

HENRIQUE FONSECA SOUSA DO NASCIMENTO

ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO E EPIGENÉTICO DO GENE *CDH1* EM
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO

BELÉM

2009

HENRIQUE FONSECA SOUSA DO NASCIMENTO

ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO E EPIGENÉTICO DO GENE *CDH1* EM
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO

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

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

BELÉM

2009

HENRIQUE FONSECA SOUSA DO NASCIMENTO

ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO E EPIGENÉTICO DO GENE *CDH1* EM
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO

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

Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo

Avaliadora: Prof. Dr. Maria Lúcia Harada

Avaliadora: Mestra Barbara Nascimento

Borges

BELÉM

2009

*"Nada pode ser obtido sem uma espécie de sacrifício.
É necessário dar algo de valor equivalente.
Lei da Troca Equivalente."
(Edward Elric)*

A todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente

Durante todos esses anos de universidade

obrigado

AGRADECIMENTOS

A minha amiga Laine (chefe) por ter me ensinado todas as técnicas e por ter me treinado com muita paciência, e que isto seja frisado (Tá certo chefe? Como é mesmo?). Obrigado chefe por tudo.

Universidade Federal do Pará - UFPa pela estrutura logística e pedagógica ao longo desses quatros anos de graduação Biomedicina;

A meu orientador Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo, pela orientação e desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular – LABIOMOL, professores e estagiários. Principalmente ao Carlos que muito me ajudou durante o desenvolvimento deste trabalho e a Rafaela (Rafinha) pela amizade.

Agradeço a meus pais pela educação que me deram e na sua dedicação desejando sempre o melhor para mim.

À minha irmã que mesmo após muitas brigas ainda consegue me aturar, e a recíproca é verdadeira.

A minha turma de graduação em Biomedicina (2006) que apesar das intrigas ainda mantinham a amizade.

Aos amigos da Biologia pelo companheirismo e por aceitarem um biomédico no grupo.

Aos meus amigos do colégio Teorema que mesmo depois da separação após o vestibular mantivemos o contato e a amizade.

A meus amigos do Curso de inglês pelas brincadeiras até mesmo durante as aulas. (What?Why?How?).

As amizades feitas no Espaço Cultural Marcelo Thigana por sempre me ajudarem onde estava com dificuldade e pelas saídas nas festas.

A minha amiga Jacqueline Cunha por ter se mostrado uma pessoa de extrema confiança e companheirismo. Valeu Jack.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer do Sistema Nervoso.....	02
1.2 Epidemiologia do Câncer do SNH	04
1.3 Processo Epigenético.....	05
1.4 Ilhas CpG.....	08
1.5 E-Caderina.....	08
 2. JUSTIFICATIVA.....	 10
 3. OBJETIVOS	 12
3.1 Geral	12
3.2 Específicos.....	12
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 13
4.1 Amostras	13
4.2 Extração	17
4.3 Modificação por Bissulfito	17
4.4 Amplificação	18
4.5 Sequenciamento.....	19
4.6 Análise Estatística.....	19
 5. RESULTADOS.....	 21
 6. DISCUSSÃO	 25
 7. CONCLUSÃO	 28
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 29
 9. ANEXO I.....	 35
 10. ANEXO II.....	 36

RESUMO

O gene *CDH1* codifica a glicoproteína E-Caderina responsável pela interação célula-célula nos tecidos epiteliais possuindo um papel fundamental na manutenção e formação da polaridade celular nesses tecidos. A sobreposição de ilhas CpGs, a metilação aberrante do gene *CDH1*, perda de fatores de ligação e/ou reorganização da cromatina são causas perda/diminuição da expressão *CDH1*. Além das alterações epigenéticas, alguns polimorfismos relatados no gene *CDH1*, como o polimorfismo C:A no sítio -160, localizado junto ao sítio de início de transcrição do *CDH*, tem relação com as diferenças na expressão deste gene. Em Tumores do Sistema Nervoso poucos são os estudos relacionando a metilação deste gene com a incidência dos mesmos. Neste trabalho realizou-se teste moleculares com a intenção de avaliar o perfil de metilação da região promotora deste gene nas neoplasias do SN. Realizou-se a análise de 45 amostras de tumores do SNH em pacientes da população paraense que passaram por procedimento cirúrgico no Hospital Ofir Loyola (Belém-PA). O DNA foi extraído e modificado por bissulfito de sódio e em seguida amplificado através da técnica da PCR. As amostras foram seqüenciadas, alinhadas pelo programa BioEdit e analisados com o auxílio do BIQ Analyser. A análise das amostras revelou um valor global de metilação de 6,9% considerando cada sítio metilado, e dentre as amostras apenas 2,2% se encontravam hipermetiladas. Detectou-se que os tumores astrocísticos apresentaram o maior valor de metilação (13,15%), seguido dos Schwannomas que apresentaram 5,29% e meningiomas (4,9%). As amostras de tumores metastáticos indicaram o menor valor de metilação (3,65%). Dos sítios analisados os sítios CpG 7 e 17 apresentaram um nível de metilação mais significativo, sendo que o sítio CpG 7 apresentou o maior valor de metilação entre os tumores metastáticos (37,5%) dos casos que encontravam-se metilados neste sítio. O sítio CpG 17 revelou maior valor de metilação (45,4%) em astrocitomas e em (28%) dos casos de Schwannoma o que não foi observado nos demais tipos tumorais analisados. Encontrou-se uma variação no grau de metilação entre as amostras porém se verificou que não existe uma associação entre a presença do polimorfismo -160 com o padrão de metilação do *CDH1* observado em nas amostras, contrastando com os achados da literatura. As amostras utilizadas apresentam uma heterogeneidade, com relação ao tipo histológico, deixando reduzido o número de exemplares de cada tipo tumoral. Faz-se necessário aumentar o número amostral para que se possa ter uma conclusão a cerca do papel (correlação) do polimorfismo, da metilação nos sítios CpG e o risco de câncer no SNH.

Palavras-Chave: Metilação, CDH1, Nervoso, Paraense

INTRODUÇÃO

Conceitua-se câncer como uma patologia que engloba uma série de doenças que apresentam como características uma proliferação contínua de células com poder invasivo de órgãos e tecidos, tendo a possibilidade de expandir-se para outras regiões do organismo. Proliferando-se com grande rapidez, estas células podem ser agressivas e incontroláveis, formando tumores ou neoplasias malignas. Contudo, pode gerar uma massa de células localizadas com multiplicação vagarosa que se assemelha ao seu tecido de origem, geralmente não constituindo-se em risco de vida para quem o possui. Os vários tipos de neoplasias existentes diferem entre si devido aos diferentes tipos celulares envolvidos, rapidez com que se multiplicam e seu poder invasivo (metástase) (INCA, 2009).

Segundo o INCA, no ano de 2005, ocorreram 58 milhões de mortes em todo o mundo sendo que dessas o câncer foi responsável por 7,6 milhões de óbitos, o que representa um percentual de 13%. As neoplasias com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). De todos os óbitos ocorridos por câncer em 2005, mais de 70% aconteceram em países de média e baixa renda (INCA, 2009).

Durante a gênese tumoral ocorre a inativação de genes com a função de manter a integridade do genoma e de supressores de tumor, devido a essas alterações, direta ou indiretamente a função original desses genes é suprimida resultando em alterações no controle do ciclo celular, fazendo com que a harmonia do mesmo seja deslocada para a proliferação da célula. Dos genes supressores de tumor, o mais frequentemente alterado é o *TP53*, localizado no cromossoma 17p13. Sua inativação é o início da patogênese de diversos tumores como sarcomas, tumores cerebrais e câncer de mama (SADIKOVIC *et al.*, 2008).

A taxa de mutação normal do DNA é amplamente citada como 10^{-7} a 10^{-8} por nucleotídeo por divisão celular. Esta estimativa é aplicável, em pequenas alterações que produzem mutações do tipo *missense* (sentido trocado), *frameshift* (mudança de matriz) e *nonsense* (sem sentido). Alguns desses processos, comumente silenciosos em células normais, mas podem ser de importância relativa para o processo cancerígeno (SIEBER *et al.*, 2005).

1.1 Câncer do Sistema Nervoso

As neoplasias do Sistema Nervoso Humano (SNH) possuem sua classificação baseada no fato de que cada tipo celular origina um tumor específico. Assim como suas implicações terapêuticas, prognósticas e em seu grau de malignidade. Com a utilização de técnicas de biologia molecular cientistas e patologistas têm conseguido novos conhecimentos a respeito desses tumores do SNH. Semelhante a outros tumores também se evidencia mutações em genes supressores de tumor, deleções de segmentos cromossômicos, amplificação e ativação de oncogenes (LOURO *et al.*, 2002).

Os gliomas surgem de células gliais e representam 40 a 60% dos tumores primários do cérebro, sendo predominantemente malignos e mais frequentes em homens. (BOYLE & LEVIN, 2008).

