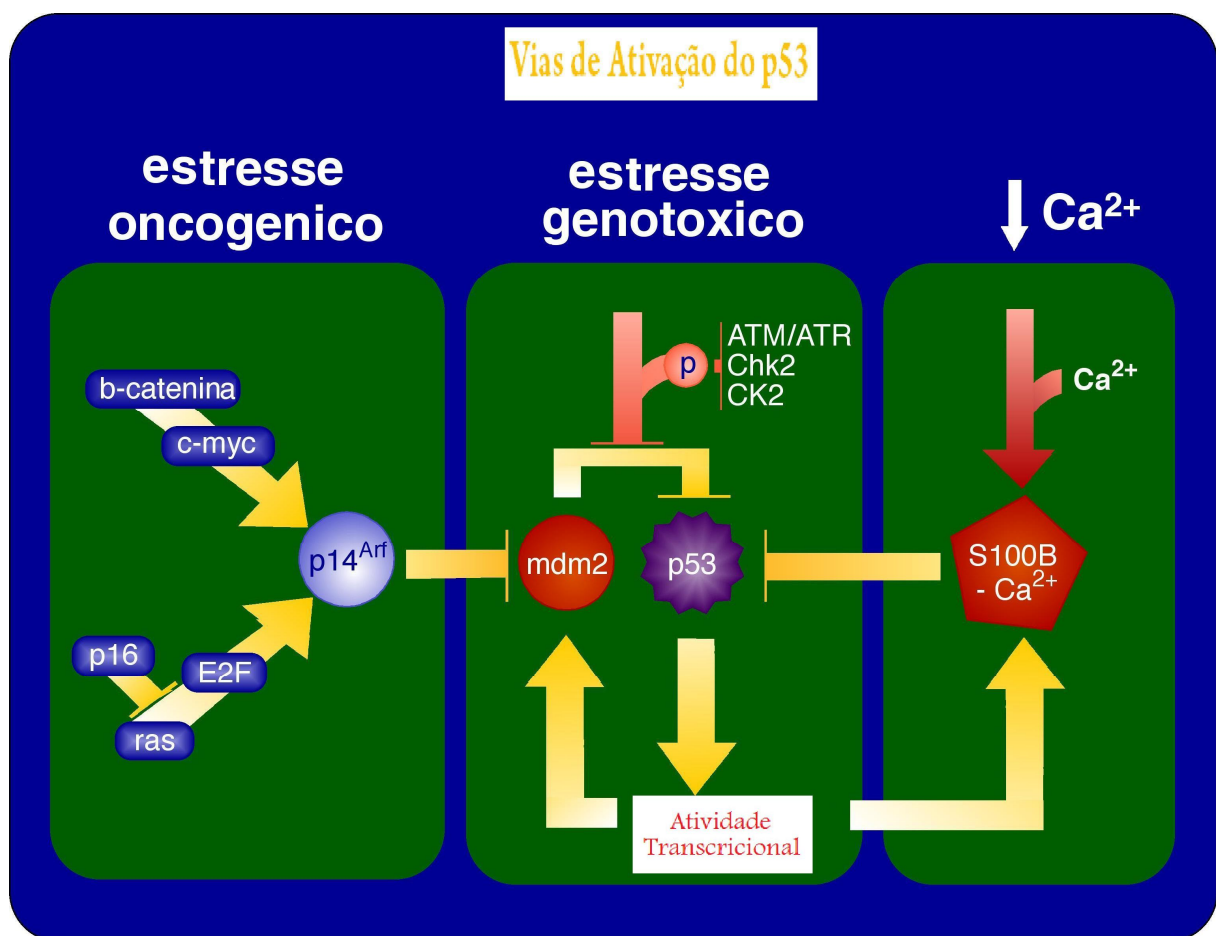


**Figura 3:** **A** - Cromossomo 17 e o *loci* do *TP53* (adaptado do NCBI, 2009). **B** - Proteína p53 (UCSC, 2009).

De acordo com Lowe *et al.*, (2004), as células humanas contêm várias vias de supressão de tumor, apoptose e senescência que podem ser ativadas por

múltiplos estímulos. Dentre elas, a proteína p53 regula múltiplas vias. A **figura 4** mostra algumas vias de ativação desta proteína.

O gene *TP53*, por desempenhar um papel-chave na manutenção da estabilidade genômica (Smith *et al.*, 1995) é denominado como “Guardião do Genoma” (Lane, 1992) e “Estrela da Morte” (Vousden, 2000). A inativação deste gene está associada à instabilidade genômica em diferentes tipos de tumores humanos através de vários mecanismos (Eyfjord *et al.*, 1995).



**Figura 4:** Vias de ativação do *TP53* (University of Maryland, 2009)

Dentre as mutações identificadas do *TP53* em tumores cerebrais astrocíticos, a transição G:C→A:T é a mais freqüente e estão predominantemente localizadas nos sítios CpG (Ohgaki *et al.*, 2007).

O mecanismo melhor caracterizado das transições G:C→A:T nos sítios CpG é a desaminação da 5-metilcitosina nesses sítios, resultando na substituição da 5-metilcitosina por timina. Isto ocorre espontaneamente ou mediado por fator, por

exemplo, através da ação dos radicais de oxigênio ou de óxido nítrico produzido pela síntese de óxido nítrico sob condição de inflamação crônica (Ohshima & Bartsch, 1994).

Uma vez que todos os sítios CpG nos éxons 5-8 do gene *TP53* estão metilados em tecidos humanos saudáveis, fatores que afetam a taxa de desaminação podem influenciar a aquisição da mutação G:C→A:T. No entanto, outros mecanismos também podem desempenhar seus papéis (Ohgaki, 2009). Um possível mecanismo de aquisição da mutação G:C→A:T é devido a agentes alquilantes, desde que o promotor de metilação do gene O6-metilguanina metiltransferase (*MGMT*) esteja associado à presença da mutação G:C→A:T em gliomas (Bello *et al.*, 2004).

#### 1.6. POLIMORFISMOS DO *TP53*

Mutações no gene *TP53* estão presentes em 50% dos tumores em geral (Pinto *et al.*, 2008) e sua sinalização está comprometida em 87% destes (Chin & Meyerson, 2008). O domínio de ligação de DNA da proteína p53 é denominado “*hot spot*” para mutações devido à maioria das mutações da proteína ocorrer nesta região (Zilfou and Lowe, 2009).

