



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA

RAIMUNDO MIRANDA DE CARVALHO

**VALOR PROGNÓSTICO DO SNP TP53 ARG72PRO NA
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO E NA
SOBREVIDA DE PACIENTES BRASILEIROS COM
MEDULOBLASTOMA**

Belém - 2011

RAIMUNDO MIRANDA DE CARVALHO

**VALOR PROGNÓSTICO DO SNP TP53 ARG72PRO NA
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO E NA SOBREVIVÊNCIA DE
PACIENTES BRASILEIROS COM MEDULOBLASTOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano.

Belém – 2011

RAIMUNDO MIRANDA DE CARVALHO

**VALOR PROGNÓSTICO DO SNP TP53 ARG72PRO NA
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO E NA SOBREVIVÊNCIA DE
PACIENTES BRASILEIROS COM MEDULOBLASTOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano.

Data da defesa: 22 de dezembro de 2011.

Banca:

Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano.

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto.

Prof. Dr. André Salin Khayat.

Belém – 2011

DEDICATÓRIA

A Deus, meu tudo, meu norte.

Aos meus pais que tanto amo e que são meu alicerce.

A minha noiva, que renova minha alegria e força diariamente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano, pelo seu infinito apoio e incentivo, sem os quais possivelmente esta trilha haveria de ser mais árdua.

Ao Prof. Dr. Giovany Rebouças Pinto e ao Prof. Dr. André Salin Khayat pela sua imensa ajuda, com sugestões, elogios e críticas, sempre objetivando o sucesso da obra e meu aprendizado pessoal.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, que para mim são grandes mentores e pessoas pelas quais nutro profunda admiração e estima.

A todos os professores do Hospital Ophir Loyola, que são minhas grandes referências profissionais e pelos quais tenho apreço eterno e difícil de mensurar.

Aos colegas da Residência de Neurocirurgia do Ophir Loyola que sempre foram grandes incentivadores de meus projetos e com os quais divido emeritamente tudo de bom.

Aos meus pais Analêda e Assis pelo alento e tranquilidade, pelo apoio, incentivo, amor, além da confiança inesgotável.

Aos meus irmãos Lena e Neto, sempre pacientes e com uma pequena palavra ou gesto que acalentavam qualquer tristeza ou dificuldade minha.

A minha noiva Fernanda, pela presença, amor e confiança.

RESUMO

O Meduloblastoma é a neoplasia encefálica mais comum na infância, correspondendo a taxas de 16 a 25% de todos os tumores encefálicos em menores de 19 anos e 30-40% de todos os tumores da fossa posterior. Para investigar o papel do polimorfismo de base única (SNP) TP53 Arg72Pro sobre o risco de desenvolvimento, prognóstico e resposta a terapêutica adjuvante em Meduloblastoma, foi realizado um estudo caso-controle com 122 pacientes e 122 controles saudáveis do Brasil. Em comparação com Arg/Arg, que é o genótipo mais comum na população em estudo, tanto o genótipo Arg/Pro e Pro/Pro não influenciaram o risco de desenvolvimento de Meduloblastoma (OR = 1,36 e P = 0,339 para o genótipo Arg/Pro; OR = 1,50 e P = 0,389 para o genótipo Pro/Pro). Com relação ao prognóstico, a sobrevida livre de doença não foi significativamente diferente entre os genótipos SNP TP53 Arg72Pro (P > 0,05), porém o genótipo menos freqüente, Pro/Pro, foi associado a uma menor sobrevida global dos pacientes com Meduloblastoma (P = 0,021). Estes dados sugerem que embora não haja nenhuma associação entre o SNP TP53 Arg72Pro e o risco de desenvolvimento de Meduloblastoma, o genótipo Pro/Pro está associado a uma menor sobrevida global dos pacientes submetidos a terapia adjuvante. No entanto, devido à composição interétnica da população brasileira, futuros estudos envolvendo populações maiores e de outras partes do mundo serão essenciais para uma conclusão definitiva da função do SNP TP53 Arg72Pro.

Palavras chave: Meduloblastomas; SNP TP53 Arg72Pro; risco; prognóstico, terapia adjuvante.

SUMMARY

Medulloblastoma is a highly cellular malignant embryonal neoplasm, and it is the most common malignant pediatric brain tumor, comprising 20 to 25% of pediatric central nervous system tumors. To investigate the role of the *TP53* Arg72Pro single nucleotide polymorphism (SNP) on medulloblastoma risk, medulloblastoma prognosis, and adjuvant therapy response, we performed a case-control study with 122 patients and 122 healthy controls from Brazil. Compared to Arg/Arg, which is the most common genotype in the study population, both the Arg/Pro and Pro/Pro genotypes did not influence the medulloblastoma development risk (OR= 1.36 and P= 0.339 for the Arg/Pro genotype; OR=1.50 and P=0.389 for the Pro/Pro genotype). With regard to prognosis, the disease-free survival was not significantly different among the *TP53* Arg72Pro SNP genotypes (P > 0.05), but the less frequent genotype, Pro/Pro, was associated with a shorter overall survival of medulloblastoma patients (P= 0.021). These data suggested that although there is no association between the *TP53* Arg72Pro and medulloblastoma risk, the Pro/Pro genotype is associated with a shorter overall survival of patients submitted to adjuvant therapy. Nevertheless, due to the interethnic composition of the Brazilian population, future studies on larger populations from other parts of the world are essential for a definitive conclusion of the function of the *TP53* Arg72Pro SNP.

Keywords: Medulloblastoma; *TP53* Arg72Pro SNP; risk; prognosis; adjuvant therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Proteína TP53.	13
Figura 2A: Meduloblastoma evidenciado em TC de Crânio.	18
Figura 2B: Meduloblastoma evidenciado em RNM ponderada em T2 axial.	18
Figura 2C: Meduloblastoma evidenciado em RNM ponderada em T2 coronal.	18
Figura 2D: Histopatologia do Meduloblastoma, acima imunoreatividade para TP53, abaixo imunohistoquímica negativa para TP53.	19
Figura 3: Distribuição quanto ao sexo em pacientes com Meduloblastoma.	30
Figura 4: Distribuição quanto ao sexo em pacientes grupo controle.	30
Figura 5: Distribuição quanto ao tipo histológico de Meduloblastoma.	31
Figura 6: Distribuição de ocorrência dos diferentes genótipos nos controles.	31
Figura 7: Distribuição de ocorrência dos diferentes genótipos em Meduloblastomas.	31
Figura 8A: Curva de sobrevida livre de doença conforme distribuição genotípica.	33
Figura 8B: Curva de sobrevida global conforme distribuição genotípica.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
SNP	Polimorfismo de Base Única
Kb	Kilobases
SH ³	Radical Sulfidrila
HPV	Papiloma Vírus Humano
SNC	Sistema Nervoso Central
OMS	Organização Mundial de Saúde
DHL	Desidrogenase Láctica
USG	Ultrassonografia
TC	Tomografia Computadorizada
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
PET	Tomografia por Emissão de Póstrons
SPECT	Tomografia por Emissão de Fóton Único
MIGB	Meta-iodobenzilguanidina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
EDTA	Ácido Etileno-diamino tetra-acético
RPM	Rotações por minuto
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
EXO	Exonuclease I

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO TEMÁTICA	
1.1 TUMORIGÊNESE	11
1.2 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA	12
1.3 TP53	13
1.4 MEDULOBLASTOMA	
1.4.1 EPIDEMIOLOGIA	16
1.4.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
1.4.3 DIAGNÓSTICO	18
1.4.3.1 NEUROIMAGEM	19
1.4.3.2 PATOLOGIA	20
1.4.4 ESTADIAMENTO E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO	21
1.4.5 TRATAMENTO	22
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	
3.1 DEFINIÇÃO AMOSTRAL	24
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	25
3.3 MANEJO DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS	26
3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	27
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	27
3.6 DIGESTÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	28
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	29
3.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	29
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	36
6. REFERÊNCIAS	40

1. CONTEXTUALIZAÇÃO TEMÁTICA

1.1 TUMORIGÊNESE

Estudos consideram que o câncer origina-se através de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes específicos em determinado tipo celular. A ocorrência dessas alterações está envolvida com ganho de função, quando acometem oncogenes; com perda de função, se os genes alvo forem os genes de supressão tumoral e comprometimento da manutenção da integridade genômica, quando essas alterações interferem com os genes de reparo do DNA. Assim, as alterações, tanto genéticas quanto epigenéticas, promovem a instabilidade da homeostase celular e, por conseguinte a desestabilização do padrão arquitetural do ciclo celular (Sugimura e Ushijima, 2000; Richardson, 2003).

Estes e inúmeros outros mecanismos retratam a complexidade da doença, pois a perda do controle do crescimento celular inicia-se com alterações em um ou mais genes, seguidas pelo crescente acúmulo de alterações em centenas, senão milhares de genes. Este acúmulo, em função do tempo, faz com que o tumor atinja seu maior grau de malignidade, o que, geralmente, culmina com o desenvolvimento de metástases (Bartek e Lukas, 2001).