Dentre os tumores do SNC existem os astrocitomas, cujas células possuem semelhança com astrócitos, células da neuroglia, constituindo aproximadamente 75% dos casos de gliomas, aumentando nos hemisférios cerebrais de adultos na faixa etária de 25 a 45 anos (SANTOS *et al.* 2001). Em ambos os sexos sua distribuição é igual, o local onde incidem são os lobos frontal, temporal ou parietal, sendo sua aparição em outras áreas considerada rara. Segundo BOYLE & LEVIN (2008) os astrocitomas são divididos em quatro graus: Grau I (Astrocitoma Pilocítico), Grau II (Astrocitoma Difuso de Baixo Grau), Grau III (Astrocitoma Anaplásico) e Grau IV (Glioblastoma Multiforme). Os astrocitomas anaplásicos são os mais invasivos sendo mais prevalente em crianças, contudo o glioblastoma multiforme é o que apresenta maior malignidade (SANTOS *et al.*, 2001). Na **Figura 1** podemos ver as vias que levam ao desenvolvimento do glioblastoma.

Dentre as mutações que causam o câncer, as que induzem a inativação do *TP53* são as alterações genéticas mais comumente detectáveis durante a progressão do glioblastoma. A mutação neste gene é caracterizada por transições G:C para A:T nos sítios CpG, encontrada em 60% dos precursores dos astrocitomas de baixo grau. (SADIKOVIC *et al.*, 2008).

Outro tipo tumoral do SNH é o meningioma, uma neoplasia benigna e de crescimento lento que acomete a camada de células aracnóides das meninges. Costuma ter uma prevalência de 13-26% das neoplasias intracranianas e 25% das intravertebrais, com incidência anual de aproximadamente 6 por 100.000 indivíduos

(LOUIS *et al.*, 2000). Acomete mais frequentemente pacientes do sexo feminino a partir da quinta década de suas vidas com pouca prevalência em idade inferior a 21 anos (HANEL *et al.*, 2001). Além desses, existe o schwannoma, uma neoplasia que surge a partir das células de Schwan que envolvem os nervos e representam cerca de 5 a 10% dos neoplasmas cerebrais (BOYLE & LEVIN, 2008).

Mesmo não sejam muito frequentes, os tumores do sistema nervoso contribuem consideravelmente para a morbidade, muitas vezes afetando crianças. Devido à sua acentuada resistência à radiação e à quimioterapia, o prognóstico para pacientes com glioblastoma é muito desfavorável. A maioria dos pacientes morrem dentro de um período de 9 a 12 meses, e pouco menos que 3% sobrevivem por 3 anos (BOYLE & LEVIN, 2008).

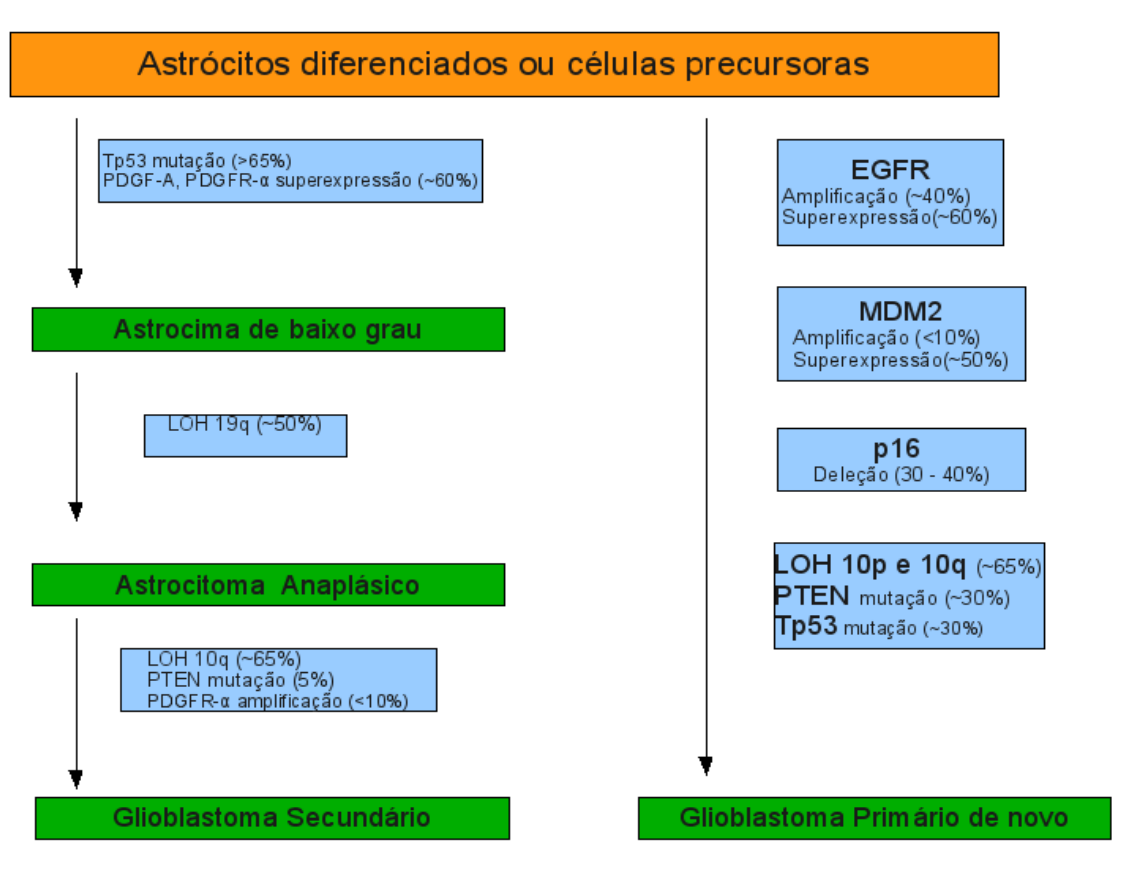


Figura 1: Vias genéticas na evolução do glioblastoma primário e secundário. Fonte: BOYLE & LEVIN, 2008.

1.2 Epidemiologia do Câncer do SNH

As neoplasias do SNC constituem aproximadamente 2% de todos os tipos tumorais, se acredita que a incidência de tumores primários do SNC em homens é 4,2 a 5,4 por 100.000 indivíduos (Ministério da Saúde, 2008). A taxa de mortalidade por câncer no encéfalo na população mundial oscila, para os homens, entre 0,45 e 4,72 e de 0,50 a 3,32 em mulheres; no Brasil esse valor oscila entre 0,40 e 3,89 nos homens e entre 0,47 e 2,78 nas mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A distribuição etária dos tumores cerebrais é bimodal, com um pico de incidência em crianças e um segundo pico em adultos entre 45 a 70 anos. Nos países mais desenvolvidos os tumores do sistema nervoso são a 12ª mais frequente causa de mortalidade de câncer em homens (BOYLE & LEVIN, 2008). A incidência de tumores cerebrais é ligeiramente superior nos homens do que nas mulheres, a razão homem: mulher é de aproximadamente 1,3 para gliomas e 0,6 para meningiomas (BOYLE & LEVIN 2008).

A incidência de neoplasias do SNH em cidades com um nível significativo de desenvolvimento é considerável (OGHAKI, 2009; BOYLE & LEVIN, 2008). Entretanto este aumento pode ser devido a uma melhora significativa melhora das técnicas de neuroimagem em alta resolução, também foi verificado o aumento no período de maior utilização de aparelho celulares (BOYLE & LEVIN, 2008).

Os gliomas são os responsáveis por 70% de todos os casos de tumores cerebrais e desses o glioblastoma é o mais frequente e o mais maligno (OHGAKI, 2009). Ainda segundo Ohgaki (2009), indivíduos caucasianos são mais atingidos por esta neoplasia do que os que possuem descendência africana ou asiática. Na América do Norte, na Europa Ocidental e na Austrália as taxas de mortalidade por câncer do SN, todos os tipos histológicos incluindo meningiomas, são de 4 a 7 por 100.000 pessoas por ano para os homens e 3 a 5 por 100.000 em mulheres. As neoplasias do SNC correspondem de 8% a 15% das neoplasias pediátricas, constituindo o grupo de tumores sólidos mais frequentes na faixa pediátrica.

De acordo com o INCA (2006) nos países desenvolvidos, os gliomas representam o segundo grupo de diagnóstico mais prevalente; nos países em desenvolvimento, é o terceiro tipo de câncer mais incidente. Nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) brasileiros o percentual desta neoplasia variou de 18% (Goiânia 1996 – 2000) a 2% (João Pessoa, 1999 – 2001). As taxas de

incidência variam de 5,5 por 100 mil em Belo Horizonte (2000) a 0,4 por 100 mil em Natal (1998 – 2000) no sexo masculino. Para o sexo feminino, notou-se a taxa mais elevada no Distrito Federal (1999 – 2001), de 3,8 por 100 mil, e a menor em Vitória (1997), de 0,5 por 100 mil (INCA, 2006).

Nas últimas décadas a incidência e mortalidade por câncer do sistema nervoso tem aumentado na maioria dos países desenvolvidos, principalmente em idosos (BOYLE & LEVIN, 2008).