No gene *TP53*, a região compreendida como *hot spot* se estende do éxon 4 ao 10 (Pavarino-Bertelli *et al.*, 2002) variando do 4/5 ao 9/10/11 de acordo com outros autores como Fukushima (2006). Além da forma mais conhecida da p53, já foram descritas oito isoformas diferentes e uma nova região promotora no éxon 4 (Bourdon *et al.*, 2005). Estas variantes apresentam padrão de expressão tecido-específico e o promotor alternativo é conservado evolutivamente estando presente tanto na *Drosophila* quanto no homem (Barbosa, 2007). Além disso, parece ocorrer expressão diferencial destas variantes no tecido de tumor de mama e a expressão diferencial destas isoformas pode explicar a dificuldade em associar o *status* da p53 com suas propriedades biológicas em cânceres humanos (Barbosa, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os genes supressores de tumor são elementos genéticos cuja perda ou inativação permite à célula apresentar algum fenótipo neoplásico. Esses genes estão normalmente envolvidos em conter a proliferação celular (Toledo & Wahl, 2007).

O gene *TP53*, responsável pela regulação do ciclo celular, controle e apoptose, sofre inativação em quase 50% das células tumorais (Yang *et al.*, 2004).

Ainda não está claro quantas vias regulatórias diferentes devem estar alteradas para gerar células tumorais, ou se essas vias são semelhantes nos diferentes tipos de câncer (Hanahan & Weinberg, 2000). Não existem estudos concludentes relacionando a inativação gênica ou ocorrência de mutações do *TP53* ao surgimento de tumores do sistema nervoso humano em geral na população brasileira e/ou paraense.

Existe uma grande carência de dados moleculares em tumores do sistema nervoso humano na literatura e, em particular, em astrocitomas essa carência é um pouco mais acentuada. Talvez devido à baixa prevalência deste tipo tumoral em comparação aos demais casos de neoplasias (INCA, 2009).

Sabe-se que os astrocitomas, estão entre os mais devastadores tumores humanos, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade.

Alterações genômicas são fundamentais para a formação e progressão maligna dos tumores, causando modificações na expressão ou função de determinados genes, desregulando vias de sinalização e crescimento (Bredel *et al.*, 2009)

Estudos mostram que a população paraense apresenta peculiaridades genéticas únicas em relação a neoplasias do estômago (Motta, 2004), o que faz desta população um bom objeto para se estudar outros tipos de neoplasias. Além disso, qualquer tipo de informação gerada com estes estudos terá uma utilização muito valiosa, pois poderão gerar dados que serão utilizadas não só na melhora da classificação e diferenciação tumoral, mas também poderão ser empregadas em questões de diagnóstico e prognóstico não só nesta população, mas na população humana como um todo.

Considerando a premissa de que marcadores moleculares podem ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e na escolha adequada do tratamento a ser recebido pelo paciente, que a idade ao diagnóstico tem grande influência no prognóstico, e que o componente étnico influencia na incidência e patogênese molecular dos tumores, a identificação de marcadores envolvidos na progressão tumoral de tumores do SNC, especialmente astrocitomas, são de extrema importância para a saúde pública.

### 3. OBJETIVOS

- Realizar um *screening* de polimorfismos dos éxons 4-10 do gene *TP53* em astrocitomas de pacientes da população paraense.
- Verificar a associação entre os padrões de migração eletroforético dos éxons do gene *TP53* e o grau de estadiamento do tumor.
- Verificar uma possível associação das alterações nos éxons do gene *TP53* dos tecidos tumorais com a idade e/ou o sexo dos pacientes.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Estudos Citogenéticos e Moleculares em Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense”, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (025/06 CEP-CCS/UFGPA), conforme anexo I. Os pacientes ou seus parentes mais próximos foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitou-se a assinatura de um termo de livre consentimento (Anexo I).

Amostras de tecido tumoral foram coletadas durante o procedimento cirúrgico pela equipe de neurocirurgia do hospital Ophir Loyola. O material foi colocado em meio de cultura RPMI, contendo antibióticos, para prevenção de possível contaminação. Imediatamente após sua coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, para processamento.

Foram utilizadas 17 amostras tumorais do sistema nervoso humano classificadas como astrocitomas de diversos graus (**tabela 3**), sendo estas 9 de pacientes do sexo masculino e 8 do sexo feminino (taxa M/F = 1,125), com idades entre 2 e 71 anos. Os laudos histopatológicos desse hospital seguem os padrões da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009).

**Tabela 3:** Caracterização das amostras utilizadas nas análises

| Protocolo | Data de coleta | Sexo | Idade | Exame Histopatológico                          |
|-----------|----------------|------|-------|------------------------------------------------|
| CSN001    | 09/03/2005     | M    | 23    | Astrocitoma Subependimário de células gigantes |
| CSN010    | 18/04/2005     | F    | 12    | Astrocitoma Fibrilar                           |
| CSN012    | 28/04/2005     | M    | 13    | Astrocitoma Pilocítico grau I                  |
| CSN020    | 23/05/2005     | M    | 3     | Astrocitoma Pilomixóide                        |
| CSN022    | 31/05/2005     | M    | 2     | Glioma misto (oligoastrocitoma)                |
| CSN031    | 05/07/2005     | F    | 55    | Astrocitoma grau III                           |
| CSN044    | 29/08/2005     | M    | 60    | Astrocitoma grau III                           |
| CSN058    | 14/10/2005     | M    | 37    | Astrocitoma difuso grau II                     |
| CSN082    | 16/03/2006     | F    | 52    | Astrocitoma fibrilar (glioma grau II- OMS)     |
| CSN098    | 05/06/2006     | M    | 26    | Astrocitoma Fibrilar grau II                   |
| CSN122    | 25/10/2006     | F    | 71    | Astrocitoma Grau IV                            |
| CSN126    | 15/12/2006     | F    | 34    | Astrocitoma difuso Grau II                     |
| CSN130    | 23/01/2007     | F    | 51    | Astrocitoma Grau IV                            |
| CSN136    | 09/05/2007     | M    | 64    | Astrocitoma difuso Grau II                     |
| CSN145    | 04/09/2007     | F    | 27    | Astrocitoma pilocítico anaplásico              |
| CSN146    | 11/10/2007     | F    | 31    | Astrocitoma Anaplásico                         |
| CSN167    | 08/05/2008     | M    | 14    | Astrocitoma Grau II de diferenciação.          |

De acordo com Pavarino-Bertelli *et al.* (2002), que classificam como região de “*hot spot*” aquela compreendida do éxon 4 ao 10, foram desenhados e sintetizados com auxílio do banco de dados do MegaBlast (NCBI) e *engine* do *Primer3Plus*, iniciadores específicos para as regiões dos éxons 4, 5, 7, 8, 9 e 10 (tabela 4).