Hanahan e Weinber (2000) propuseram que toda célula tumoral necessita adquirir seis alterações essenciais na fisiologia celular que coletivamente ditam o crescimento maligno. São elas: (1) perda do controle sinalizatório sobre a proliferação celular; (2) perda de sinalização para diferenciação celular; (3) sinalização autócrina para divisão celular; (4) inibição de mecanismos pró-apoptóticos; (5) capacidade de transpor a membrana basal de outros tecidos e órgãos e; (6) indução de angiogênese. Todos estes processos envolvem vias bioquímicas que formam uma complexa rede de sinalização celular. Estas vias apresentam-se geralmente alteradas nos processos tumorais, pois os genes que as compõem sofrem alterações, culminando na desestruturação do ciclo celular (Paige, 2003). Deste modo, a identificação e a determinação funcional de tais genes são essenciais para o entendimento da biologia do câncer e das aplicações clínicas, tais

como a identificação de alvos terapêuticos, detecção e diagnóstico precoce e avaliação do curso e prognóstico da doença (Albertson et al., 2003).

1.2 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA

Um polimorfismo de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) é geralmente definido como uma substituição estável de apenas uma base na molécula de DNA com frequência maior que 1%, em pelo menos uma população (Taylor et al., 2001).

Estima-se que exista aproximadamente um polimorfismo a cada 1,91 Kb. Isto significa que 90% das seqüências de mais de 20 Kb apresentam, pelo menos, um SNP e esta densidade pode ser maior nas regiões gênicas. Dos genes conhecidos, 93% contêm SNPs e 98% estão a pelo menos 5 Kb distantes de um. Logo, quase todos os genes ou regiões gênicas são marcados por uma dessas seqüências variáveis (Sachidanandam et al., 2001).

O DNA do genoma humano apresenta inúmeras variações seqüenciais, dentre as quais as substituições de bases são as mais comuns. Dependendo da localização da variação nucleotídica simples, incluindo polimorfismos de base única (SNPs) e mutações de ponto, diferentes conseqüências podem ser geradas em nível fenotípico. SNPs em regiões específicas do código genético podem alterar a função ou estrutura de determinadas proteínas, ocasionando desordens monogenéticas. Por outro lado mutações podem estar associadas com patologias multagênicas complexas como diabetes tipo 1, doenças cardiovasculares ou câncer. Particularmente em termos de oncologia, as mutações ou polimorfismos em alguns casos de genes relacionados ao câncer desempenham um papel de potenciais marcadores, contribuindo para o diagnóstico da patologia, determinação do prognóstico ou manejo terapêutico (Lander et al., 2001).

Neste contexto, é de relevante interesse propostas diagnósticas que estabeleçam correlações genéticas plausíveis, destacando-se neste íterim estudos sobre mutações e SNPs em genes sabidamente relacionados a patologias humanas (Ho-Pun-Cheung, 2006).

As variações na seqüência genômica contribuem para diversidade fenotípica e apontam suscetibilidade a, ou contra, qualquer tipo de doença. Deste modo, estima-se que os riscos da maioria das doenças complexas podem ser fortemente influenciados pelos padrões de SNPs em certos genes chave de suscetibilidade, ainda por serem identificados. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para variações interindividuais de ordem genética na resposta a medicamentos, um campo de grande interesse da indústria farmacêutica. O benefício em ter um mapa de SNPs é que este possibilita a cobertura de todo o genoma; portanto, os pesquisadores podem comparar os padrões e freqüências dos polimorfismos de seus pacientes e, desta forma, associá-los à doença em questão (Brookes, 1999; Lander et al., 2001).

1.3 TP53

O gene *TP53* possui 11 éxons distribuídos ao longo de 20 Kb, no braço curto do cromossomo 17, no locus 17p13.1. Este gene é responsável pela transcrição de uma proteína que se liga ao DNA em seqüências específicas e age como fator de transcrição de genes reguladores do crescimento celular (Soussi e May, 1996).

A proteína TP53 é uma fosfoproteína nuclear constituída por 393 aminoácidos e tem como forma ativa funcional uma estrutura tetramérica, sendo que cada subunidade é constituída por cinco domínios funcionais distintos: (1) um domínio de ativação transcricional, localizado na porção N-terminal (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997); (2) logo após, um domínio SH³ (Gorina e Pavletich, 1996); (3) um domínio de interação com o DNA, localizado no cerne da proteína (El-Deiry et al., 1992; Bourdon et al., 1997); (4) um domínio de tetramerização, no quarto sítio, responsável pela formação da estrutura quaternária (Jeffrey et al., 1995) e; (5) um domínio de regulação, na porção C-terminal (Gorina e Pavletich, 1996) (Figura 1).

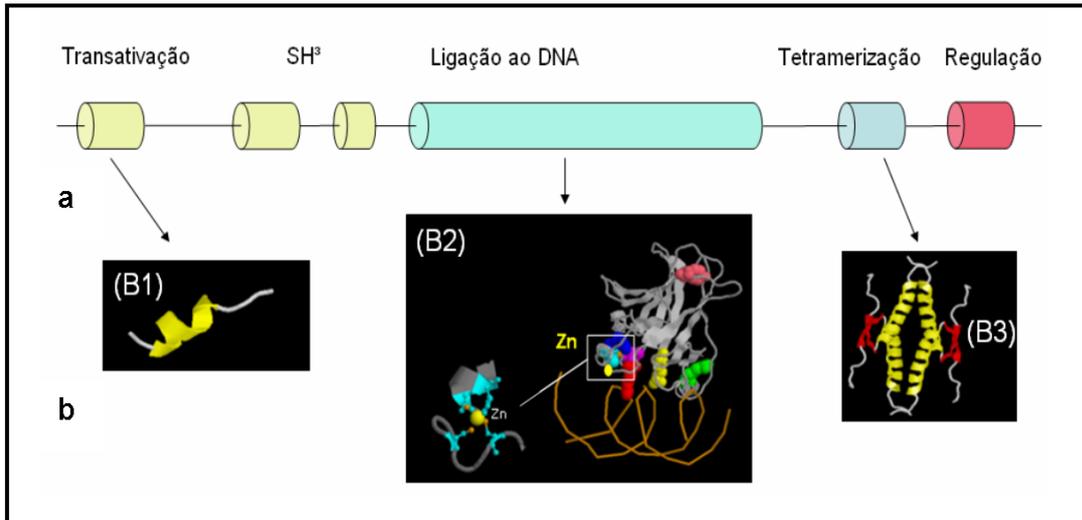


Figura 1: Estrutura da proteína TP53: (a) estrutura linear; (b) estrutura tridimensional, (B1) domínio de transativação; (B2) domínio de ligação ao DNA; (B3) domínio de tetramerização (IARC, 2007).

As células humanas são freqüentemente expostas a insultos genotóxicos de origem endógena ou ambiental associados com processo de carcinogênese. Entretanto, as células desenvolveram um sistema complexo de proteção contra tais insultos. O *TP53*, gene de supressão do tumoral, é um destes, desempenhando tarefas importantes na proteção e no rastreamento de insultos genotóxicos, atuando como um integrador chave dos sinais produzidos por danos ao DNA.

Em células normais o nível da proteína TP53 é baixo ou indetectável, mas em situações diversas podemos ter uma expressão significativa, levando ao controle intrínseco sobre o ciclo celular e mecanismos pró-apoptóticos (Levine, 1997).

A freqüência de aproximadamente 50% de mutações no gene *TP53* observada nos tumores humanos, indica a complexidade das vias antiproliferativas sob controle de TP53 e demonstra que esta proteína desempenha um papel importante na tumorigênese (Bonafe et al., 2002).

As evidências iniciais de que o gene *TP53* estaria envolvido na tumorigênese foram dadas por estudos que demonstraram a freqüente perda de heterozigidade do locus 17p13.1, em diversos tipos tumorais (Fearon et al., 1987; Vogelstein et al., 1988; Baker et al., 1990). Além disso, em indivíduos com síndrome de Li-Fraumeni, doença hereditária tipicamente caracterizada por um alto risco de desenvolvimento

de tumores, observou-se que o gene *TP53* estava freqüentemente mutado (Malkin et al., 1992; Malkin et. al., 1994).

A proteína TP53 selvagem inibe o crescimento de células com dano genético, por dois caminhos distintos: causando a parada do ciclo celular ou induzindo a apoptose. Esta dicotomia permite uma resposta biológica apropriada ao dano no DNA. Desta maneira, ou a integridade genômica é restaurada, por reparo do DNA, permitindo que as células sejam liberadas da detenção transitória do ciclo celular ou, quando o dano persiste, estas são permanentemente eliminadas por apoptose. Esta função de TP53 como “guardiã do genoma” pode ser estendida ao monitoramento e reparo inicial do dano no DNA em adição ao controle direto do crescimento celular e apoptose (Lane, 1992; Wang et al., 1995).