1.3 Processo Epigenético

A epigenética caracteriza-se como uma alteração na expressão do material genético, especialmente nas histonas e no DNA, que modifica a regulação da expressão gênica, todavia não é caracterizada como mutação, já que não envolve a mudança na sequência de DNA. Possui como principais mecanismos de repressão transcricional a acetilação e metilação de histonas e a metilação do DNA. A alteração no padrão de metilação do DNA é a modificação epigenômica mais bem estudada atualmente (FMRP-USP, 2009).

A conversão da citosina em 5-metilcitosina é uma importante alteração epigenética no genoma de vertebrados (BIRD, 1992). A enzima DNA-metiltransferase (DNMT) pode deslocar um grupo metil da S-adenosil-metionina (SAM) para a citosina presente nos sítios CpG como se observa na **Figura 2**. A metilação que ocorrendo em várias citosinas está geralmente associada ao silenciamento gênico, sendo que os genes com abundância de 5-metilcitosina em sua região promotora geralmente encontram-se silenciados (JONES & TAKAI, 2001).

O fenômeno da metilação do DNA é de vital importância durante o desenvolvimento e quando acontece de maneira errônea (hipermetilação ou hipometilação) pode estar associado ao envelhecimento, neoplasias e outras patologias (JONES & BAYLIN, 2002).

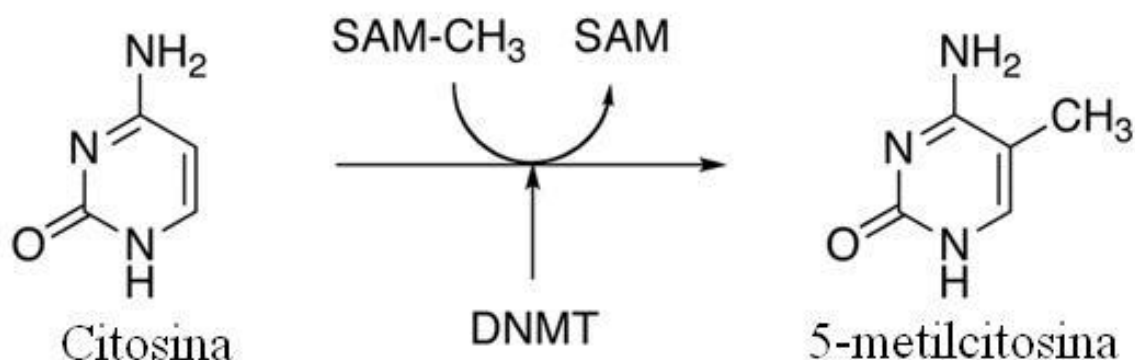


Figura 2: Processo orgânico de metilação do DNA genômico (MEDCHEM, 2009). SAM :S-Adenosil-Metionina

Muitos são os métodos de estudo da metilação do DNA, contudo geralmente utiliza-se a reação do bissulfito de sódio para o mesmo, a qual desamina seletivamente as citosinas e não as 5-metilcitosinas até a forma de uracila (CLARK *et al.*, 1994). Isto inicia uma alteração primária na sequência de DNA que permite distinguir a 5-metilcitosina da citosina se o grupamento metil. Ocorrida essa conversão, as diferenças entre as sequências metiladas e não-metiladas podem ser analisadas por sequenciamento direto, enzimas de restrição, *Methylation Specific PCR* (MSP) ou pirosequenciamento (UHLMANN *et al.*, 2003).

A metilação anormal do DNA inibe genes que geralmente impediriam divisões celulares anormais, ou seja, eliminando um mecanismo que previne o dano celular evitando que a mesma se torne tumoral (FMRP-USP, 2009).

Mais de 10% dos genes em certos tipos de tumor são inativados devido à metilação. Na maioria dos casos, a resistência à quimioterápicos encontra-se ligada ao grau de metilações anormais em alguns tumores. As alterações de metilação do DNA em células tumorais (**Figura 3**) incluem a perda da metilação em sequências normalmente metiladas (hipometilação) e o ganho de sequências metiladas em regiões que não se apresentam metiladas (hipermetilação) (FMRP-USP, 2009).

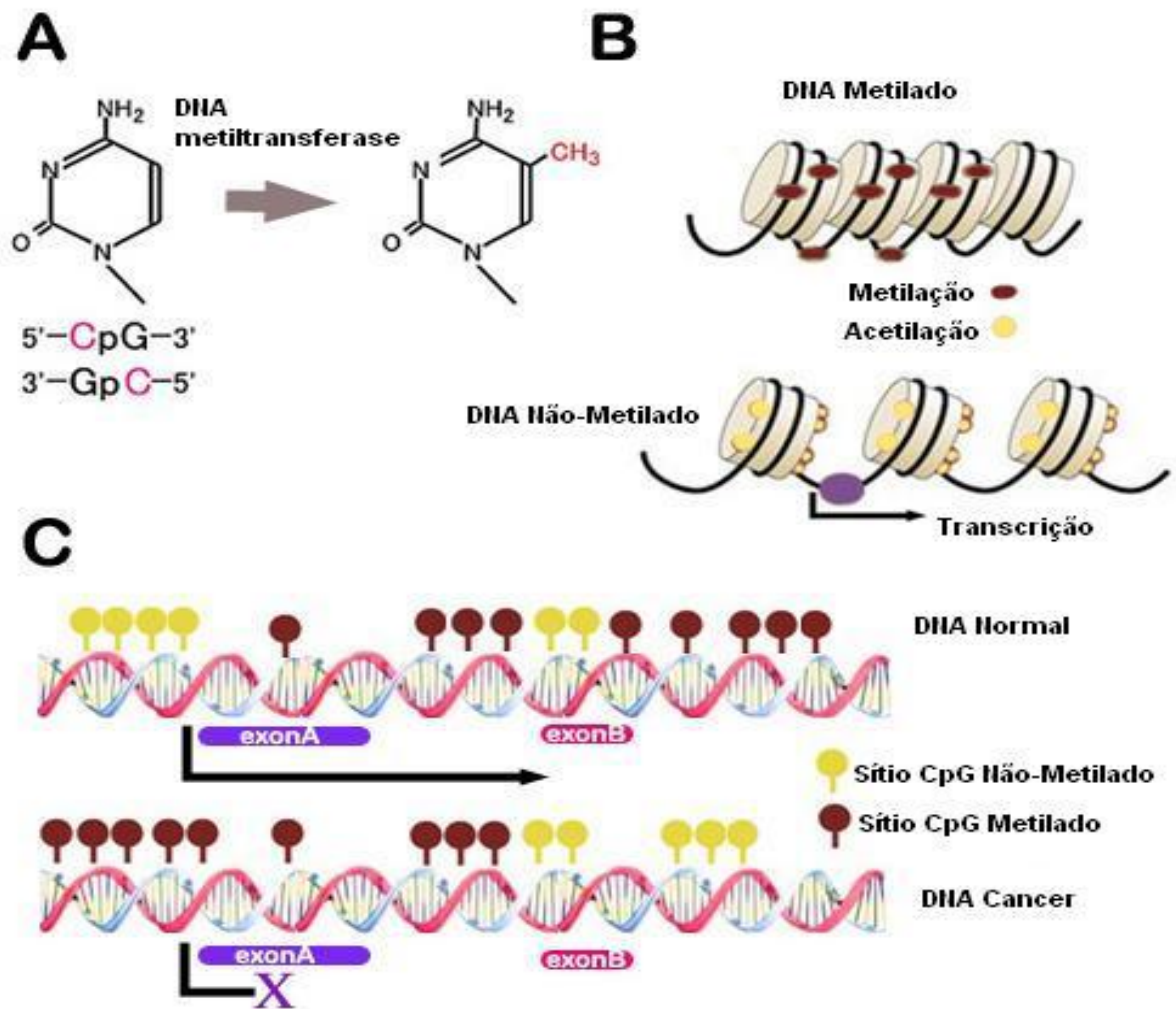


Figura 3: Processo anormal de metilação do DNA genômico (Cellscience, 2009)

1.4. Ilhas CpG

Normalmente a maior parte das citosinas dos dinucleotídeos CpG do genoma humano encontram-se metiladas. Fisiologicamente a metilcitosina tende a mudar para timina, dessa forma os dinucleotídeos CpG tendem a desaparecer convertendo-se em TpG. Este processo é de fundamental importância para explicar o fato de, na maioria do DNA humano, os dinucleotídeos CpG serem cerca de cinco vezes menos freqüentes do que o esperado (SANGER INSTITUTE, 2009). As ilhas CpG são regiões do genoma que não apresentam metilação e que estão associadas às extremidades 5' da maior parte dos genes que mantêm o ciclo celular e de outros genes regulados (BIRD, 1992). A metilação que ocorre nos dinucleotídeos CpG pode ser decomposta e dessa maneira detectadas na sequência de DNA das ilhas CpG. O fato das ilhas CpG poderem ser detectadas revela que o DNA genômico correspondente tenha sido substancialmente hipometilado por um período prolongado de tempo (SANGER INSTITUTE, 2009).