**Tabela 4:** Iniciadores utilizados neste trabalho

| P          | Seqüência             | Tam<br>Iniciador | Tam<br>éxon | TA    | GC%  |
|------------|-----------------------|------------------|-------------|-------|------|
| <b>4F</b>  | TTTCACCCATCTACAGTCCC  | 20pb             | 279pb       | 51 °C | 50,0 |
| <b>4R</b>  | CATTGAAGTCTCATGGAAGC  | 20pb             |             |       | 45,0 |
| <b>5F</b>  | TTCACTTGTGCCCTGACTT   | 19pb             | 184pb       | 52 °C | 47,4 |
| <b>5R</b>  | AACCAGCCCTGTCCGTCTC   | 19pb             |             |       | 63,2 |
| <b>7F</b>  | TGCTTGCCACAGGTCT      | 16pb             | 110pb       | 54 °C | 56,3 |
| <b>7R</b>  | ACAGCAGGCCAGTGT       | 15pb             |             |       | 60,0 |
| <b>8F</b>  | CCACCGCTTCTTGTCCTGC   | 19pb             | 137pb       | 54 °C | 52,6 |
| <b>8R</b>  | CCTTACTGCCTCTTGCTTC   | 19pb             |             |       | 63,2 |
| <b>9F</b>  | AGGGTGCAAGTTATGCCTCAG | 20pb             | 74pb        | 51 °C | 55,0 |
| <b>9R</b>  | ACTTGATAAGAGGTCC      | 16pb             |             |       | 43,8 |
| <b>10F</b> | CTGAGGCACAAGAATCAC    | 18pb             | 107pb       | 52 °C | 50,0 |
| <b>10R</b> | TCCTATGGCTTTCCAACC    | 18pb             |             |       | 50,0 |

#### 4.1. EXTRAÇÃO DO DNA DO TECIDO TUMORAL

Foi feita extração do DNA das amostras tumorais utilizando o método do fenol-clorofórmio, no qual as células do tecido tumoral são lisadas em solução tampão e as proteínas digeridas com proteinase K. Após isto o DNA é precipitado com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, com concentração proporcional de 25:24:1, respectivamente, centrifugado a 14.000 rpm durante 15 minutos, seguido de outra precipitação com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugado novamente a 14.000 rpm por mais 15 minutos, eluído em etanol 100%, isolado com acetato de sódio (neste momento o *pellet* do DNA pode ser visualizado) e finalmente eluído em solução de Tris-EDTA (TE) com pH 8.0 (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 4.2. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Utilizando estas amostras de DNA, foram feitas Reações da Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os iniciadores e os programas descritos na **tabela 4**. As reações foram padronizadas realizando-se uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguidos por três ciclos repetidos por 35 vezes: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores (ver **tabela 4**), extensão a 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos-modelo utilizados como padrão para os aqui estudados foram obtidos no Mega Blast (NCBI, 2009).

#### 4.3. POLIMORFISMOS CONFORMACIONAIS DE FITA SIMPLES (SSCP)

Depois de amplificados, os fragmentos de interesse foram imersos em solução desnaturante e submetidos a 95° C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, com a finalidade de executar a técnica de rastreamento de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (*Single Strand Conformational Polymorphism* – SSCP). Em seguida, foi induzido o choque térmico (imersão em gelo) nas amostras para estabilização das bandas simples e posterior aplicação em gel de poliacrilamida nas condições descritas na **tabela 5**.

Para controle do padrão de migração no gel de SSCP, foram utilizadas 2 amostras de indivíduos clinicamente saudáveis e sem histórico de câncer.

Os géis foram fixados com solução à base de etanol (10%), ácido acético (0,75%) e adição de solução de AgNO<sub>3</sub> (1 ml); e, finalmente, revelados com solução à base de NaOH (30%) e formaldeído (0,6%).

**Tabela 5:** Condições de execução do gel de SSCP

| Éxon | Concentração do gel | Voltagem | Tempo |
|------|---------------------|----------|-------|
| 4    | 8%                  | 240V     | 4h    |
| 5    | 8%                  | 240V     | 4h30m |
| 7    | 8%                  | 240V     | 4h30m |
| 8    | 10%                 | 100V     | 12h   |
| 9    | 8%                  | 240V     | 4h30m |
| 10   | 8%                  | 240V     | 4h30m |

#### 4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis preditoras definidas foram sexo (dicotômica), idade (contínua) e presença ou não de polimorfismo (dicotômica) no gene *TP53* relacionadas com o grau tumoral das amostras estudadas (categórica). Definidas as variáveis e delimitando que seriam testadas duas a duas, sendo estas independentes entre si, foram escolhidos os testes estatísticos de Mann-Whitney (MW) e Kolmogorov-Smirnov (KS).

O teste de MW é direcionado a testar diferença entre medianas, assim como chances de obtenção de observações mais presentes em uma população contra outra, onde a significância é obtida através do valor de  $p$  ( $p \leq 0,05$ ). A hipótese nula no teste de MW é que as duas amostras são provenientes de uma única população, e, portanto, que as distribuições à sua probabilidade são iguais. Neste teste é exigido que as amostras sejam independentes.

O teste de KS, semelhante ao de MW, compara duas amostras independentes, porém, estimando a distância mínima entre elas. É um teste não paramétrico de igualdade entre as distribuições de probabilidade bidimensional e, assim como no teste de MW, a significância é obtida através do valor de  $p$  ( $p \leq 0,05$ ), sendo este unilateral, para igualdade dentro do grupo, e bilateral para igualdade/distância entre dois grupos. O teste de KS em duas amostras é um dos métodos (não-paramétricos) mais úteis para comparação de duas amostras, uma vez que é sensível às diferenças em ambas, localização e forma das funções de distribuição cumulativa empírica das duas amostras.

## 5. RESULTADOS

De acordo com nossos dados amostrais, analisados com auxílio dos *softwares* BioEstat 5.0® e Microsoft Office Excel 2007®, a média de idade entre homens foi de 26,8 e mediana de 23 anos. Entre as mulheres, a média foi de 41,6 e a mediana de 42,5 anos. Embora esses valores estejam aparentemente distantes, o teste estatístico de MW não apresentou diferença significativa entre eles, com  $p > 0.05$ .

Em relação ao grau de agressividade do tumor, mulheres apresentaram uma mediana mais próxima do grau III enquanto os homens ficaram concentrados no grau II (MW  $p = 0,03$ ).

Ao compararmos a distribuição de idade entre os graus, os testes estatísticos de MW e KS mostraram diferenças relevantes aproximando os pacientes mais jovens dos tumores menos agressivos, ao passo que se aumenta o grau de agressividade do tumor, a mediana etária acompanha esse aumento (**tabela 6**).