Uma região crítica da proteína TP53 para a sinalização da apoptose localiza-se entre os códons 64 e 92 e é caracterizada por uma alta freqüência do aminoácido prolina. Dentro dessa região, no éxon 4, existe um freqüente SNP funcional, que resulta na substituição de uma arginina por uma prolina no códon 72 (Arg72Pro). Dumont et al. (2003) relataram que, em homozigose, o alelo Arg72 tem a capacidade de induzir apoptose 15 vezes maior que o alelo Pro72. Esta capacidade aumentada do alelo Arg72 é devida, pelo menos em parte, à localização mitocondrial potencializada, na qual TP53 pode interagir diretamente com a proteína pró-apoptótica BAK (Leu et al., 2004). Estes estudos de funcionalidade do SNP *TP53* Arg72Pro serviram de base para outros que testaram o impacto desse polimorfismo no risco e progressão dos tumores, onde o alelo menos apoptótico Pro72 foi associado com o risco aumentado para o desenvolvimento de tumores (Kawajiri et al., 1993; Jin et al., 1995; Wang et al., 1999; Granja et al., 2004; Hishida et al., 2004; Xi et al., 2004).

As variantes Pro72 e Arg72 têm sido referidas em diversos estudos como apresentando atividade funcional intrínseca diferente. A variante Arg72 foi mais associada à supressão da transformação celular, um perfil fortemente vinculado a ação pró-apoptótica de *TP53*. Adicionalmente, a variante Arg72 foi mais susceptível a degradação pelo Papiloma Vírus Humano (HPV), dos subtipos 18 e 16, sabidamente com alto poder oncogênico (Hishida et al., 2004).

Esta associação tem sido relacionada ao alto risco de câncer em inúmeros estudos, ainda que não haja um consenso pleno, especialmente nas lesões HPV induzidas (Dumont et. al., 2003).

1.4 MEDULOBLASTOMA

1.4.1 Epidemiologia

Meduloblastoma, também conhecido como tumor primitivo neuroectodérmico (PNET) da fossa posterior, foi inicialmente descrito por Bailey e Cushing em 1925, tendo sido a primeira grande casuística definida em 1930, com a análise de 61 casos, feita por Cushing (Albright et al., 2008).

O Meduloblastoma é a neoplasia encefálica mais comum na infância, correspondendo a taxas de 16 a 25% de todos os tumores encefálicos em menores de 19 anos e 30-40% de todos os tumores da fossa posterior. As taxas de incidência são em média de 0,48 (meninas) a 0,75 (meninos) por cada 100.000 pacientes-ano, estimando-se que haja em média nos EUA em torno de 350 novos casos ao ano (Crawford et al., 2007; Albright et al., 2008). São de ocorrência rara na população adulta, correspondendo a apenas 1% dos tumores nesta faixa etária (Albright et al., 2008).

Ocorrem, no Meduloblastoma, dois picos de incidência, sendo o primeiro entre os 3 e 4 anos e outro entre 9 e 10 anos de idade (Crawford et al., 2007).

Em torno de 1-2% dos casos de Meduloblastoma estão associados à síndrome de Gorlin (síndrome do carcinoma basal nevíde) e até 40% dos pacientes podem apresentar Polipose Adenomatosa Familiar (Síndrome de Turcot) com mutações gênicas no cromossomo 5q21 (Crawford et al., 2007).

Nas duas últimas décadas inúmeros fatores prognósticos moleculares foram testados no intuito de melhor entendimento da estratificação de risco e das opções de tratamento para Meduloblastoma. Neste sentido, até o presente momento alterações de sinalização TrkC e Wnt, além de deleção do cromossomo 6q, têm sido identificados como marcadores promissores favoráveis. No entanto, apenas quatro

marcadores são consensuais quanto a sua reprodutibilidade, estando associados a resultados desfavoráveis, sendo estes: amplificação MYC, superexpressão BIRC5, superexpressão ERBB2 e mutação de TP53 (Grotzer et al., 2000; Pfister et al., 2009; Pizem et al., 2005; Ray et al., 2004; Tabori et al., 2010; Thompson et al., 2006).

A versão atualizada do banco de dados sobre mutações de *TP53*, da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (versão R15; WWW.p53.iarc.fr), refere mais de 27.000 casos de mutações somáticas de *TP53*, com geração de mais de 2.300 diferentes proteínas mutantes (Petitjean et al., 2007). Apesar de tais informações e do fato recentemente identificado do pobre prognóstico conferido pelas mutações de *TP53*, este gene é muito raramente mutado em Meduloblastomas (Tabori et al., 2010).

Em função de nosso conhecimento, não há estudos, até o presente momento, que demonstrem associação entre o SNP *TP53* Arg72Pro e a susceptibilidade ao desenvolvimento, prognóstico ou resposta a terapia adjuvante em Meduloblastomas.

1.4.2 Manifestações Clínicas

Em função de sua localização na fossa posterior (compartimento infratentorial), o Meduloblastoma comporta-se como uma lesão expansiva causando compressão do 4º ventrículo, gerando hidrocefalia obstrutiva. As conseqüências são típicas manifestações de hipertensão intracraniana (cefaléia, náuseas, vômitos e alterações variáveis do nível de consciência). O comprometimento cerebelar pode gerar distúrbios graves na coordenação dos movimentos, denominados ataxias, com importante comprometimento da marcha, da estabilidade postural e dos atos motores complexos (Crawford et al., 2007). Tais sintomas comumente apresentam-se muitas semanas antes do diagnóstico definitivo (Albright et al., 2008).

Paresia de nervos cranianos podem ocorrer, especialmente do VI nervo, gerando diplopia e estrabismo. O fundo de olho pode evidenciar papiledema, reflexo do quadro de hipertensão intracraniana subjacente (Crawford et al., 2007; Albright et al., 2008).

1.4.3 Diagnóstico

1.4.3.1 Neuroimagem

Geralmente o primeiro exame realizado é a Tomografia Computadorizada (TC) de Crânio, em função de sua acessibilidade e rapidez de realização. Os achados clássicos na TC (Figura 3A) correspondem a um processo expansivo vermiano, localizado na linha média, com captação do meio de contraste. Tal achado é visto em 30-55% dos pacientes. Outros achados não habituais podem corresponder a lesões císticas, lesões hipodensas não captantes e com calcificações (Nelson et al., 1991; Kumar et al., 2001).

A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de encéfalo (Figuras 3B e 3C) apresenta uma contribuição importante no diagnóstico do Meduloblastoma, evidenciando lesões heterogêneas da linha média, com sinal hipointenso em T1 e atenuação intermediária entre substância branca e cinzenta em T2. A captação de contraste geralmente é bastante heterogênea, ainda que captações homogêneas e regulares possam ocorrer. A utilização de RNM de neuroeixo é de realização obrigatória na investigação de doença extracraniana, sendo fundamental no estadiamento da doença (Kumar et al., 2001). Outras modalidades de estudos neurorradiológicos, tais como Espectroscopia por RNM, Tomografia com Emissão de Pósitrons (PET scan) e TC com emissão de fóton único (SPECT), apresentam utilização especialmente na diferenciação entre recorrência tumoral e a presença de radionecrose pós-tratamento (Crawford et al., 2007).



Figura 2A: Meduloblastoma evidenciado em TC de crânio.

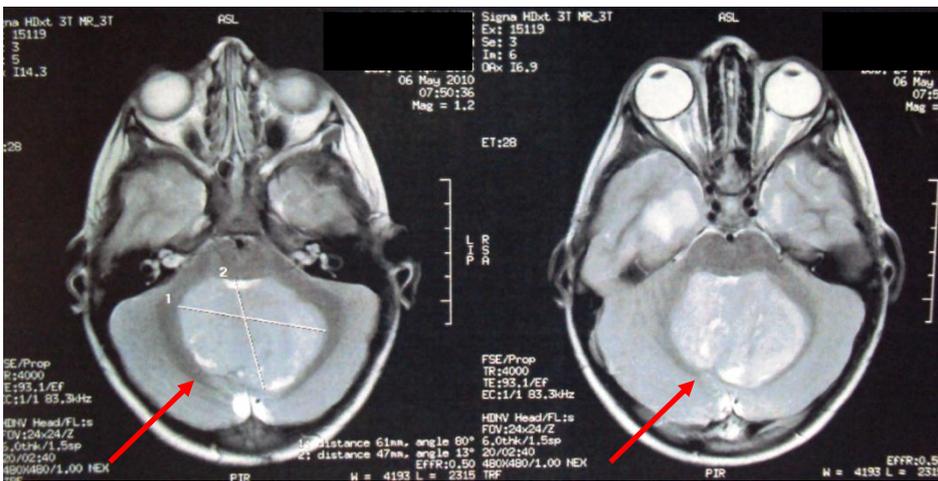


Figura 2B: Meduloblastoma evidenciado em RNM de encéfalo T2 axial.



Figura 2C: Meduloblastoma evidenciado em RNM de encéfalo T2 coronal.

1.4.3.2 Patologia

A despeito do grande avanço das técnicas neurorradiológicas, o diagnóstico do Meduloblastoma permanece baseado em critérios histopatológicos e imunohistoquímicos. Segundo a classificação da OMS, podemos ter as seguintes variantes do Meduloblastoma: Meduloblastoma Clássico, Meduloblastoma Desmoplásico, Meduloblastoma com extensiva nodularidade e Meduloblastoma de Grandes Células (Giangaspero et al., 2000, Eberhart et al., 2004).