Aproximadamente 56% dos genes do genoma humano e 47% dos de camundongo estão associados às ilhas CpG (ANTEQUERA & BIRD, 1993). Geralmente as ilhas CpG sobrepõem-se nas regiões promotoras de genes e chegam a prolongar-se por cerca de 1000 pares de base até a unidade de transcrição. A identificação de possíveis ilhas CpG durante a análise ajuda a definir a extremidade 5' dos genes, algo notoriamente difícil de abordar utilizando cDNA. Por estarem associados aos genes, provavelmente, as ilhas CpG tendem a ser as sequências únicas, portanto, sendo muito úteis em projetos de mapeamento do genoma (SANGER INSTITUTE, 2009).

1.5. E-Caderina

Moléculas de adesão celular (MACs) são proteínas que possuem uma importante função na interação célula-célula e entre a matriz extracelular. As principais classes são a classe das caderinas, das selectinas, da superfamília das imunoglobulinas e das integrinas (ASANO *et al.*, 2000). As caderinas são proteínas transmembranas que exercem suas funções, principalmente, através de interações homofílicas dependentes de cálcio, caracterizadas por apresentarem um resíduo de

aproximadamente 110 aminoácidos em sua porção extracelular, que desempenham um papel fundamental nos processos de histogênese, morfogênese e manutenção de tecidos sólidos (TAKEICHI, 1991; POKUTTA & WEISS, 2007).

A glicoproteína E-caderina é codificada pelo gene *CDH1*, localizado na porção 16q22.1. Essa proteína pertence à superfamília das caderinas dependentes de cálcio, sendo um dos principais membros, e responsável pelas interações célula-célula nos tecidos epiteliais e apresenta um papel fundamental na manutenção e formação da polaridade celular nesses tecidos. A E-caderina forma complexos com as cateninas citoplasmáticas ligando-se ao seu domínio carboxi-terminal que permite que se liguem a actina do citoesqueleto, e essa interação é necessária para a função das células epiteliais e integridade tecidual (NOLLET *et al.*, 1999; YAGI & TAKEICHI, 2000).

A metilação aberrante do gene *CDH1*, a perda de fatores de ligação e/ou reorganização da cromatina são causas da perda/diminuição da expressão de *CDH1*. Os elementos regulatórios *upstream* do gene *CDH1* de camundongos e humanos foram caracterizados, ambos apresentam em seus promotores dois E-boxes conservados, fundamentais para a especificidade da expressão de E-caderina nos tecidos epiteliais (GIROLDI *et al.*, 1997; UHLMANN *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2004).

Além das alterações epigenéticas, alguns polimorfismos são relatados no gene *CDH1*, como o polimorfismo C:A no sítio -160, localizado junto ao sítio de início de transcrição do *CDH1*, tendo relação com a expressão deste gene, sendo que o alelo A demonstrou um declínio na eficiência transcricional de 68% quando comparado com o C. Desse modo, este polimorfismo é considerado um possível marcador genético de suscetibilidade ao câncer (Li *et al.*; 2000).

A diminuição da expressão de E-caderina foi relatada em algumas metástases de neoplasias cerebrais, demonstrando que esta proteína pode atuar como supressor tumoral (ARNOLD *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

Ainda são poucas as informações, inclusive epidemiológicas, a respeito dos tumores do sistema nervoso na população paraense e o estudo epidemiológico desses tipos tumorais, necessitando que mais estimativas sejam realizadas e atualizadas com frequência pois com a disponibilização de dados de novos casos incidentes de câncer são oferecidas informações epidemiológicas fundamentais para o planejamento de ações de promoção à saúde, detecção precoce e de atenção oncológica em todos os níveis (INCA, 2008).

A incidência deste tipo tumoral vêm aumentando ao longo dos anos em vários países. Na população paraense de acordo com Serrão e Brito (comunicação pessoal) não é diferente, pois a incidência de tumores no SN é alta, porém ainda não foi realizado um estudo epidemiológico nem estudos genéticos dessas neoplasias no estado do Pará. Desta maneira, trabalhos de genética molecular em cânceres de SN são de suma importância para um melhor entendimento da gênese e progressão tumoral, uma vez que a associação de resultados conseguidos através da utilização de diferentes metodologias poderão nos levar a uma melhor compreensão sobre os mecanismos que atuam na formação dos tumores do SNH.

Tais estudos podem auxiliar no diagnóstico de tumores do SN, cuja classificação histopatológica é complexa e determinar vias epigenéticas que apontem para uma melhor estratégia terapêutica, pois em contraste com as alterações genéticas que são quase impossíveis de serem revertidas, mudanças epigenéticas em tumores são potencialmente reversíveis. Isto resulta no desenvolvimento de inibidores farmacológicos de metilação do DNA e desacetilação das histonas (HELLEBREKERS *et al.*, 2007), melhorando assim, o prognóstico dos pacientes acometidos por essas neoplasias, bem como aumentando suas chances de cura.

As dificuldades existentes no combate da capacidade invasiva são os maiores problemas enfrentados no tratamento de tumores do SNH. Há uma grande complexidade de cariótipos e alterações moleculares distintas dificultando a sua análise, principalmente em termos de diagnóstico. Nesse caso os estudos moleculares são importantes já que são capazes de detectar alterações específicas para cada tipo tumoral, ajudando a identificar os passos que ocorrem para o

estabelecimento e progressão do tumor. As alterações moleculares específicas poderão ser identificadas e relacionadas com o tipo de tumor e o seu grau de progressão, fornecendo dados muito mais consistentes sobre o perfil da população paraense, além de contribuir para outros estudos nessa linha de pesquisa.

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Contribuir para esclarecimento das interações genéticas e epigenéticas no processo de desenvolvimento e evolução de neoplasias do sistema nervoso humano.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar o perfil de metilação da região promotora do gene *CDH1* nas amostras de tumores de SNH coletadas no hospital Ofir Loyola (Belém-PA).
- Avaliar a existência de associação do padrão de metilação, com o tipo tumoral, com o grau de estadiamento tumoral, com a idade dos pacientes analisados e com a presença do polimorfismo no sitio -160 da região promotora do *CDH1*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho são heterogêneas (tabela 1) provenientes de pacientes atendidos no Hospital Ofir Loyola (Belém-PA).

Foram coletadas 45 amostras de tecido nervoso afetado pela neoplasia, por procedimento cirúrgico. Após a coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular, “Francisco Mauro Salzano” (LABIOMOL) e armazenados em nitrogênio líquido para posterior utilização. O diagnóstico histopatológico foi realizado pela equipe médica do referido hospital como processo normal de análise de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (KLEIHUES & CAVENNE, 2002). Os pacientes não foram submetidos previamente a tratamentos quimio e/ou radioterápicos. Eles ou seus responsáveis foram informados sobre a proposta desta pesquisa, e caso aceitassem participar deste trabalho, assinavam um termo de consentimento livre e esclarecido de doação de material biológico (Anexo 1), conforme rege a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos. Sendo que este trabalho está inserido em um projeto já aprovado em 2006 pela Câmara de Pesquisa do Hospital Ofir Loyola e pelo Comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Anexo 2).

As amostras obtidas são de ampla variedade histológica, de gênero e idade e correspondem a diferentes tipos de tumores do Sistema Nervoso, como podemos observar na **Tabela 1 e Tabela 2**.

Tabela 1: Amostras de lesões no tecido Nervoso Humano, obtidas por procedimento cirúrgico no Hospital Ofir Loyola (Belém-PA). A classificação histopatológica dos tumores seguiu as normas da Organização Mundial de Saúde (KLEIHUES & CAVENNE, 2002).

HISTOPATOLÓGICO DE AMOSTRAS	
TUMORES DE TECIDO NEUROEPITELIAL	
ASTROCITOMAS	12
NEUROCITOMA CENTRAL	1
TUMORES DOS NERVO PERIFÉRICO	
SCHWANNOMAS	10
TUMORES DAS MENINGES	
MENINGIOMAS	12
DIVERSOS	
METÁSTASES	10
TOTAL	45

AMOSTRAS	HISTOPATOLÓGICO	IDADE	SEXO
CSN 01	Astrocitoma Subependimário de células gigantes	23	M
CSN 10	Astrocitoma Fibrilar	10	F
CSN 20	Astrocitoma Pilomixóide	3	M
CSN 31	Astrocitoma grau III	55	F
CSN 58	Astrocitoma difuso grau II	37	M
CSN 116	Astrocitoma pilocítico (grau I)	3	F
CSN 122	Astrocitoma grau IV	71	F
CSN 126	Astrocitoma grau II	34	F
CSN 130	Astrocitoma grau IV	51	F
CSN 136	Astrocitoma difuso grau II	64	M
CSN 145	Astrocitoma pilocítico anaplásico (grau III)	27	F
CSN 146	Astrocitoma anaplásico (grau III)	31	F
CSN 5	Meningioma Secretório	67	F
CSN 25	Meningioma Psamomatoso	67	F
CSN 29	Meningioma Transicional	61	F
CSN 33	Meningioma Hemangioblástico	40	F
CSN 45	Meningioma Meningoteliomatoso	40	M
CSN 46	Meningioma Meningoteliomatoso	17	F
CSN 66	Meningioma Meningoteliomatoso	46	F
CSN 68	Meningioma occipital	54	F
CSN 76	Meningioma meningotelial	49	F
CSN 81	Meningioma Cordóide	36	F
CSN 84	Meningioma Meningotelial	47	F
CSN 144	Meningioma Rabdóide	55	M
CSN 27	Metástase (Compatível com Adenoma Hipofisário)	24	F