**Tabela 6:** comparação grau x idade nos testes de Mann-Whitney e Kolmogorov-Smirnov

| Graduação Tumoral | Idade Mediana | Significância                                                |
|-------------------|---------------|--------------------------------------------------------------|
| I                 | 12            | I x II $p = 0,01$<br>I x III $p = 0,01$<br>I x IV $p < 0,01$ |
| II                | 35,5          | II x III $p < 0,01$<br>II x IV $p < 0,01$                    |
| III               | 43            | III x IV $p < 0,01$                                          |
| IV*               | -             | -                                                            |

\*O baixo número amostral impede a aferição de mediana

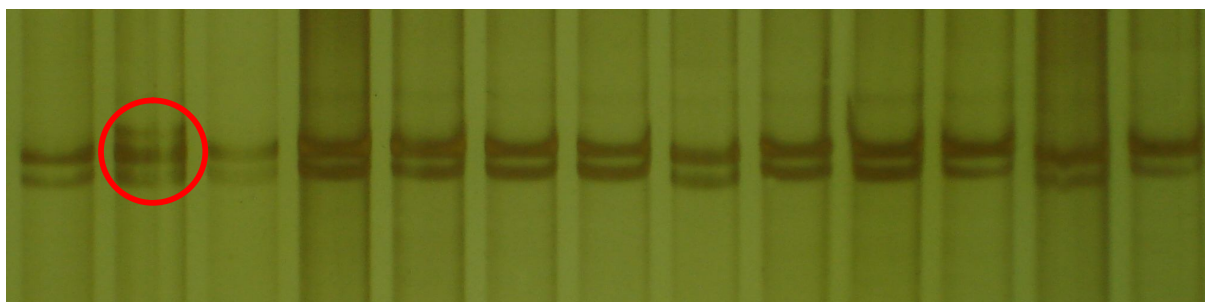
Das 17 amostras tumorais utilizadas neste estudo, 23,52% (4) apresentaram padrão diferenciado de migração no gel de SSCP, conforme descreve a **tabela 7**. Levando em consideração o número de éxons alterados, esse número sobre para 29,41% (5) de mutação na *TP53* neste tipo tumoral. Os experimentos em cada éxon estão expostos nas **figuras 5-10**.

**Tabela 7:** Amostras alteradas após screening pela técnica de PCR-SSCP.

| Amostra | Sexo | Idade (anos) | Grau | Éxon alterado |
|---------|------|--------------|------|---------------|
| CSN031  | F    | 55           | III  | 4 e 5         |
| CSN098  | M    | 26           | II   | 7             |
| CSN146  | F    | 31           | III  | 7             |
| CSN167  | M    | 14           | II   | 7             |

### 5.1. ÉXON 4

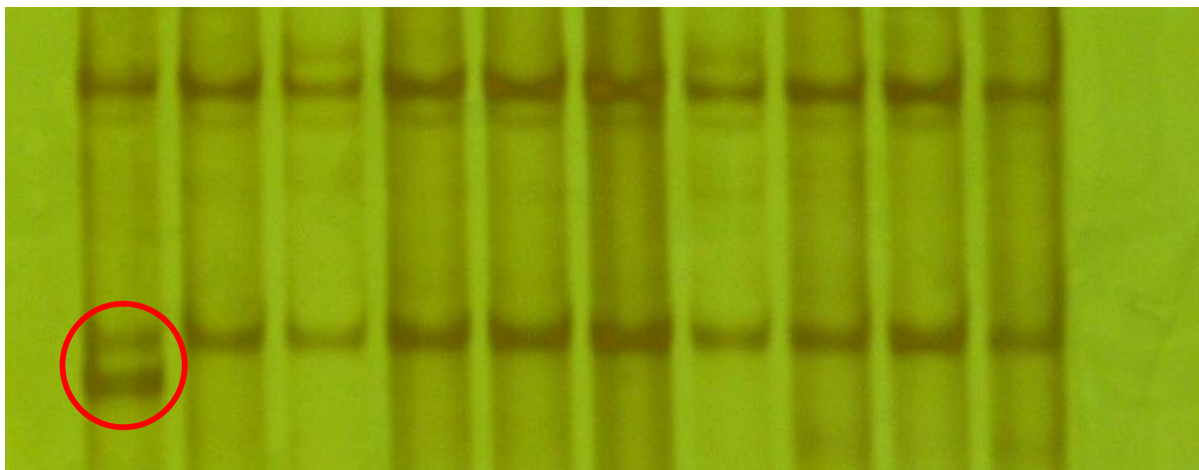
A análise do éxon 4 apresentou padrão diferenciado de migração em 5,89% das amostras (**tabela 7**), cujo laudo histopatológico da amostra polimórfica a classifica como Astrocitoma Grau III (**figura 5**).



**Figura 5:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 8% sem glicerol do éxon 4 do gene *TP53*. Em destaque o polimorfismo encontrado.

## 5.2. ÉXON 5

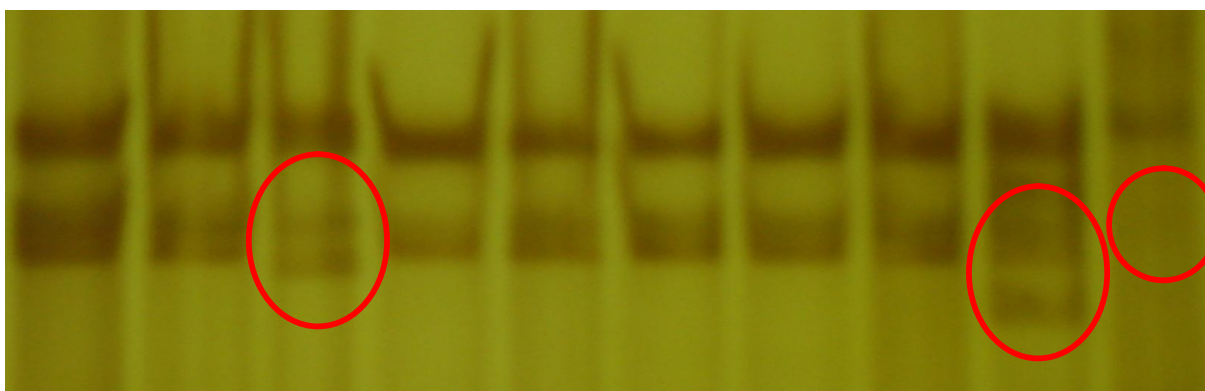
A análise do éxon 5, semelhante ao éxon 4, também apresentou padrão diferenciado de migração em 5,89% da amostras, revelando alteração na mesma amostra (**tabela 7**), classificada como heteromórfica para aquele éxon (**figura 6**).