Meduloblastomas geralmente são tumores friáveis de coloração púrpura e localizados na topografia do quarto ventrículo. Podem comprometer hemisfério cerebelar e tronco encefálico. Aglomerados de células redondas e azuis, com intensa hiper cromasia nuclear, são os achados clássicos do Meduloblastoma indiferenciado. As rosetas de Homer-Wright são também achados característicos e ocorrem em aproximadamente 40% dos casos. Alto índice mitótico é visto em até 80% dos Meduloblastomas, sendo avaliado através de anticorpos KI67/MIB1. Meduloblastomas comumente são positivos para Vimentina e Sinaptofisina (Gilbertson et al., 2002; Eberhart et al., 2004).

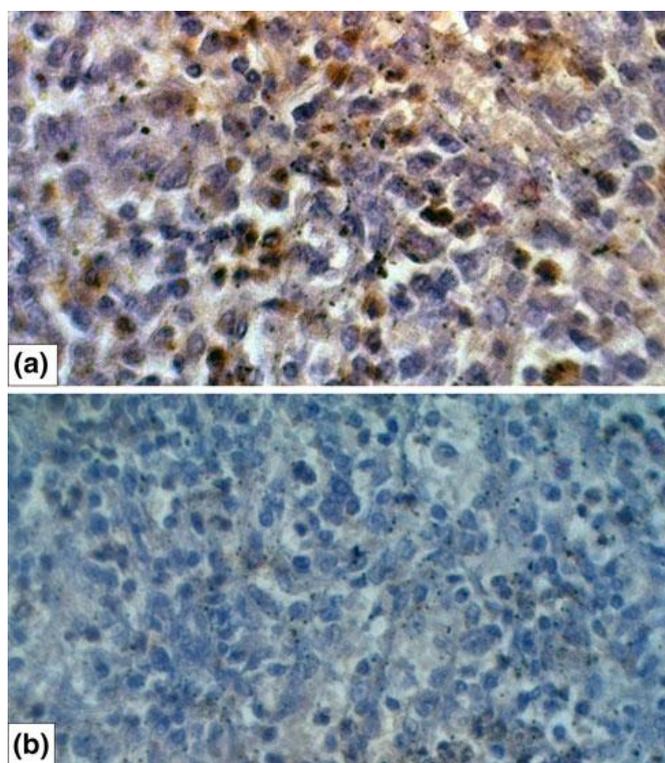


Figura 2D: Histopatologia do Meduloblastoma. Imunorreatividade para mutação de TP53 (a) e imunohistoquímica negativa para mutação de TP53 (b).

1.4.4 Estadiamento e Estratificação de Risco

Além da realização de RNM de neuroeixo é fundamental o estudo de líquido cefalorraquidiano (LCR) mediante punção lombar, objetivando a pesquisa de células neoplásicas. O LCR deverá ser colhido duas semanas após a cirurgia para evitar resultados falso-positivos (Packer et al., 2003).

Os resultados do tratamento do Meduloblastoma são altamente dependentes do estadiamento clínico na época da apresentação inicial. Neste sentido, a principal ferramenta utilizada para estadiamento é o sistema de Chang, descrita na tabela 1 (Chang et al., 1969).

Tabela 1 – Estadiamento Tumoral no Meduloblastoma – Sistema de Chang

Estadio Tumor (T)
T1: Tumor menor que 3cm de diâmetro, envolvendo estruturas da fossa posterior;
T2: Tumor menor que 3cm de diâmetro, invadindo 2 ou mais estruturas na fossa posterior;
T3a: Tumor maior que 3cm de diâmetro, invadindo duas ou mais estruturas da fossa posterior;
T3b: Tumor invadindo o assoalho do quarto ventrículo;
T4: Tumor estendendo-se além do quarto ventrículo, superiormente em direção ao terceiro ventrículo ou inferiormente em direção a cisterna magna.
Estadio Metastático (M)
M0: sem evidência de disseminação tumoral;
M1: citologia oncótica positiva no LCR;
M2: disseminação tumoral intracraniana;
M3: disseminação tumoral intraespinhal;
M4: disseminação tumoral sistêmica

Fonte: Chang et al., 1969

1.4.5 Tratamento

Cirurgia, Radioterapia e Quimioterapia são ferramentas amplamente utilizadas no tratamento do Meduloblastoma. Em se tratando de abordagem cirúrgica, sabe-se que o grau de ressecção é fator prioritário, haja vista estar intrinsecamente relacionado ao prognóstico e ao controle ao longo prazo da doença (Albright et al., 2008). Ressecções amplas e com mínimo resíduo tumoral, respondem melhor ao tratamento adjuvante e apresentam menores taxas de recrescimento ou recidiva locorregional com a passar do tempo (Zeltzer et al., 1999). É necessário lembrar que os tumores de linha média na fossa posterior, entre eles o Meduloblastoma, apresentam íntima relação com estruturas do assoalho do quarto ventrículo e, por conseguinte, com estruturas do tronco encefálico, tendo o potencial de gerar grande morbidade nas abordagens cirúrgicas. Há relatos bem descritos, de uma síndrome de Mutismo Cerebelar no pós-operatório de lesões da fossa posterior, sendo mecanismo proposto a lesão do trato dentorubrotalâmico (Robertson et al., 2006).

A Radioterapia é parte fundamental e obrigatória no tratamento do Meduloblastoma, sendo superior à utilização da cirurgia isoladamente. Em função da extrema morbidade da radioterapia em crianças menores, esta é apenas indicada nas crianças acima de três anos. Deverá ser realizada irradiação de todo neuroeixo, com um *boost* (dose maior concentrada) na fossa posterior. A irradiação do neuroeixo, mesmo sem a detecção de lesões na RNM ou no LCR é fundamental na ablação de possíveis lesões microscópicas (Patterson et al., 1953; Albright et al., 2008).

A quimioterapia é um dos tratamentos padrão em pacientes de alto risco, especialmente nos menores de três anos que não devem receber a radioterapia. Quimioterapia melhora os resultados em pacientes submetidos à cirurgia radical e radioterapia, melhorando a sobrevida em 24-40% dos casos. Em adultos a quimioterapia não parece apresentar bons resultados, especialmente em função da baixa tolerabilidade dos efeitos adversos dos quimioterápicos. Drogas comumente utilizadas são a Cisplatina, Vincristina, Lomustina, Ciclofosfamida e Etoposídeo (Gottardo, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem objetivo avaliar, por PCR-RFLP, a associação do SNP *TP53* Arg72Pro na suscetibilidade ao desenvolvimento de Meduloblastomas, na população em estudo.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o genótipo do SNP *TP53* Arg72Pro entre as populações caso e controle, na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade ao desenvolvimento de Meduloblastoma.
- Comparar o genótipo do SNP *TP53* Arg72Pro obtidos na população de pacientes com variáveis como idade, sexo, status vital, grau e subtipo tumoral, na intenção de identificar associações com essas variáveis.
- Avaliar a influência dos genótipos dos SNPs na taxa de sobrevida global e livre de doença, na intenção de identificar fatores que possam contribuir para o prognóstico dos pacientes.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Definição Amostral e Critérios de Inclusão

Foram estudadas amostras de fragmentos tumorais, provenientes dos blocos de material utilizado no diagnóstico histopatológico de Meduloblastoma dos pacientes, que estão ou estiveram em seguimento oncológico no Hospital Ophir Loyola entre os anos de 1999 a 2010.

Todos os pacientes que não enquadrarem-se nas características acima, não serão incluídos.

A população de estudo é constituída de 244 participantes, sendo 122 casos, ou seja, portadores de Meduloblastoma, e 122 controles.

Para obtenção das amostras foi procedida à clivagem em micrótomo dos blocos selecionados, objetivando apenas a obtenção de um pequeno fragmento laminar, sem danificar de maneira alguma o bloco. Em seguida procedeu-se a extração do material genético mediante técnica descrita adiante.

Para definição do diagnóstico histopatológico de Meduloblastoma, todos os exemplares tumorais foram analisados e revistos independentemente por dois neuropatologistas experientes, conforme critérios da OMS (Eberhart et al., 2002; Louis et al., 2007).

No que se refere à definição do tipo de tratamento cirúrgico empregado é importante que se defina que:

- Ressecção Completa: foi considerada ressecção completa a ausência de doença microcirúrgica (visão microscópica intra-operatória do cirurgião), confirmada com RNM de encéfalo pós-operatória.

- Ressecção Subtotal: foi considerada ressecção subtotal a ressecção de > 75% e < 100% da lesão, calculadas mediante volume de resíduo tumoral em RNM de encéfalo pós-operatória.

- Ressecção Parcial: foi considerada ressecção parcial a ressecção menor que 75% da lesão, definida mediante cálculo do volume tumoral residual, em RNM de encéfalo pós-operatória.

- Biópsia: ressecção apenas amostral para diagnóstico.

- Tratamento não operatório: pacientes que por algum motivo não puderam receber tratamento neurocirúrgico.