CSN 53	Metástase (Adenoma Hipofisário)	9	F
CSN 07	Metástase (Mama)	47	F
CSN 08	Metástase (colo uterino)	39	F
CSN 13	Metástase (Adenocarcinoma)	64	M
CSN 19	Metástase (colo uterino)	30	F
CSN 30	Metástase (Adenocarcinoma)	62	M
CSN 62	Metástase (Adenoma)	28	M
CSN 63	Metástase (Adenocarcinoma)	41	M
CSN 70	Metástase (Adenocarcinoma)	84	M
CSN 87	Neurocitoma Central	31	F
CSN 02	Schwanoma	50	M
CSN 28	Schwanoma	39	F
CSN 51	Schwanoma maligno grau I	69	F
CSN 64	Schwanoma	35	M
CSN 67	Schwanoma	56	M
CSN 71	Schwanoma	27	M
CSN 89	Schwanoma com bizarismo celular	61	M
CSN 94	Schwanoma	52	M
CSN 131	Schwanoma	30	M
CSN 143	Schwanoma	24	M

Tabela 2. Amostras de tumores do SNC da população paraense distribuídas por gênero, idade e tipo tumoral. O grau de estadiamento tumoral foi dado de acordo com as especificações da OMS.

4.2. EXTRAÇÃO

Para a extração de DNA as amostras de tecidos neoplásicos foram trituradas em Placa de Petri; logo depois transferidas a um microtubo, do tipo *eppendorf*, homogeneizadas com tampão de extração e digeridos com proteinase K; posteriormente foram deixados em banho-maria a 37°C (*overnight*). Decorrido o tempo de digestão, o DNA foi extraído com lavagens de fenol/clorofórmio e precipitado com etanol absoluto, conforme descrito por SAMBROOK, *et al.* (1989). O DNA foi dissolvido com Tampão TE e conservado em freezer (-20°) até sua utilização.

4.3. MODIFICAÇÃO POR BISSULFITO DE SÓDIO

Após a extração o material foi submetido ao processo de metilação por modificação com bissulfito de acordo com a técnica descrita por ISSA *et al.* (2004). O tratamento com bissulfito converte todas as citosinas não metiladas do DNA em uracila deixando a citosina metilada intacta, dessa maneira alelos metilados e não metilados podem ser diferencialmente amplificados com iniciadores específicos em reação de cadeia de polimerase (PCR). Inicialmente as citosinas são sulfonadas e desaminadas convertendo-se em uracilas sulfonadas. A C5-metilcitosina não sofre modificação sob essas condições, uma dessulfonação subsequente em pH básico completa a conversão de citosinas em uracilas.

Inicialmente adicionou-se 300µL de óleo vegetal em um microtubo de 2mL incubou-se o mesmo em gelo por 30 minutos. Em seguida preparou-se 1µL de DNA (de boa qualidade) em um volume de 21µL de TE. Em seguida adicionou-se 4µL de NaOH 3M, recém preparado, e realizou-se a incubação por 15 minutos em banho-maria a 50°C. Realizou-se o preparo de uma solução de agarose LMP a 1,6% (0,8 de agarose LMP em 5mL de água estéril). Após essas etapas acrescentou-se 50µL desta solução aos 25µL da solução de DNA e NaOH. Antes de esfriar a solução calmamente pipetou-se 15µL da solução de DNA e agarose no microtubo contendo óleo mineral, para que as *beads* fossem formadas. Uma *bead* por tubo, 5 tubos por amostra. Logo depois realizou-se a incubação por pelo menos 30 minutos em gelo. Preparou-se a solução de bissulfito utilizando 12g de bissulfito de sódio em 18mL de

água estéril. Realizou-se o preparo de 0,11g de hidroquinona em 1mL de água estéril. Misturou-se as duas soluções e ajustou-se o pH para 5, com de NaOH 2M.

Adicionou-se 500µL desta solução no microtubo contendo as *beads* e o óleo. As *beads* foram mantidas sempre na parte aquosa da solução. Os microtubos foram incubados no escuro por 16h a 55° (SVOBODA *et al*; 2004 com modificações). Logo depois removeu-se as camadas de óleo e solução, com cuidado para que as *beads* não se quebrassem. Em seguida as *beads* foram lavadas 4 vezes com TE por 10 minutos em cada lavagem.

Em seguida foi realizada a dessulfonação com duas lavagens de 15 minutos cada, com 500µL de NaOH 0,2M sendo que a última foi feita em banho-maria a 37°C. O tratamento de lavagens de 10 minutos eram paradas com 1mL de TE. As *beads* eram então derretidas em 100µL de água estéril e 10µL foram utilizados como molde para a reação da PCR.

Depois do tratamento com bissulfito a região cromossômica de interesse foi amplificada por PCR e seus produtos seqüenciados. Somente metilcitosinas são detectadas como citosinas nas reações de seqüência, enquanto que todas as citosinas não metiladas aparecem como timinas (OLEK, *et al*. 1996).

4.4. AMPLIFICAÇÃO

Ao término da reação o DNA, modificado por bissulfito, foi submetido à técnica da PCR (MULLIS, 1985) para amplificação da região de interesse. O procedimento utilizado para tal técnica consistiu em uma mistura de DNA genômico, iniciadores, tampão da Taq polimerase, desoxinucleotídeos trifosfatados e Taq polimerase. Os iniciadores utilizados foram específicos para o referente gene, como segue na **tabela 3**.

As condições dos ciclos foram acertadas de acordo com a seqüência do iniciador desenhado. As etapas de desnaturação, alinhamento e extensão foram repetidas por 40 vezes para primeira e para segunda (*nested*) reação. O fragmento de 22 sítios CpG da região promotora do *CDH1* foi amplificado usando a estratégia de *nested* PCR (Nojima *et al*; 2001).

No final da reação, os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% para avaliar a amplificação.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na análise do padrão de metilação deste estudo e condições da PCR.

Iniciador	Sequência	Início	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Finalização
CDH1 (F)	TTTTGATTTT AGGTTTTAG TGAGTTAT	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C
CDH1 (R)	AATACCTAC AACAACAAC AACAA	4min	20seg	20seg	30seg	5min
CDH1 (NF)	TGTAGGTTTT ATAATTTATT TAGATTT	95°C	94°C	54°C	72°C	72°C
CDH1 (NR)	ACTCCAAAA ACCCATAAC TAAC	2min	30seg	30seg	45seg	5 min

4.5. SEQUENCIAMENTO

Foi realizado o sequenciamento direto sem purificação das amostras pelo kit *Dye Terminator Cycle Sequencing Standar (Applied Byosistems)* para uma análise mais precisa dos polimorfismos, que utilizaram como enzima a *AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Byosistems)*, também foi utilizado o protocolo do kit com algumas modificações para a obtenção de melhores resultados. Então as reações foram submetidas à eletroforese em capilar utilizando o analisador automático de sequência *ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)*.

As seqüências foram alinhadas pelo programa *BioEdit* e analisados com o auxílio do *BIQ Analyser*, o programa que gera diagramas que permitem a visualização dos sítios metilados e não metilados de cada amostra e das amostras no geral.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram consideradas hipermetiladas amostras que apresentavam 20% de seus sítios CpG metilados ou mais. De acordo com a literatura este percentual está ligado ao completo silenciamento deste gene (REINHOLD *et al.*, 2007). Os métodos de medição foram padronizados, considerando o número total de ilhas CpG presentes na região promotora do gene em questão. As variáveis consideradas para

análise foram sexo e idade, através da distribuição por faixa etárias (0-12, 13-19, 20-59 e mais de 60 anos).

O fragmento modelo utilizado como padrão para o fragmento de DNA estudado foi o obtido no site do NCBI (sequência de acesso: L345). O cálculo da porcentagem do padrão de metilação se deu pela obtenção do quociente das ilhas metiladas pelo total de ilhas CpG da região promotora do *CDH1*.

$$\text{Ex: } n\text{MET} / i\text{CpG} \times 100 = n\text{CpG}\%$$

Para associações entre polimorfismos, metilação e características das amostras foi utilizado o teste *t* com o valor de significância (α) menor que 0,05, além do Teste de Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram calculadas pelo Software BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS

Com base no conjunto de dados obtidos verificamos no fragmento de aproximadamente 300pb a existência de 22 sítios de ilhas CpG englobando o sítio polimórfico -160, como podemos observar nas figuras 4 e 5. A análise de 45 amostras de tumores revelou um valor global de metilação de 6,9% considerando cada sítio metilado, e dentre as amostras apenas 2,2% se encontravam hipermetiladas. Detectou-se ainda que os tumores astrocísticos apresentaram o maior valor de metilação (13,15%), seguido de dos casos de Schwannoma (5,29%) e dos meningiomas (4,9%). As amostras de tumores metastáticos indicaram o menor valor de metilação (3,65%). Entre os sítios analisados os que apresentaram um nível de metilação mais significativo foram os sítios CpG 7 e 17. O sítio CpG 7 apresentou a maior frequência de metilação entres os tumores metastáticos (37.5%). Enquanto o sítio CpG 17 revelou maior valor de metilação (45,4%) em astrocitomas e em (28%) dos casos de Schwannoma o que não foi observado nos demais tipos tumorais analisados.