**Figura 6:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 8% sem glicerol do éxon 5 do gene *TP53*. Em destaque o polimorfismo encontrado.

## 5.3. ÉXON 7

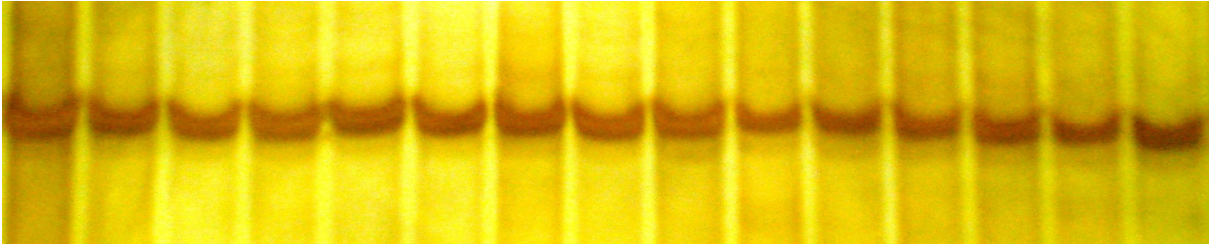
Este éxon apresentou 17,65% das amostras com padrão diferenciado de migração (descritas na **tabela 7** e apresentadas na **figura 7**), cujos laudos classificam-nas respectivamente como Astrocitoma Fibrilar Grau II, Astrocitoma Anaplásico (grau III) e Astrocitoma de Grau II de diferenciação.



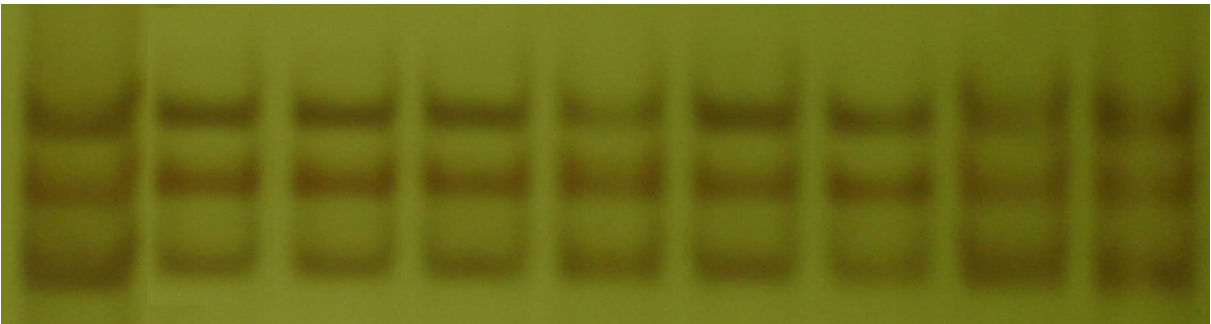
**Figura 7:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 8% sem glicerol do éxon 7 do gene *TP53*. Em destaque os polimorfismos encontrados.

#### 5.4. ÉXONS 8-10

Os éxons 8, 9 e 10 apresentaram padrão monomórfico de migração conforme demonstrado nas **figuras 8, 9 e 10**.



**Figura 8:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 10% sem glicerol do éxon 8 do gene *TP53*. Bandas de caráter monomórficos.



**Figura 9:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 8% sem glicerol do éxon 9 do gene *TP53*. Bandas de caráter monomórficos.

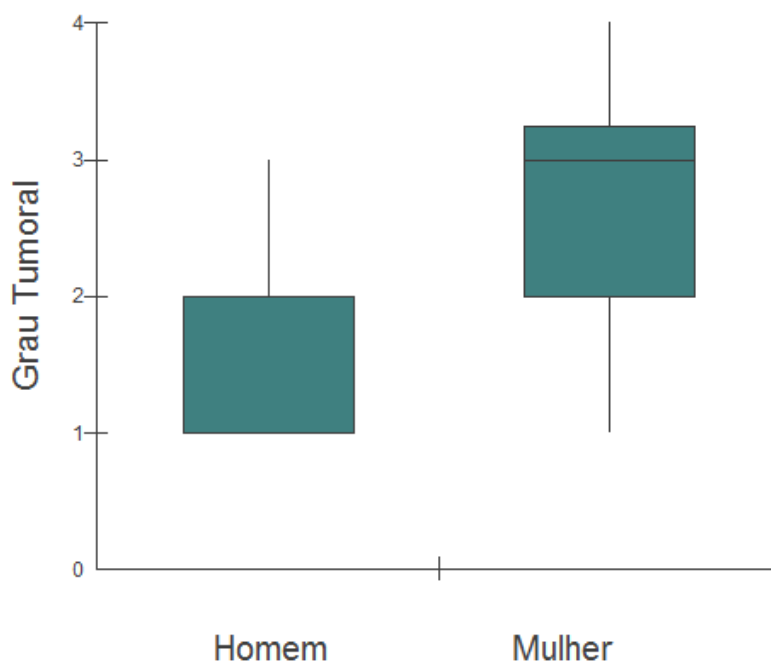


**Figura 10:** Fotografia de gel de poliacrilamida a 8% sem glicerol do éxon 10 do gene *TP53*. Bandas de caráter monomórficos.

## 6. DISCUSSÃO

Os dados amostrais descrevem uma mediana etária mais alta para mulheres em relação aos homens com este tipo tumoral, embora não tenhamos encontrado significância estatística (MW e KS  $p>0,05$ ). A ausência de significância estatística talvez tenha sido em decorrência do baixo número amostral deste tipo tumoral.

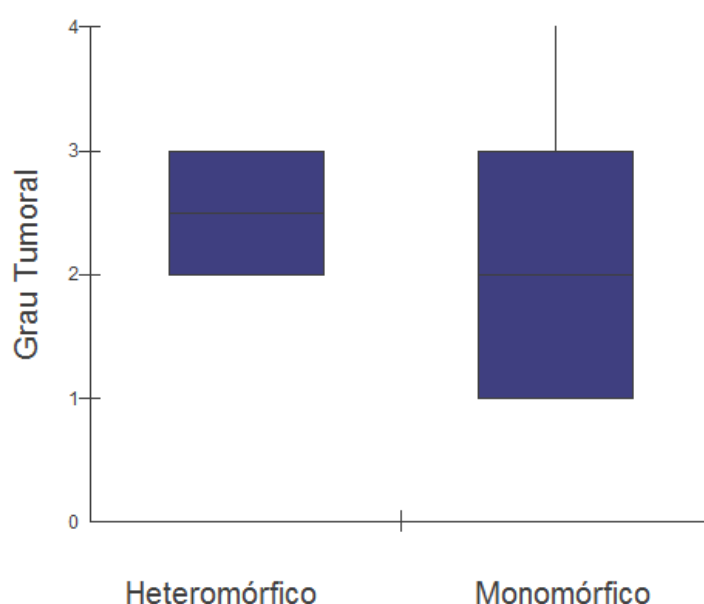
Ao relacionarmos o sexo dos pacientes com o grau tumoral, o teste de MW revelou significância ( $p=0,03$ ), associando os graus mais avançados às mulheres (**Figura 11**). Ao contrário do que possa parecer, os tumores de graus mais avançados surgem em mulheres com mediana etária maior, enquanto nos homens, esse tipo tumoral surge mais cedo e em grau menor, onde tal achado, segundo Zheng *et al.* (2001), pode estar relacionado ao risco ocupacional, considerando que as profissões em que o indivíduo sofre maior exposição a agentes cancerígenos (formaldeído, látex, arsênio, mercúrio, petróleo, etc.) são mais comuns entre os homens.