O grupo controle foi formado por população de referência de 122 participantes, ajustadas por idade e sexo a população de casos e sem qualquer histórico pessoal ou familiar de câncer, constantes no Banco de Amostras do Laboratório do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), através de convênio de cooperação com a Universidade Federal do Pará (UFPA). Destes participantes foi utilizado 5ml de sangue periférico.

3.2 Aspectos Éticos

O desenvolvimento das atividades do estudo tiveram a finalidade precípua de contribuir com desenvolvimento científico e para a melhoria na atenção a saúde das crianças com câncer, levando em consideração a determinação de possíveis marcadores genéticos relacionados ao diagnóstico e ao prognóstico de tais pacientes.

No que se refere ao sigilo das informações obtidas durante o estudo, esta foi garantida de forma ampla, na medida em que todos os participantes foram identificados por um código alfanumérico correspondente ao registro no Departamento de Patologia do Hospital Ophir Loyola, não sendo utilizado de forma alguma os nomes ou qualquer forma de identificação pessoal dos participantes ou de seus familiares, em todas as etapas de desenvolvimento do estudo.

O material utilizado no estudo foi proveniente do bloco de parafina que motivou o diagnóstico histopatológico, não sendo necessária a realização de qualquer teste ou análise diretamente com os pacientes ou seus familiares. Todos

os dados serão dissociativos dos indivíduos e não identificáveis em todas as etapas do estudo.

Não houve necessidade de proposta para aconselhamento genético, haja vista que as patologias envolvidas no estudo são, na maioria dos casos, de desenvolvimento esporádico, sem caráter familiar associado.

Não houve, na pesquisa, qualquer proposta de modificação do genoma humano, cabendo apenas a identificação de alterações presentes. Para mais informações vide as técnicas utilizadas.

Atendendo à Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 1996), que trata das normas para pesquisas envolvendo seres humanos, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto, em função da inexistência de um comitê semelhante no hospital em que se realizará o estudo.

Não houveram qualquer tipo de risco aos participantes, associado ao desenvolvimento das atividades do projeto.

Os benefícios estão intrinsecamente relacionados à geração de conhecimento e sua divulgação na comunidade científica, objetivando a melhoria no diagnóstico precoce e no prognóstico das crianças com câncer.

3.3 Manejo das variáveis Epidemiológicas e Comportamento Clínico dos Tumores

O estudo das variáveis epidemiológicas e comportamento clínico das neoplasias foi realizado através da coleta de informações de forma retrospectiva que constam do Registro Hospitalar de Câncer do Hospital Ophir Loyola, mais precisamente na Ficha de Registro de Tumor, segundo recomendações do INCA.

3.4 Extração e quantificação do DNA

Para a extração de DNA foi utilizado aproximadamente 0.3 cm³ de tecido das amostras tumorais. Cada amostra foi submetida à maceração com nitrogênio líquido. Depois de pulverizada, a amostra foi transferida para um tubo de centrifuga e então adicionados 5 mL de tampão de extração (Tris 1 M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M), 50 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 0,5 mL de SDS 20%. O tubo foi agitado por inversão até a obtenção de uma mistura completamente homogênea que em seguida foi incubada em banho-maria a 37°C durante a noite.

No dia seguinte, foram adicionados de 5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo de centrifuga. Neste novo passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para sua completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um outro tubo de centrifuga, onde serão adicionados 5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este tubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL, o volume da amostra foi medido e acrescentou-se 1/10 deste volume de acetato de amônio 7.5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado, para precipitação.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas, o DNA lavado com etanol 70%, novamente centrifugado e o etanol descartado. O DNA foi colocado para secar a 37 °C durante uma hora. Em seguida, foi adicionado de 500 a 700 µL de água estéril ao precipitado e, após sua dissolução completa, o DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C até as análises.

A extração do DNA do sangue periféricos dos controles procedeu-se, basicamente segundo a metodologia de Old e Higgs (1993), porém com algumas modificações. Foram adicionados 5 mL sangue total em tubo de 15 mL, acrescentou-se solução salina (9 g/L de NaCl) até 14 mL e esta mistura foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se tampão de lise de hemácia (5 mmol/L de MgCl₂, 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,8) até 14 mL, esta mistura também foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi

desprezado e 5 mL de tampão de lise de leucócitos foi adicionado ao precipitado (0,2 mol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris-HCl, PH 7,8), além de 500 µL de SDS a 10% e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). Esta mistura foi agitada por 2 horas a temperatura ambiente. No final deste período foi acrescentado 1 volume de fenol e agitar-se-á por 10 minutos, com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Neste tubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isopropílico (24:1), agitou-se por 10 minutos com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 2,5 vezes o volume de álcool isopropílico e a mistura foi agitada por inversão até a precipitação do DNA, que foi transferido para um novo tubo, onde permaneceu secando por toda a noite. Passado esse período, foi adicionado de 700 a 1.000 µL de água estéril e, após sua dissolução completa, foi o DNA quantificado e armazenado a -20 °C até as análises.

A pureza e concentração do DNA foi determinada por corrida eletroforética em gel de agarose (*Amersham Biosciences*) a 0,8% e em espectrofotômetro (*Spectronic Genesys 5, Milton Roy, Rochester, NY*,. Estados Unidos da América) por meio do comprimento de onda de 260 e 280 nm. Para as análises, todas as amostras foram diluídas até 50 ng.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase

As condições da PCR, da região polimórfica de interesse, para um volume total de 25 µL serão: 50 ng de DNA, tampão 1x (*Biotoools, Madri, Espanha*), 2 mM de MgCl₂ (*Biotoools, Madri, Espanha*), 0,4 µM de cada *primer* (*Invitrogen, Estados Unidos*), 50 µM de cada dNTP (*Amersham Biosciences*), 0,5 U de *Taq* polimerase (*Biotoools, Madri, Espanha*) e água Milli-Q (*Millipore, Inc.*). A PCR foi realizada em termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf, Inc.*).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (*Amersham Biosciences*), corado com brometo de etídio, na concentração de 2%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com corrente de 150 V e os fragmentos

amplificados foram visualizados em transiluminador (modelo FBDLT-88, *Fisher Scientific*) com fonte de luz ultravioleta.

3.6 Digestão Enzimática dos Produtos Amplificados

Após amplificação das regiões de interesse do SNP *TP53 Arg72Pro*, os produtos da reação foram submetidos ao procedimento de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*), incubados na presença da enzima BstU Ic (*New England, BioLabs, Inc.*).

A presença do alelo Arg72 do SNP *TP53 Arg72Pro* possui um sítio de restrição reconhecido pela enzima BstU I que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes (52 pb e 100 pb), enquanto que o alelo Pro72 permanece com 152 pb.

3.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os produtos das digestões enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 19:1 (acrilamida:bis-acrilamida, *Amersham Biosciences*) na concentração de 10%, sob uma corrente de 150 V em cuba vertical, juntamente com um *Ladder* de 50 pb (*Amersham Biosciences*). Após a corrida, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata (*Merck*) a 10% e fotografado.

3.8 Purificação e Sequenciamento

Para controle das digestões enzimáticas, 10 produtos de PCR do SNP estudado foram purificados e em seguida seqüenciados.

A purificação foi realizada utilizando-se uma combinação de duas enzimas: *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (*USB Corporation, Cleveland, Ohio*), que degrada os nucleotídeos não incorporados e a *Exonuclease I* (EXO) (*USB Corporation, Cleveland, Ohio*), que degrada *primers* residuais e demais produtos de

fitas simples não desejáveis. Em 8 μL de produto de PCR foram misturados 0,5 μL de EXO (10 U/ μL) e 1 μL de SAP (1 U/ μL). Em seguida, esta mistura foi incubada em termociclador *Mastercycler (Eppendorf, Inc.)* por 1 hora a 37 °C e 15 minutos a 80°C. Após a ciclagem, as amostras foram aplicadas em gel de acrilamida (29:1), para confirmar a presença de banda única, e conservadas a 4 °C até o sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada em MegaBACE 1000 (*GE Healthcare*), utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (*Amersham Biosciences*), de acordo com as recomendações do fabricante.

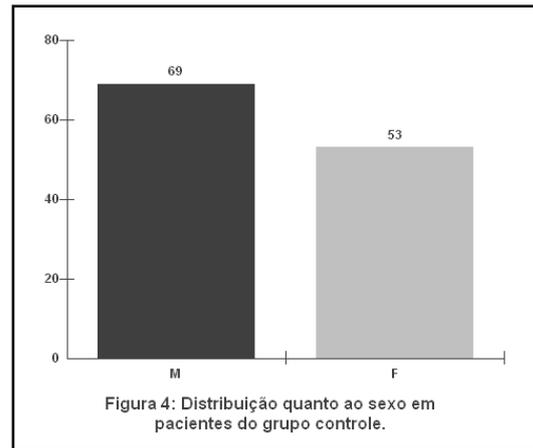
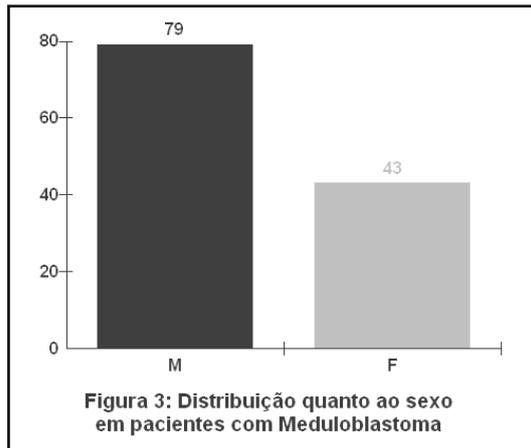
3.9 Análise Estatística

As populações caso e controle foram testadas quando ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg. Para verificar se a distribuição dos genótipos dos SNPs era semelhante entre as duas populações e se a distribuição de idade, sexo, status vital, grau e subtipo tumoral eram semelhantes entre a população de pacientes foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher (F), quando necessário. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

Para avaliar a influência de idade, sexo, grau e subtipo tumoral e os genótipos dos SNPs na taxa de sobrevida livre de óbito e de doença dos pacientes, foram construídas curvas de Kaplan-Meier para cada uma das diferentes categorias de cada variável. A comparação para verificar se uma ou outra categoria aumenta ou não a chance de sobrevida foi realizada pelo teste de Log-Rank.