Em relação aos tumores astrocísticos associado ao grau de estadiamento, verificamos que os tumores de grau II e grau IV apresentaram os maiores valores de hipermetilação (52%) e (19%) respectivamente.

Na associação do polimorfismo com a metilação, observamos que 22,2% das amostras metiladas apresentaram o alelo “A” e não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o alelo “C” metilados ($p=0.08$), o que pode indicar que o polimorfismo não está influenciando na atividade transcricional neste tipo tumoral.

Tabela 4 Frequência alelotípica do polimorfismo -160 C/A do gene *CDH1* nas amostras de tumores do Sistema Nervoso.

Alelos	Metiladas (%)	Não-Metiladas (%)
C/C	17	12
C/A	10	6

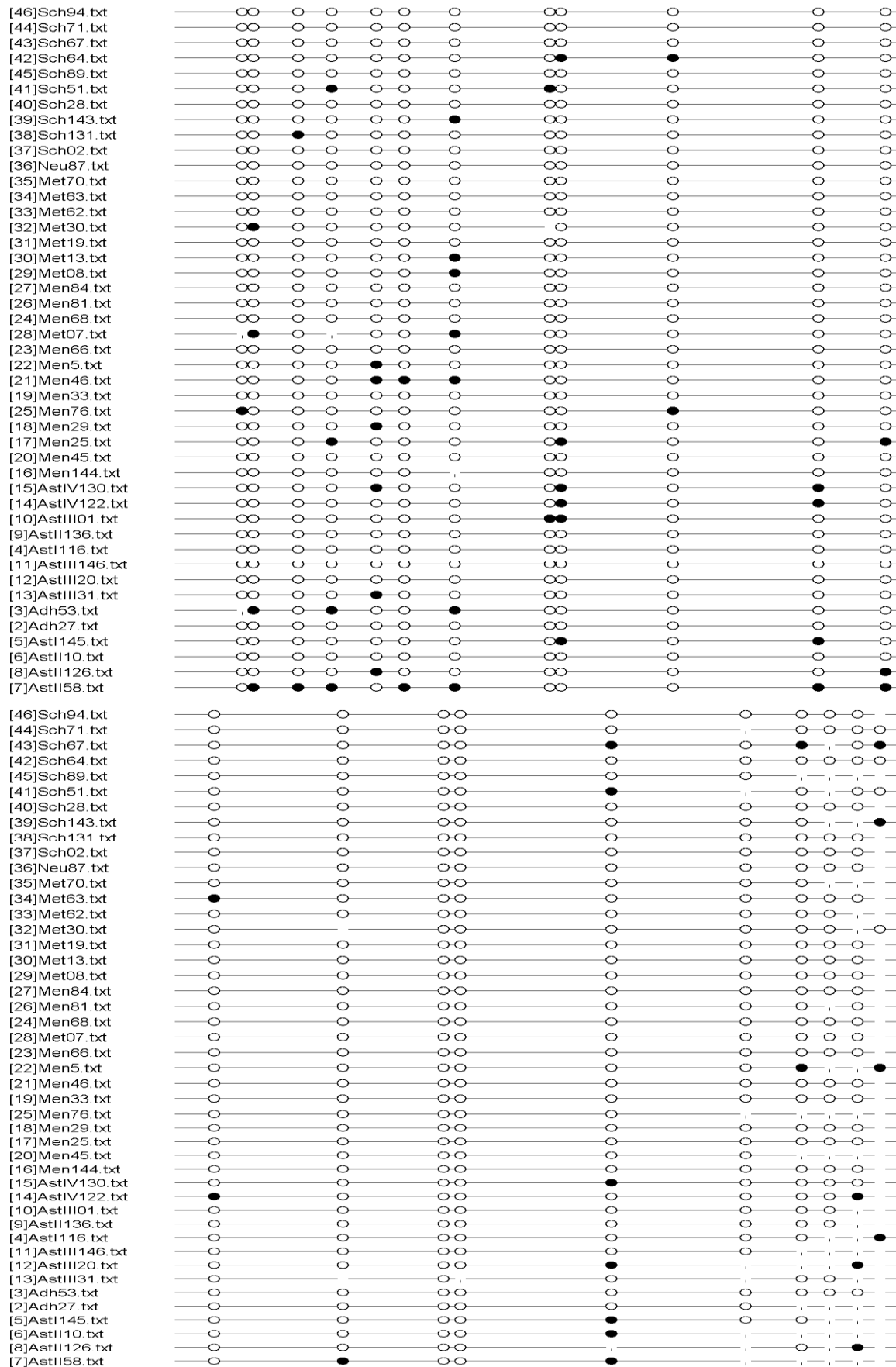


Figura 4. Padrão de metilação de todos os sítios CpG analisados por amostra. Círculos brancos sítios não metilados, círculos pretos sítios metilados.

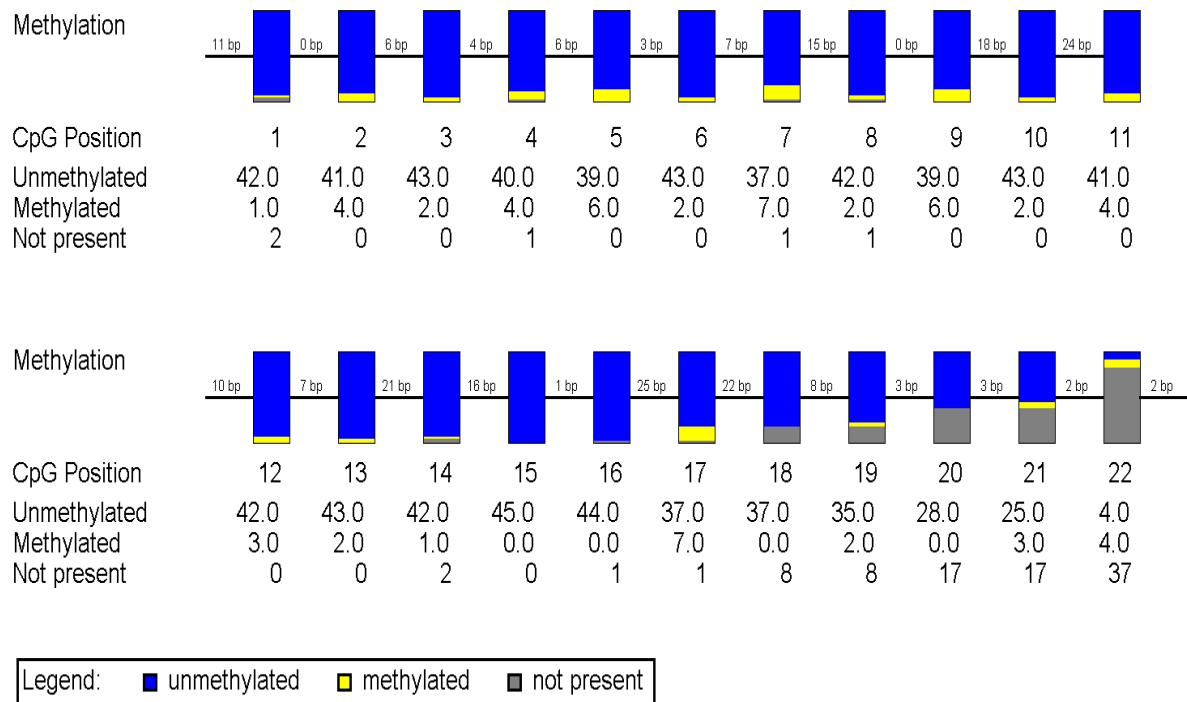


Figura 5. Padrão de metilação de todos os sítios CpG analisados com todas as amostras.

Quando se buscou relações entre o padrão de metilação e as possíveis variáveis, verificou-se que as amostras que apresentavam um padrão de metilação foram mais freqüentes no sexo feminino para Astrocitomas (58,3%), Meningiomas (41,6%) e no sexo masculino para os casos de Metástases (37,5%) e Schwanomas (40%) apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa.

Em relação aos tipos tumorais e idade dos pacientes, observou-se que amostras metiladas de tumores astrocísticos (50%), metastáticos (37,5%) e Schwanoma (40%) foram mais freqüentes na faixa etária entre 20 a 59 anos. Nos casos de meningiomas (25%), as amostras com padrão de metilação foram mais freqüentes na faixa etária de maiores de 60 anos de idade (**Tabela 5**). As variáveis foram testadas e não apresentaram diferença significativa. Já com o teste de Mann-Whitney a diferença entre as amostras de astrocitoma e meningeoma, obteve-se um valor de 0,0496 comprovando que existe diferença no grau de metilação entre esses tipos tumorais, o que não foi verificado quando realizou-se o mesmo teste entre os outros tipos tumorais.