**Figura 11:** Box-plot mostrando mediana e desvio-padrão das amostras analisadas relacionando grau tumoral ao sexo dos indivíduos estudados.

Nossos resultados apontam alterações em 23,52% das amostras, semelhante aos achados de Fukushima *et al.* (2006), que observaram uma taxa de 22% de mutação no *TP53* em glioblastomas em um estudo feito na população japonesa.

Os padrões de migração do gel de SSCP revelaram alteração das amostras: CSN031, CSN098, CSN146 e CSN167, sendo que a amostra CSN031 apresentou diferenciação em dois éxons (4 e 5). As amostras alteradas concentraram-se entre os graus II e III, com uma taxa de 50% para cada grau. Em análises estatísticas, o teste de KS não apresentou distância significativa entre os grupos monomórficos e heteromórficos para PCR-SSCP e suas respectivas idades, o que não nos permite afirmar que a mutação no gene *TP53* não está diretamente relacionada com o envelhecimento. Porém, ao relacionarmos as amostras alteradas aos graus de desenvolvimento tumoral, o mesmo teste demonstrou valor significativo ( $p < 0,01$ ) (**Figura 12**), o que nos permite afirmar que as mutações de ponto não caracterizam o surgimento das neoplasias, mas o desenvolvimento de uma neoplasia de baixo grau para alto grau, levando assim à perda da função da p53. Este achado concorda com um estudo anterior feito por Ng & Lam (1998). Além do mais, Furnari *et al.* (2009) afirmam que o papel da p53 na gliomagenese ainda não pode ser medido, uma vez que as mutações deste gene em astrocitomas de baixo grau também podem estar associados à ocorrência da síndrome familiar de Li-Fraumeni.



**Figura 12:** *Box-plot* mostrando mediana e desvio-padrão das amostras analisadas relacionando padrão de migração ao grau tumoral dos indivíduos estudados.

Nos dados obtidos com análise da amostra CSN031, onde foram encontradas alterações nos éxons 4 e 5, a amostra tumoral era de paciente do sexo feminino, com 55 anos de idade. Esta paciente se enquadra nos padrões descritos nos resultados deste estudo, que apresenta uma prevalência de tumores de grau maior entre pacientes do sexo feminino, com uma mediana de idade também maior, em comparação aos pacientes do sexo masculino. Pinto *et al.* (2008), em estudo feito em uma população de Barretos-SP, descrevem o polimorfismo **Arg72Pro** (no éxon 4) como a mais comum nos gliomas porém, seus dados estatísticos não associam esta mutação à susceptibilidade dos pacientes a este tipo tumoral.

Em estudo realizado em uma população na Índia, Phatak *et al.* (2002), utilizando a técnica de PCR-SSCP, relatam o éxon 5 do gene *TP53* mutado em 6,8% dos gliomas estudado, resultado muito próximo ao encontrado no presente estudo. Ainda, semelhante aos nossos achados, Phatak *et al.*, no mesmo estudo e Okamoto *et al.* (2004) associam mutações no *TP53* à progressão tumoral ao descreverem a predominância de mutações nos éxons 4 e 5 em astrocitomas de grau II e III.

O éxon 5 desta amostra CSN031 foi previamente seqüenciado e revelou a inserção de uma adenina no primeiro códon do éxon 5, caracterizando uma mutação do tipo *frameshift*, provocando um erro de leitura nos códons subseqüentes. Esta inserção resulta em troca do aminoácido tirosina por um códon de parada (**Tyr126stop**) interrompendo a tradução da proteína, formando então um produto truncado. De acordo com bancos de dados (NCBI e IARC), esta mutação ainda não foi descrita na literatura. No mesmo éxon encontramos a transição de uma timina por citosina no códon 144, o que caracteriza a mutação **Val144Ala**, resultando em uma proteína inviável, já relatada por outros autores (Costa-Júnior *et al.*, 2008).

O éxon 7 apresentou diferença no padrão de migração em 17,65% das amostras, sendo duas de grau II e uma de grau III, sugerindo que as mutações ocorrem neste éxon em um estágio mais elevado da doença. Diferente de nossos achados, Phatak *et al.* (2002) relataram mutação em apenas 1,85% das amostras de gliomas nesse éxon e Vos *et al.* (2002), nos mesmos parâmetros, relataram uma taxa de mutação de 5,4% em amostras de câncer de esôfago. Nossos resultados aproximam-se mais dos descritos por Okamoto *et al.* (2004) que, em estudo baseado em tumores astrocíticos, descrevem 23% de mutações deste éxon em

oligoastrocitomas e astrocitomas fibrilares (ambos de grau II). Ainda, de acordo com nossos resultados, foi possível aferir uma mediana etária de 31 anos ( $p < 0,01$  para idade e grau tumoral, teste de KS) entre os indivíduos que se mostraram heteromórficos para este éxon no gel de SSCP. De acordo com Pereira *et al.* (2008), as mutações neste éxon estão associadas à higiene de hábitos alimentares (aspergilose causada pelo *A. flavus*) e ao alcoolismo crônico (cirrose hepática) onde ambos fatores ambientais permitem exposição a aflatoxinas, cujo metabólito liga-se à guanina do códon 249 induzindo sua transversão por uma timina, inativando a p53.

Vale ressaltar que, embora tenham sido rastreadas neste trabalho quatro amostras portadoras de mutações em três éxons do gene *TP53*, as amostras de caráter monomórfico para PCR-SSCP (ex: éxons 8 a 10) podem apresentar isoformas inviáveis da p53, processadas através de *splicing* alternativo (Bourdon *et al.*, 2005) e muito difíceis de detectar com a técnica descrita neste trabalho.