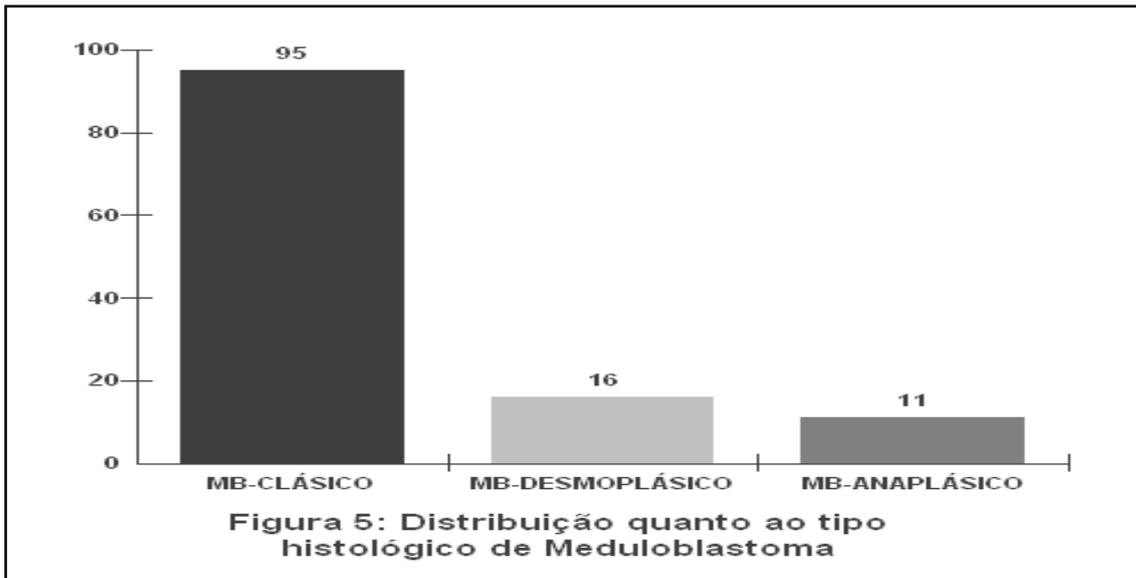
4. RESULTADOS

A população total do estudo foi constituída por 122 pacientes com Meduloblastoma e 122 indivíduos controle. Juntas, as amostras dos pacientes com Meduloblastoma e controles foram compostas por 69 homens e 53 mulheres (M / F proporção = 1,3).

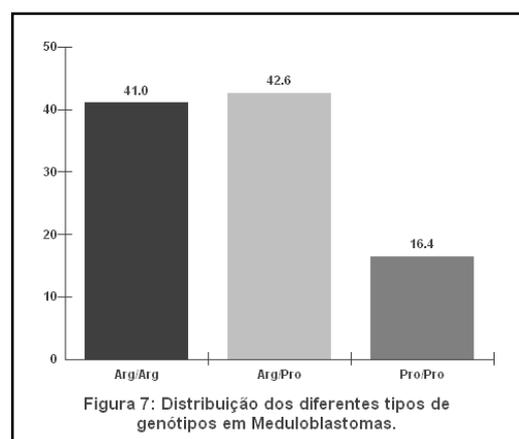
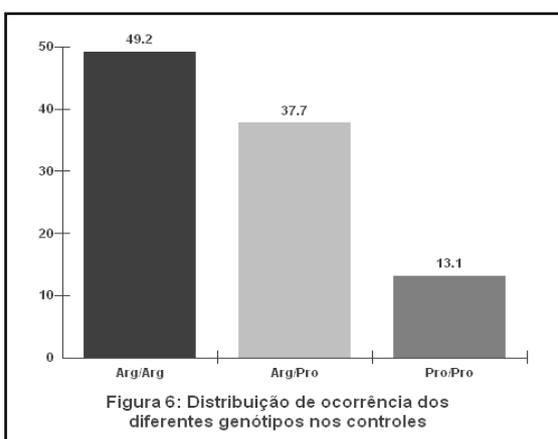


A idade média tanto para os pacientes quanto para o grupo controle foi 11,12 anos (pacientes variaram de 0,17 a 26 anos e controles variaram de 2 a 25 anos). Não houve diferenças significativas no que tange ao gênero e idade entre os grupos ($P > 0,05$).

No que se referem ao subtipo histológico, noventa e cinco (77,87%) pacientes apresentaram Meduloblastoma "clássico", dezesseis (13,11%) apresentaram Meduloblastoma "desmoplásico", e onze (9,02%) apresentaram Meduloblastoma "grandes células / anaplásico". Nenhuma diferença significativa na estratificação por grau do tumor foi observada entre os grupos ($P = 0,121$).



As freqüências genóticas e alélicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos. O SNP *TP53* Arg72Pro e freqüências genóticas não diferiram significativamente entre os grupos caso e controle. Enquanto a freqüência do alelo Pro72 no grupo controle foi de 32,0%, foi de 37,7% no grupo de pacientes ($P = 0,459$). Nos controles, o Arg/Arg, Arg/Pro, e freqüências Pro/Pro genótipo foram 49,2, 37,7 e 13,1%, respectivamente. Nos pacientes, as freqüências genóticas Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro foram de 41, 42,6 e 16,4%, respectivamente ($P = 0,423$). Em comparação com Arg/Arg, que é o genótipo mais comum na população em estudo, tanto o Arg/Pro e genótipos Pro/Pro não influenciam o risco de desenvolvimento de meduloblastoma ($OR = 1,36$, $IC95\% = 0,79-2,34$, $P = 0,339$ para o genótipo Arg/Pro; $OR = 1,50$, $IC95\% = 0,70-3,20$, $P = 0,389$ e para o genótipo Pro/Pro).



O Arg/Pro e Pro/Pro genótipos foram então combinadas por causa da baixa frequência Pro/Pro, e a combinação não influenciou o risco de desenvolver Meduloblastomas (OR = 1,39, IC95% = 0,84-2,31, e P = 0,247).

Tabela 1. Características de pacientes com Meduloblastoma e controles

Variáveis	Casos n = 122 (%)	Controles n = 122 (%)	P-value*	OR (95% CI)	P-value
Genotype					
Arg/Arg	50 (41.0)	60 (49.2)			
Arg/Pro	52 (42.6)	46 (37.7)		1.36 (0.79–2.34)	0.339
Pro/Pro	20 (16.4)	16 (13.1)	0.423	1.50 (0.70–3.20)	0.389
Arg/Pro + Pro/Pro	72 (59.0)	62 (50.8)		1.39 (0.84–2.31)	0.247
Allelotype					
Arg	152 (62.3)	166 (68.0)			
Pro	92 (37.7)	78 (32.0)	0.459	0.78 (0.53–1.13)	0.217

* P-valor foi obtido usando os testes qui-quadrado ou exato de Fisher

Abreviações: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

O período médio de acompanhamento (*follow-up*) de todos os pacientes foi de 62,32 meses (intervalo de 7,23 – 148,93 meses). Ao final do período de seguimento sobreviveram 103 pacientes, sendo o tempo médio de seguimentos destes de 58,87 meses. Para os pacientes que tiveram como desfecho clínico o óbito o tempo médio de seguimento foi de 81,02 meses. As curvas de sobrevida são mostradas abaixo nas Figuras 8a e 8b.