6. DISCUSSÃO

É de importância crítica a expressão de genes da família das caderinas no desenvolvimento e progressão de tumores, incluindo os tumores do SNC. Para ocorrer o desprendimento de células da massa tumoral primária, que irão promover a invasão e formação de metástases, mudanças moleculares significativas devem acontecer na via de adesão celular (HOWNG *et al.*, 2002).

A hipermetilação da região promotora do *CDH1* foi observada em diversos tipos tumorais e associa-se com a inativação deste gene (GRAFF *et al.*, 1995). Em um estudo com pacientes chineses, o gene *CDH1* estava hipermetilado em 32,8% (17/53) em astrocitomas (Yu *et al.*, 2004). No entanto, em nosso estudo notou-se que somente 13,5% das amostras encontravam-se metiladas, esta diferença nos graus de metilação pode ser explicado pelas diferenças entre as metodologias empregadas, uma vez que as análises encontradas na literatura eram feitas de maneira qualitativa pela técnica de MSP (*Methylation Specific PCR* ou PCR de Metilação Específica).

A MSP é uma técnica sensível usada para detectar hipermetilação, baseia-se no anelamento do iniciador durante a PCR. Contudo, tal técnica qualitativa é hábil apenas para realizar a detecção de metilação presente em poucos sítios CpG e apresenta susceptibilidade a resultados falso-positivos (COTTRELL, 2004).

No presente estudo, a hipermetilação foi analisada pelo método quantitativo através da modificação por bissulfito e por sequenciamento onde é possível detectar individualmente os sítios mais suscetíveis a metilação no fragmento (COTTRELL, 2004). Ou ainda essas variações podem ser resultantes das diferenças nos padrões de metilação da *CDH1* neste tipo tumoral nas diferentes populações, o que ainda está pouco elucidado.

Os astrocitomas difusos ou fibrilares (grau II) apresentam-se menos freqüentes em crianças, afetando mais comumente adultos jovens. No exame histopatológico, estes tumores apresentam maior celularidade, normalmente não apresentando os microcistos e fibras de Rosenthal; são mais infiltrativos e tendem a sofrer transformação anaplásica de modo mais freqüente (BEHIN *et al.*, 2003). Essa característica pode ter sido observada em nossas amostras de astrocitomas de grau II já que apresentaram o maior valor de hipermetilação, levando-se em consideração o fator de malignidade uma tendência à hipermetilação e consequentemente a

inativação gênica.

Os astrocitomas grau IV ou glioblastoma multiforme é o tipo de tumor cerebral mais freqüente em adultos e o tumor mais agressivo desta linhagem, correspondendo a aproximadamente 50 % dos tumores malignos do SNC (BINDER *et al.*, 2003). São clinicamente agressivos e extremamente invasivos, com capacidade de invasão extra-axial. Essa neoplasia se apresenta freqüentemente na idade adulta, após os 40 anos de idade, mas não são exclusivos desta idade (BINDER *et al.*, 2003), o que corroborou com os achados de amostras metiladas nesta faixa etária.

Um status aberrante de metilação dos oligonucleotídeos CpG na região promotora do gene *CDH1* foi encontrada como evento epigenético freqüente em astrocitomas de alto grau de malignidade (YU *et al.*, 2004) o que foi verificado em nossas amostras (Tabela 4), corroborando assim com o fato de que a metilação deste gene seja um evento comum na gênese ou progressão deste tipo de tumor.

Em relação as duas ilhas com o maior grau de metilação verificamos que o sítio CpG 7 localiza-se antes da região promotora dos dois E-boxes conservados e o sítio de ligação Sp1 e o sítio CpG 17 está localizado após este aparato de transcrição do gene *CDH1* (REINHOLD *et al.*, 2007). Esta localização pode estar favorecendo o potencial de metilação destes sítios já que estão livres de elementos que conferem proteção contra metilação como o Sp1, no entanto o mecanismo ainda não está muito bem esclarecido (MACLEOD *et al.*, 1994).

Segundo Figarella-Branger e colaboradores (1994) a expressão da E-caderina é maior em tumores meningoteliais o que correlaciona com os nossos achados, pois as amostras de tumores meningoteliais se encontram freqüentes e o nível de metilação em meningiomas foi bem reduzido (4,9%), podendo indicar que o nível de expressão se encontra pouco alterado, não permitindo a interferência de mecanismos epigenéticos.

Outros estudos sobre E-caderina e câncer enfocam o papel desta proteína na supressão da metástase. Portanto, a perda ou inativação do gene *CDH1* pode ter associação com o aumento do poder invasivo em muitos tipos de tumores (Birchmeier & Behrens, 1994). Entretanto, em nosso estudo, os tumores metastáticos indicaram o menor valor de metilação (3,65%) o que contrastou com os achados sobre metilação do *CDH1* na literatura, sugerindo que a relação entre a inativação do gene e a capacidade de invasão nos tecidos pode ser desencadeada

por outros mecanismos não epigenéticos.

Todavia ainda existem poucos trabalhos associando as alterações epigenéticas deste gene com as neoplasias do SNH e sabemos que da importância do entendimento de toda a cadeia de ativação e inativação gênica e os elementos envolvidos presentes neste processo.

Em relação ao polimorfismo -160A, o qual foi descrito inicialmente em tumores gástricos, e de mama. Este polimorfismo vem sendo associado ao risco de desenvolvimento de câncer e apontando como provável candidato a marcador de suscetibilidade ao câncer gástrico (PHAROAH *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000) A correlação entre o polimorfismo -160A e a metilação foi observada nas amostras de tumores do Sistema Nervoso Humano e embora o polimorfismo tenha sido encontrado, não foi estatisticamente significativo, podendo indicar que este não é o bom marcador para o risco para o câncer do SNH.

Vale ressaltar que nosso resultado pode ser em decorrência da heterogeneidade de nossas amostras e o baixo número de amostras de cada tipo tumoral. Devido a isto, estudos complementares devem ser feitos para que realmente se possa ter uma conclusão a cerca do real papel (correlação) da presença do polimorfismo e o risco de câncer de SNH, e para que se confirme a função e os efeitos que as alterações no padrão de metilação na região promotora do *CDH1* têm nos tumores de SNH.

7. CONCLUSÃO

- Os achados sugerem que o gene *CDH1* não se encontra hipermetilado nos tumores do SNH da população paraense, o que contrasta com a literatura, onde este gene se aparece com *status* de hipermetilado. Supostamente isto ocorre, pelo fato de estarmos utilizando uma metodologia diferente da empregada na maioria dos trabalhos realizados com este gene neste tipo tumoral, além do fato de utilizarmos um número amostral reduzido e heterogêneo.
- Não existe uma associação entre a presença do polimorfismo -160 com o padrão de metilação do *CDH1* observado em nas amostras, novamente contrastando com os achados da literatura.
- Não se verificou nenhuma correlação entre o perfil de metilação do *CDH1* apresentado em nossas amostras e a idade, o sexo e o grau de estadiamento tumoral.
- Nos tumores astrocísticos nossos resultados se mostraram bastante promissores, uma vez que encontramos no sítio CpG 17 do promotor do *CDH1* um possível marcador epigenético para este tipo tumoral. Podemos observar ainda a correlação entre o padrão de metilação deste sítio e o grau de malignidade encontrada nos tumores astrocísticos.
- As amostras utilizadas neste estudo apresentam uma grande heterogeneidade e encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento tumoral, o que torna difícil uma melhor caracterização epigenética das mesmas. Devido a este fator faz-se necessário aumentar o número amostral, para que se possa levantar dados mais consistentes não só sobre o perfil epigenético do *CDH1* nos pacientes da população paraense, mais também sobre a possível relação entre suas alterações, o tipo tumoral específico e o seu grau de estadiamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD S.M, YOUNG B., MUNN RK, NANAYAKKARA N, MARKESBERY WR. Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. **Clin Cancer Res**5: 4028-4033, 1999.

ANTEQUERA F. and BIRD A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 90, pp. 11995-11999, 1993.

ASANO, K.; KUBO, O.; TAJIKA, Y.; TAKAKURA, K.; SUZUKI, S. Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. **Neurosurg Rev**, v.23(1): 39-44, 2000.

BEHIN A, H.-X. K., CARPENTIER AF, DELATTRE JY. Primary brain tumours in adults. **Lancet** v. 361: 323-331, 2003.

BINDER DK, EVREN-KELES G, ALDAPE K, BERGER MS. Aggressive glial neoplasms. In: Textbook of neurological surgery – principles and practice. Batjer HH, Loftus CM. 1st edition. Lippincott Williams and Wilkins. **Philadelphia**; p. 1270-1280. 2003.

BIRD, A. The essentials of DNA methylation. **Cell**, **70**: 5-8. 1992.