## 7. CONCLUSÃO

- Em nossos dados amostrais não houve diferença na mediana etária entre as amostras tumorais de homens e mulheres.
- A prevalência de astrocitomas de baixo grau e em idade mais precoce nos adultos pode estar associada ao risco ocupacional, onde, em algumas profissões, há exposições freqüentes a agentes cancerígenos.
- As alterações descritas neste trabalho sugerem que as mutações de ponto não são determinantes para o surgimento das neoplasias, mas podem estar associadas à progressão de uma neoplasia de baixo grau para alto grau. Porém, deve-se levar em consideração que as mutações do gene *TP53* em astrocitomas de baixo grau também podem estar associados à ocorrência da síndrome familiar de Li-Fraumeni.
- O aparente monomorfismo do *TP53* em astrocitomas pode estar relacionado a outros tipos de mecanismos de inativação do gene, como eventos epigenéticos, alterações mutacionais em outros pontos além dos aqui estudados ou mesmo por alterações em outros genes que participam do controle da via da p53.
- Faz-se necessário aumentar o número amostral do tipo tumoral em estudo para que, dessa forma, se possa aumentar o intervalo de confiança relacionado aos dados estatísticos e assim melhorar a acurácia entre as alterações encontradas e o grau de estadiamento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antequera, F. & Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90**(24): 11995-11999. 1993.
- Ayres M.; Ayres M.Jr.; Ayres D.L. & dos Santos A.S. **Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém-PA: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 2008. 290 pp.
- Barbosa, R.N.F. Dissertação de Mestrado: **Análise molecular dos éxons 8 a 11 do gene da p53 em amostras de câncer de colo do útero no Rio Grande do Norte**. Natal-RN. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007. 66pp.
- Bello, M.J.; Alonso, M.E.; Aminoso, C.; Anselmo, N.P.; Arjona, D.; Gonzalez-Gomez, P.; Lopez-Marin, I.; de Campos, J.M.; Gutierrez, M.; Isla, A.; Kusak, M.E.; Lassaletta, L.; Sarasa, J.L.; Vaquero, J.; Casartelli, C. & Rey, J.A. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with *TP53* G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. **Mutation Research**. **554**: 23-32. 2004.
- Bird, A. The essentials of DNA methylation. **Cell**, **70**: 5-8. 1992.
- Bourdon, J.C.; Fernandes, K.; Murray-Zmijewski, F.; Liu, G.; Diot, A.; Xirodimas, D.P.; Saville, M.K. & Lane, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes & Development**, **15**;19(18); 2122-2137. 2005.
- Bredel, M. Translating biological insights into clinical endpoints in neuro-oncology. **Lancet Oncology**, **10**(10): 928-929. 2009.
- Carr, J.; Bell E.; Pearson, D.J.; Kees, U.R.; Beris, H.; Lunec, J. & Tweddle A. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14ARF pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. **Cancer Research**, **66**: 2138-2144. 2006.
- Chauffaille, M. L. L. F. Alterações Moleculares em Síndromes Mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **8**: 1-3. 2006.
- Chin, L. & Meyerson, M. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, **455**: 1061-1068. 2008.
- Clark, S.J.; Harrison, J.; Paul, C.L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, **22**: 2990-2997. 1994.

- Costa-Júnior., C.A.; Braga, A.C.B.; Serrão, D.V.; Brito, J.R.N.; Harada, M.L.; de Oliveira, E.H.C. & Anselmo, N.P. Estudos preliminares na região *hot spot* do gene *TP53* em tumores do sistema nervoso humano em pacientes da população paraense. In: **54º Congresso Brasileiro de Genética**, 1, 2008. Salvador. Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genetica. Ribeirão Preto: SBG, 2008.
- Esteller, M. Anthony Dipple. Carcinogenesis a ward winner. The necessity of a human epigenome project. **Carcinogenesis**, 1121-1125, 2006.
- Eyford, J.E.; Thorlacius, S.; Steinarsdottir, M.; Valgardsdottir, R.; Ogmundsdottir, H.M. & Anamthawat-Jonsson, K. p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. **Cancer Research**, 55: 656-651. 1995.
- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Site didático de anatomia patológica, neuropatologia e neuroimagem. 2009. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas> Acesso em: 23 jun 2009.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://lgmb.fmrp.usp.br/dgfto/.../APOSTILA-GENETICAECANCER.doc> Acesso em: 23 jun 2009.
- Fan, K.J. & Pezeshkpour, G.H. Ethnic distribution of primary central nervous system tumors in Washington, DC, 1971 to 1985. **Journal of National Medicine Association**, 84: 858-863. 1992.
- Fearon, E.R. & Cho, K.R. **The molecular biology of cancer**. In: Principles and practice of medical genetics. Emery, A.H.E. and Rinoia, D.L, ed. 3rd. edition. Churchill Livingstone, New York pp.405-438.1996.
- Fernandes Júnior, H.J.; Bifulco, V.A. & Barboza, A.B. Câncer: **Uma visão multiprofissional**. Barueri-SP. Minha Editora, 2009. 479pp.
- Fukushima, T.; Favereaux, A.; Huang, H.; Shimizu, T.; Yonekawa Y.; Nakazato Y.; & Ohagki, H. Genetic alterations in primary glioblastomas in Japan. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 65(1): 12-18. 2006.
- Furnari, F.B.; Fenton, T. & Bachoo, R.M. Malignant Astrocytic Glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, 21: 2683-2710. 2009.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. The hallmarks of cancer, **Cell**, 100(1): 57-70. 2000.
- Hellebrekers, D.M.; Melotte, V.; Viré, E.; Langenkamp, E.; Molema, G.; Fuks, F.; Herman, J.G.; Van Criekinge, W.; Griffioen, A.W. & van Engeland, M. Identification of

epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. **Cancer Research**, **67**(9): 4138-4148. 2007.

Hodge, D.R.; Peng, B.; Cherry, J.C.; Hurt, E.M.; Fox, S.D.; Kelley, J.A.; Munroe, D.J. & Farrar W.L. Interleukin 6 supports de maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. **Cancer Research**, **65**(11): 4673-4682. 2005

Hodgson, S.; Foulkes, W.; Eng, C. & Maher, E. **A Pratical Guide to Human Cancer Genetics**. Cambridge, UK. Cambridge University Press, 2007. 411pp.

Hoffee P.A. **Medical Molecular Genetics**. Pittsburgh-PA: University of Pittsburgh School of Medicine, 2000. 319pp.

Hospital Pompéia. Caxias do Sul-RS. 2006. Disponível em: <http://www.pompeia.org.br>  
Acesso em: 12 abr 2009.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>  
Acesso em 27 nov 2009.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Acesso em: 27 nov 2009.