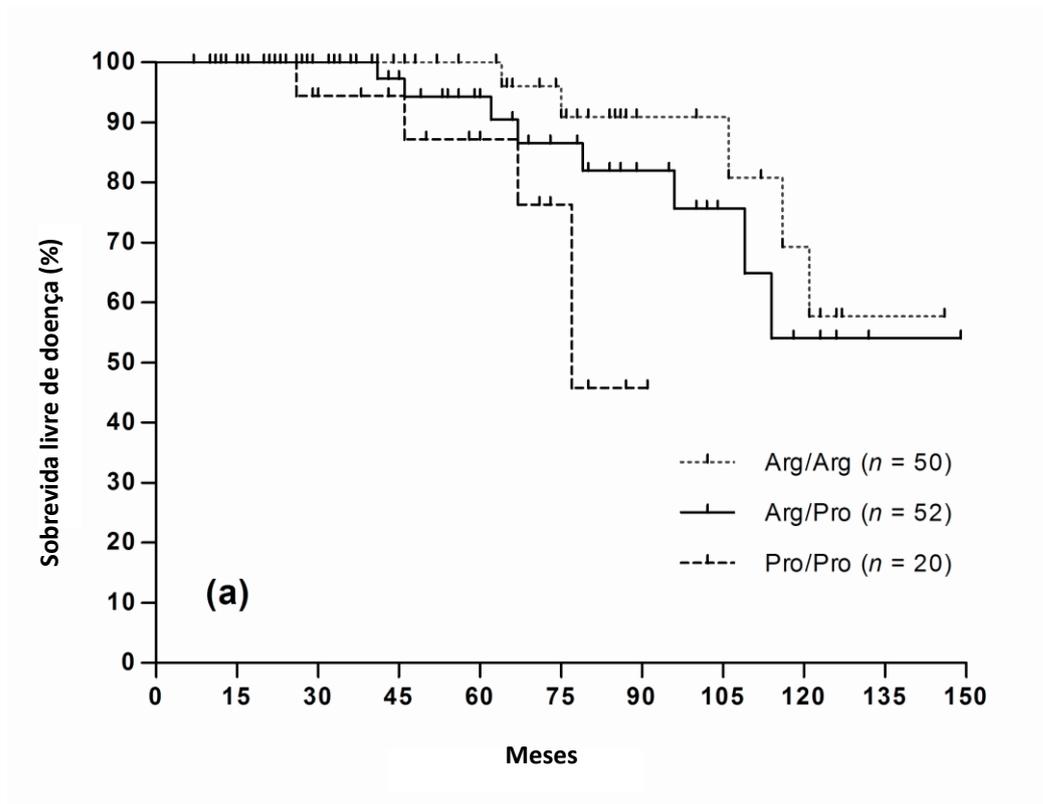


Figura 8a: Curva de sobrevida livre de doença dos pacientes com Meduloblastoma de acordo com os diferentes genótipos.

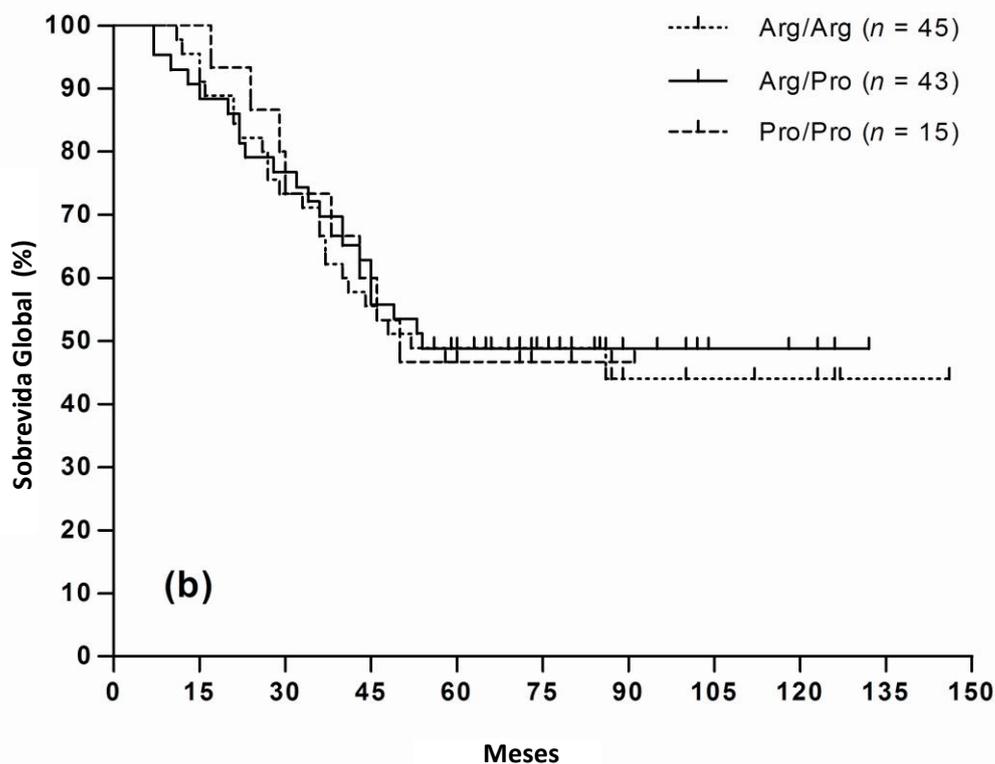


Figura 8b: Curva de sobrevida global dos pacientes com Meduloblastoma estratificados pelos diferentes Genótipos.

Enquanto a sobrevida livre de doença não foi significativamente diferente entre os genótipos TP53 Arg72Pro SNP ($P > 0,05$), o genótipo menos freqüentes Pro/Pro foi associado com uma menor sobrevida global dos pacientes com Meduloblastoma ($P = 0,021$). A análise multivariada demonstrou que idade, sexo, grau histológico e tipo de cirurgia não foram relacionados a maior sobrevida.

5. DISCUSSÃO

O gene TP53 tem um papel central na manutenção da estabilidade genômica, e é um gene supressor tumoral freqüentemente mutado em cânceres humanos (Eberhart et al., 2002).

Estudos recentes têm relacionado mutações somáticas de TP53 com resultados desfavoráveis em casos Meduloblastomas (Tabori et al., 2010). Neste ínterim, é razoável se supor que um SNP no gene também pode ser associado com o risco de desenvolvimento de Meduloblastomas e/ou influenciar no prognóstico.

Em particular, o SNP TP53 Arg72Pro tem atraído considerável atenção de diferentes grupos de pesquisa em função de um papel potencial no desenvolvimento ou influência prognóstica em tumores do Sistema Nervoso, particularmente gliomas (Efeyan et al., 2007; Almeida et al., 2009).

No entanto, o impacto do SNP TP53 Arg72Pro em risco e prognóstico nunca foi avaliada em pacientes com Meduloblastomas. Por esta razão, o objetivo principal deste estudo do tipo caso-controle foi investigar a relação entre esta variação genômica e suscetibilidade a Meduloblastomas em uma população brasileira.

O presente estudo indicou que as freqüências genotípicas e alélicas nos grupos caso e controle foram semelhantes ($P = 0,423$ e $P = 0,459$, respectivamente) e que não se mostrou associação significativa com o risco de desenvolvimento de Meduloblastomas ($OR = 1,48$, $IC\ 95\% = 0,90-2,44$ e $P = 0,156$). Estes resultados sugerem que o SNP TP53 Arg72Pro pode não contribuir significativamente para a susceptibilidade à Meduloblastomas na população brasileira.

Em comparação com dois outros estudos de nosso grupo, que também foram realizados na população brasileira, mas com diferentes tumores, estes resultados foram consistentes com aqueles observados em uma série de gliomas ($P = 0,488$) (Zawlik et al., 2009), mas discordantes daqueles observados para tumores cerebrais extra-axiais (meningiomas e schwannomas) ($OR = 3,23$, $IC95\% = 1,71-6,08$, e $P = 0,003$) (Efeyan et al., 2009).

Estes resultados controversos possivelmente ocorrem em função de diferenças histológicas e de comportamento biológico tumoral. No entanto, em comparação a nível mundial, a heterogeneidade étnica do SNP TP53 Arg72Pro também deve ser considerada. Os brasileiros formam uma das populações mais heterogêneas no mundo devido a cinco séculos de cruzamentos interétnicos de povos dos três continentes, incluindo os colonizadores europeus, principalmente o Português; escravos Africanos; e ameríndios autóctones (Louis et al., 2007).. A citar-se como exemplo, no leste da Eslováquia, Biros et al. não mostrou qualquer associação com este SNP em amostras de astrocitoma ($P = 0,75$). Na Índia, no entanto, Jha et al. relataram que o alelo Pro72 é associado com o risco de glioma ($P = 0,037$).

Parhar et al. sugeriram uma possível associação entre o SNP TP53 Arg72Pro e a suscetibilidade a tumores cerebrais, especialmente astrocitomas de alto grau ($P = 0,002$). No entanto, em pacientes Portugueses, Lima-Ramos et al. não encontraram nenhuma associação significativa entre o SNP TP53 Arg72Pro e tipo histológico glioma ($P > 0,05$). Ao correlacionar a idade e o sexo na França, El Hallani et al. descobriram que o genótipo Pro/Pro é super-representado em pacientes com glioblastomas com menos de 45 anos ($P = 0,002$), o que sugere que o SNP TP53 Arg72Pro é particularmente crítico para a oncogênese em glioblastomas de pacientes jovens. No entanto, esses autores não encontraram uma associação significativa quando se comparam homens e mulheres ($P > 0,05$).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os alelos SNP TP53 Arg72Pro em pacientes com Meduloblastomas, no que se refere a tipo histológico, idade ou sexo ($P > 0,05$).