BOYLE, P & LEVIN, B. **World Cancer Report** 2008.

Cell Science. Disponível em: <http://www.cellscience.com/reviews7/Taylor1.jpg> acessado em 15 de agosto 2009

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Alterações Moleculares em Síndromes Mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **8**: 1-3. 2006.

CLARK, S.J.; HARRISON, J.; PAUL, C.L. AND FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, **22**: 2990-2997. 1994.

COTTRELL, S.E. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. **Clin Biochem**, **37** (7), 595-604, 2004.

ESTELLER, M. Anthony Dipple Carcinogenesis award winner. The necessity of a human epigenome project. **Carcinogenesis**, 1121-1125, 2006.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://lgmb.fmrp.usp.br/dqfto/.../APOSTILA-GENETICAECANCER.doc>. Acesso em: 23 jun 2009.

FIGARELLA-BRANGER D, PELLISSIER JF, BOUILLOT P, BIANCO N, MAYAN M, GRISOLI F, *et al*. Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. **Mod Pathol**;7(7):752–61, 1994.

GRAFF JR *et al*. (1995) E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. **Cancer Res** 55:5195-5199.

GIROLDI, L. A.; BRINGUIER, P. P.; DE WEIJERT, M.; JANSEN, C.; VAN BOKHOVEN, A.; SCHALKEN, J. A. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v.241 (2):453-458, 1997.

GRANDE C.V. Radiocirurgia no Tratamento de Meningeomas na Base do Crânio – Análise das Complicações e Controle do Crescimento Tumoral. Curitiba, 2000.

HANEL R. A., TATSUI C. E., ARAÚJO J. C., GRANDE C. V., ANTONIUK A., GASPARETTO E. L., TORRES L. F. B. Meningiomas em Pacientes Pediátricos, **Arq. Neuropsiquiatria**, Vol. **59**, nº3ª: 623-627, 2001.

HELLEBREKERS D. M. E. I., MELOTTE V., VIRÉ E., LANGENKAMP E., MOLEMA G., FUKS F., HERMAN J. G., CRIEKINGE W. V., GRIFFIOEN A. W., AND

ENGELAND M. V. Identification of Epigenetically Silenced Genes in Tumor Endothelial Cells. **Cancer Research**. Volume 67, Issue 9, 2007.

HOWNG, S. L.; WU, C. H.; CHENG, T. S.; SY, W. D.; LIN, P. C.; WANG, C.; HONG, Y. R. Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors. **Cancer Lett**, v.183,(1):95-101, 2002.

INCA. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, acessado em 20 de junho de 2009.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa do Câncer 2008**.

Instituto Nacional do Câncer (Brasil). A Situação do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 119 p, 2006.

ISSA J. P. J., TAJARA H. E., KONDO Y., DOSHI K., ESTÉCIO M. R. H., YANG A. S. A simple method for estimating global DNA Methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acid Research*, 2004 – Vol 2, 3 – 38.

JONES, P.A. and TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, 293: 1068-1070. 2001.

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

KLEIHUES O., CAVENNE W. K. **Pathology & Genetics**: Tumours of the Nervous System. World Health Organization of Tumours. Lyon: IARC Press. 314p. 2002.

LI L.C., CHUI R.M., SASAKI M., NAKAJIMA K., PERINCHERY G, AU HC, NOJIMA D, CARROLL P, DAHIYA R. A single nucleotide polymorphism in the *E-cadherin* gene promoter alters transcriptional activities. **Cancer Res**; 60: 873-876. 2000.

LOUIS D. N., OHGAKI H., WIESTLER O. D., CAVENEE W. K., BURHER P. C., JOUVET A., SCHEITHAUER B. W., KLEIHUES P. The WHO Classification of

Tumors of Central Nervous System. **Acta Neuropathol** ,**114**:97–109, 2007.

LOUIS D. N., SCHEITHAEUEUR B. W., BUDKA H., VON DEIMLING A., KEPES JJ Meningiomas. In: KLEIHUES O., CAVENNE W. K. **Pathology & Genetics**: Tumours of the Nervous System. World Health Organization of Tumours. Lyon IARC Press. 176-184p. 2000.

LOURO I. D., JÚNIOR J. C. L., MELO M. S. V., PROLLA P. A., FROES N. C. **Genética Molecular do Câncer**. MGM Produção Editorial 2002, São Paulo.

MACLEOD, D.; CHARLTON, J.; MULLINS, J.; BIRD, A.P. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. **Genes Dev**, **8** (19), 2282-2292, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). **Atlas de Mortalidade por Câncer no Brasil 1979-1999**. Rio de Janeiro: INCA, 412p. 2002

NOJIMA, D.; NAKAJIMA, K.; LI, L.C.; FRANKS, J.; RIBEIRO-FILHO, L.; ISHII, N.; DAHIYA, R. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. **Mol Carcinog** 2001, **32** (1), 19-27.

NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Mol Cell Biol Res Commun**, v.2,(2): 77-85, 1999.

OHGAKI H. Methodos of Molecular Biology, Cancer Epidemiology, vol 472 Capitulo **Epidemiology of Brain Tumor**. Págs 323 a 342. M. Verma (Ed.) 2009.

OLEK A., OSWALD J., WALTER J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. **Nucleic Acids research**, 1996.

PHAROAH PD, OLIVEIRA C, MACHADO JC, KELLER G, VOGELSANG H, LAUX H,

BECKER KF, HAHN H, PAPROSKI SM, BROWN LA, CALDAS C, HUNTSMAN D. CDH1 c-160a promoter polymorphism is not associated with risk of stomach cancer. **Int J Cancer**;101: 196-7, 2002.

POKKUTA, S.; WEIS, W. I. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.23:237-261, 2007.

REINHOLD, W.C.; REIMERS, M.A.; MAUNAKEA, A.K.; KIM, S.; LABABIDI, S.; SCHERF, U.; SHANKAVARAM, U.T.; ZIEGLER, M.S.; STEWART, C.; KOUROS-MEHR, H.; CUI, H.; DOLGINOW, D.; SCUDIERO, D.A.; POMMIER, Y.G.; MUNROE, D.J.; FEINBERG, A.P.; WEINSTEIN, J.N. Detailed DNA methylation profiles of the E-cadherin promoter in the NCI-60 cancer cells. **Mol Cancer Ther**, 6 (2), 391-403, 2007.

SAMBROOK J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratorial manual. Second edition, New York. Ed. **Copyright Clearance Center (CCC) Tranaitional Rporting Service** , 1989.

SADIKOVIC B., AL-ROMAIH K., SQUIRE J. A., ZIELENSKA M. Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. **Current Genomics** 9, 394-408, 2008.

Sanger Institute. Disponível em <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/epigenome/> visitado em 10 de setembro de 2009.

SANTOS R., FRIGERI L., ORDOVÁS C., FRIGERI M., BERTUOL I., GUIMARÃES C. A. V., MENDONÇA C. M. F. Epidemiologia dos tumores do Sistema Nervoso Central, Hospital Nossa Senhora de Pompéia, Serviço de Neurocirurgia. A propósito De 100 casos estudados. **Revista Científica da AMECS**, Vol.10, nº1, págs. 24 – 32, 2001.

SIEBER O., HEINIMANN K., TOMLINSON K. Review: Genomic stability and tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**. 15: 61–66. 2005

SVOBODA, P. Bisulfite sequencing of very small samples. Blatny. com 2004.

Journal of Medicinal Chemistry Disponível em: http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/images/sam.jpg acessado em 15 agosto de 2009

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v.251(5000): 1451-1455, 1991.

UHLMANN, K.; BRINCKMANN, A.; TOLIAT, M.R.; RITLER, H. AND NURNBERG, P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. **Electrophoresis**, **23**: 4072-4079. .2002.

UHLMMAN, K.; ROHDE, K.; ZELLER, C.; SZYMAS, J.; VOGEL, S.; MARCZINEK, K.; THIEL, G.; NURNBERG, P.; LAIRD, P. W. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. **Int J Cancer**, **v.106** (1): 52-59, 2003.

YAGI, T.; TAKEICHI, M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. **Genes Dev**, **v.14** (10): 1169-1180, 2000.

YU, J.; ZHANG, H.; GU, J.; LIN, S.; LI, J.; LU, W.; WANG, Y.; ZHU, J. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. **BMC Cancer**, **v.4**:65, 2004.

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:

ANEXO II



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CCS/UFPA

A: Prof. NILSON PRAIA ANSELMO

Carta: 025/06 CEP-CCS/UFPA

Senhor Pesquisador temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa: "Caracterização Citogenética e Molecular de Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense", protocolo nº: 029/06 CEP-CCS/UFPA, foi apreciado e aprovado parecer *Ad-referendum*, em 30 de março de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até o dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA situado no Campus universitário do Guamá no Complexo de sala de aula do CCS – sala 13 (Altos), (em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia).

Atenciosamente,



Prof. M. Sc. Wallace Raimundo Araújo dos Santos
Coordenador do CEP-CCS/UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS – Sala 14 - Campus Universitário, nº 01, Guamá – CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel./Fax. 3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br