Jones, P.A. & Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, **3**: 415-428. 2002.

Jones, P.A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, **293**: 1068-1070. 2001.

Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, **358**(6381): 15-16. 1992.

Lopes, A.A.; Oliveira, A.M. & Prado, C.B.C, Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, **2**: 1-7. 2002.

Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvett, A.; Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. The WHO Classification of tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathology**, **114**: 97-109. 2007.

Lowe, S.W.; Cerpero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, **432**: 307-315. 2004.

Malmer, B.; Gronberg, H.; Bergenheim, A.T.; Lenner, P. & Henriksson, R. Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: an epidemiological cohort study. **International Journal of Cancer**, **81**: 366-370. 1999.

Malmer, B.; Iselius, L.; Holmberg, E.; Collins, A.; Henriksson, R. & Gronberg, H. Genetic epidemiology of glioma. **British Journal of Cancer**, **84**: 429-434. 2001.

- Martins, D.C.; Stávale, J.N.; Malheiros, S.M.F.; Santiago, L.H.S.; Roman, L.C.M.; Aguiar K.C.C. Índice de Astrócitos gemistotócitos e imuno-expressão da proteína p53 em astrocitomas, grau II e III OMS, **Arquivos de Neuropsiquiatria**, **59**(4): 926-931. 2001.
- Medicinal Chemistry. University of Cambridge. 2009. Disponível em: <http://www-medchem.ch.cam.ac.uk> Acesso em: 20 out 2009.
- MicroscopyU. The source for microscopy education. 2009. Disponível em: <http://www.microscopyu.com> Acesso em: 25 mai 2009.
- Motta, F.J.N. **Instabilidade de Microssatélites em Tumores Gástricos na População Paraense**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós- graduação em genética e biologia molecular. UFPA. Belém-PA. 2004.
- NCBI. NCBI Map Viewer. 2009. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> Acesso em 11 out 2009.
- Ng, H.K. & Lam, P.Y.P. The Molecular Genetics of central Nervous System Tumors. **Pathology**, **30**: 196-202. 1998.
- Ohgaki, H. Epidemiology of Brain Tumors. **Methods of Molecular Biology, Câncer Epidemiology**, **472**: 323-342. 2009.
- Okamoto, Y.; Patre, P.L.; Burkhard, C.; Horstmann, S.; Fahey, B.J.M.; Schuler, D.; Probst-Hensch, N.M.; Yasargil, M.G.; Yonekawa, Y.; Lutolf, U.M.; Kleihues, P. & Ohgaki, H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. **Acta of Neuropathology**, **108**: 49-56. 2004
- Oshima, H. & Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutation Research**, **305**: 253-264. 1994.
- Pereira, T.A.; Carvalho, F.M.; Jarske, R.; Pereira, F.E.L. & Louro, I.D. Análise do códon 249 do gene TP53 em fígados cirróticos sem carcinoma hepatocelular no Espírito Santo, Brasil. In: **54º Congresso Brasileiro de Genética**, **1**, 2008. Salvador. Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2008.
- Phatak, P.; Selvi, S.K.; Divya, T.; Hegde, A.S.; Hegde, S. & Somasundaram, K. Alterations in tumour suppressor gene p53 in human gliomas from Indian patients. **Journal of Biosciences**, **27**(7): 673-678. 2002.

- Pinto, G.R.; Yoshioka, F.K.N.; Silva, R.L.L.; Clara, C.A.; Santos, M.J.; Almeida, J.R.W.; Burbano, R.R.; Rey, J.A. & Casartelli, C. Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 7(1): 207-216. 2008.
- Primer3plus. Primer 3 plus. 2009. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> Acesso em 14 mar 2009.
- Salzano F.M. **Genética e Ambiente**. Porto Alegre-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 6pp.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v. 3104p.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, **Biotechnology**, 24: 104-108. 1992.
- Sanger. The Sanger Institute. 2009. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/> Acesso em: 20 out 2009.
- Santos , R.; Frigeri, L.; Ordovás, C.; Frigeri, M.; Bertuol, I.; Guimarães, C.V.A. & Mendonça, C.M.F. Epidemiologia dos tumores do sistema nervoso central. **Revista Científica AMECS**, 10: 24-32. 2001.
- Toledo, F. & Wahl, G.M. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39: 1476-1482. 2007.
- Tomukaru, Y.; Yamashita, K.; Osada, M.; Nomoto, S.; Sun, D.I.; Xiao, Y.; Hoque, M.O.; Westra, W.H.; Califano, J.A. & Sidransky D. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing, **Cancer Research**, 64: 5982-5987. 2004.
- TP53. The TP53 Web Site. 2009. Disponível em: <http://p53.free.fr/> Acesso em: 20 out 2009.
- UCSC Genome Bioinformatics. 2009. Disponível em <http://genome.ucsc.edu/> Acesso em: 20 de out 2009.
- Uhlmann, K.; Brinckmann, A.; Toliat, M.R.; Ritler, H. & Nurnberg, P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. **Electrophoresis**, 23: 4072-4079. .2002.

- University of Maryland, Baltimore. 2009. Disponível em: [www.umaryland.edu](http://www.umaryland.edu) Acesso em: 20 jun 2009.
- Vousden, K.H. p53: death star. **Cell**, **103**(5): 691-694. 2000.
- World Health Organization. USA. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 13 abr 2009.
- Yang, A.S.; Estécio, M.R.H.; Doshi, K.; Kondo, Y.; Tajara, E.H. & Issa J.P.J. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements, **Nucleic Acids Research**, **32**(3): 38-43. 2004.
- Zheng, T.; Cantor, K.F.; Zhang, Y.; Keim, S. & Lynch C.F. Occupational risk factors for brain câncer: a population-based case-control study in Iowa. **Journal of Occupational and Environment Medicine**, **43**: 317-324. 2001.
- Zilfou, J.T. & Lowe, S. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, **1**: 1-11. 2009.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UFPA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Ofir Loyola, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam o desenvolvimento de tumores do sistema nervoso, através da identificação das alterações genéticas associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido neoplásico removido por cirurgia e trará novas informações sobre aspectos genéticos relacionados a este quadro clínico.

Você está sendo admitido (a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de algum tumor de sistema nervoso e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à esta enfermidade. Parte do material retirado será encaminhada para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido tumoral para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com o **Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo** ou com o **Prof. Dr. Edivaldo H.C. de Oliveira**, através do telefone 3201-1585.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.

Belém, ..... de ..... de .....

-----  
**Assinatura do Paciente ou Responsável**

Nome: .....

RG: .....