Com relação ao prognóstico, este foi o primeiro estudo de nosso conhecimento que examinou a relação entre o SNP TP53 Arg72Pro e a sobrevida dos pacientes com Meduloblastomas submetidos à terapia adjuvante.

O genótipo menos freqüente Pro/Pro foi associado com uma menor sobrevida global dos pacientes com Meduloblastoma ($P = 0,021$), fato conflitante com um estudo anterior de Lima-Ramos et.al., que mostrou que pacientes com glioma que

abrigam o alelo Pro72 (Arg/Pro + Pro/Pro) têm uma resposta significativamente melhor terapia adjuvante ($P = 0,027$).

Para adquirir uma comparação melhor dos dados, foi realizada uma análise de sobrevivência com os pacientes Arg/Arg versus Arg/Pro + Pro/Pro. No entanto, os resultados desta análise de sobrevivência não estão em acordo àqueles relatados por Lima-Ramos et. al. ($P = 0,123$) (dados não mostrados). Esses autores argumentam em seu estudo que as células de glioma que abrigam um alelo Pro72 têm uma desvantagem de sobrevivência em condições hipóxicas em comparação com as células que abrigam um alelo Arg72.

Anteriormente, informamos que os genótipos Arg72Pro de TP53 não estão associados com a sobrevida de pacientes com gliomas e tumores extra-axiais do Sistema Nervoso do Brasil ($P > 0,05$) (Zawlik et al., 2009). Esses últimos resultados confirmaram os de El Hallani et al., que estudou uma série de gliomas.

Em um estudo recente, Tabori et al. relataram que os pacientes que têm Meduloblastoma com mutações somáticas TP53 fora do códon 72 não sobrevivem a longo prazo ($P < 0,0001$), o que sugere que mutações em TP53 em pacientes com meduloblastoma têm um papel na resistência tumoral às terapias convencionais, portanto, necessitando de tratamentos alternativos .

Em conclusão, esta é a primeira análise do SNP TP53 Arg72Pro em pacientes com Meduloblastomas. Embora não tenha havido associação entre esta variação genética e o risco de desenvolvimento de Meduloblastomas, o genótipo Pro/Pro foi associado com menor sobrevida global nos pacientes submetidos à terapia adjuvante. No entanto, devido à composição interétnica da população brasileira, estudos futuros com populações maiores de outras partes do mundo, serão essenciais para uma conclusão definitiva da função do Arg72Pro TP53 SNP, na susceptibilidade ao desenvolvimento de Meduloblastomas.

REFERÊNCIAS

Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature genetics*. 2003;34(4):369-76. Epub 2003/08/19.

Almeida LO, Custodio AC, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genetics and molecular research : GMR*. 2009;8(1):8-18. Epub 2009/02/19.

Bartek J, Lukas J. Are all cancer genes equal? *Nature*. 2001;411(6841):1001-2. Epub 2001/06/29.

Biros E, Kalina I, Kohut A, Bogyiova E, Salagovic J, Sulla I. Allelic and haplotype frequencies of the p53 polymorphisms in brain tumor patients. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2002;51(1):59-64. Epub 2002/06/20.

Bonafe M, Barbi C, Storci G, Salvioli S, Capri M, Olivieri F, et al. What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Experimental gerontology*. 2002;37(10-11):1263-71. Epub 2002/12/10.

Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, et al. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*. 1997;14(1):85-94. Epub 1997/01/09.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86. Epub 1999/07/09.

Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet neurology*. 2007;6(12):1073-85. Epub 2007/11/23.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*. 2003;33(3):357-65. Epub 2003/02/05.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*. 1992;1(1):45-9. Epub 1992/04/01.

El Hallani S, Ducray F, Idbaih A, Marie Y, Boisselier B, Colin C, et al. TP53 codon 72 polymorphism is associated with age at onset of glioblastoma. *Neurology*. 2009;72(4):332-6. Epub 2009/01/28.

Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, et al. Histopathologic grading of medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer*. 2002;94(2):552-60. Epub 2002/03/20.

Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*. 1987;238(4824):193-7. Epub 1987/10/09.

Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*. 1997;278(5340):1043-50. Epub 1997/11/14.

Feng Z, Levine AJ. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends in cell biology*. 2010;20(7):427-34. Epub 2010/04/20.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. *Cancer*. 2000;88(12):2887. Epub 2000/06/28.

Gilbertson R. Paediatric embryonic brain tumours. biological and clinical relevance of molecular genetic abnormalities. *European journal of cancer*. 2002;38(5):675-85. Epub 2002/03/28.

Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson AD. Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma. *European journal of cancer*. 1997;33(4):609-15. Epub 1997/04/01.

Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer letters*. 2004;210(2):151-7. Epub 2004/06/09

Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*. 1996;274(5289):1001-5. Epub 1996/11/08.

Gottardo NG, Gajjar A. Current therapy for medulloblastoma. Current treatment options in neurology. 2006;8(4):319-34. Epub 2006/09/01.

Grotzer MA, Janss AJ, Phillips PC, Trojanowski JQ. Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klinische Padiatrie*. 2000;212(4):196-9. Epub 2000/09/20.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9. Epub 1997/05/15.

Hishida A, Matsuo K, Tajima K, Ogura M, Kagami Y, Taji H, et al. Polymorphisms of p53 Arg72Pro, p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p21 Ser31Arg and the risk of non-Hodgkin's lymphoma in Japanese. *Leukemia & lymphoma*. 2004;45(5):957-64. Epub 2004/08/05.

Ho-Pun-Cheung A, Choblet S, Colineau T, Abaibou H, Zsoldos D, Brengel-Pesce K, et al. Detection of single nucleotide polymorphisms by minisequencing on a polypyrrole DNA chip designed for medical diagnosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(3):304-13. Epub 2006/02/18.

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*. 1995;267(5203):1498-502. Epub 1995/03/10.

Jin X, Wu X, Roth JA, Amos CI, King TM, Branch C, et al. Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. *Carcinogenesis*. 1995;16(9):2205-8. Epub 1995/09/01.

Jha P, Jha P, Pathak P, Chosdol K, Suri V, Sharma MC, et al. TP53 polymorphisms in gliomas from Indian patients: Study of codon 72 genotype, rs1642785, rs1800370 and 16 base pair insertion in intron-3. *Experimental and molecular pathology*. 2011;90(2):167-72. Epub 2010/12/01.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis*. 1993;14(6):1085-9. Epub 1993/06/01.

Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(23):10914-21. Epub 1993/12/01.

Kumar R, Achari G, Banerjee D, Chhabra DK. Uncommon presentation of medulloblastoma. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2001;17(9):538-42; discussion 43. Epub 2001/10/05.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6. Epub 1992/07/02.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31. Epub 1997/02/07.

Lima-Ramos V, Pacheco-Figueiredo L, Costa S, Pardal F, Silva A, Amorim J, et al. TP53 codon 72 polymorphism in susceptibility, overall survival, and adjuvant therapy response of gliomas. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2008;180(1):14-9. Epub 2007/12/11.

Lin RC, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obesity research*. 2003;11(6):802-8. Epub 2003/06/14.

Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer cell*. 2002;1(2):125-8. Epub 2002/06/28.

Malkin D. Germline p53 gene mutations and cancer--Pandora's box or open sesame? *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(5):326-8. Epub 1994/03/02.

Malkin D, Jolly KW, Barbier N, Look AT, Friend SH, Gebhardt MC, et al. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *The New England journal of medicine*. 1992;326(20):1309-15. Epub 1992/05/14.

Nelson M, Diebler C, Forbes WS. Paediatric medulloblastoma: atypical CT features at presentation in the SIOP II trial. *Neuroradiology*. 1991;33(2):140-2. Epub 1991/01/01.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2005;25(1):1-7. Epub 2005/04/13.

Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002;10(1):6-16. Epub 2002/03/16.

Williams BL, Brawn JD, Paige KN. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular ecology*. 2003;12(1):11-20. Epub 2002/12/21.

Paige AJ. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003;60(10):2147-63. Epub 2003/11/18.

Packer RJ, Rood BR, MacDonald TJ. Medulloblastoma: present concepts of stratification into risk groups. *Pediatric neurosurgery*. 2003;39(2):60-7. Epub 2003/07/08.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):177-82. Epub 2003/01/02.

Parhar P, Ezer R, Shao Y, Allen JC, Miller DC, Newcomb EW. Possible association of p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to adult and pediatric high-grade astrocytomas. *Brain research Molecular brain research*. 2005;137(1-2):98-103. Epub 2005/06/14.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation*. 2007;28(6):622-9. Epub 2007/02/22.

Pfister S, Remke M, Benner A, Mendrzyk F, Toedt G, Felsberg J, et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(10):1627-36. Epub 2009/03/04.

Pizem J, Cort A, Zadavec-Zaletel L, Popovic M. Survivin is a negative prognostic marker in medulloblastoma. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2005;31(4):422-8. Epub 2005/07/13.

Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S, et al. A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(22):7613-20. Epub 2004/12/01.

Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing research reviews*. 2003;2(3):245-61. Epub 2003/05/03.

Robertson PL, Muraszko KM, Holmes EJ, Sposto R, Packer RJ, Gajjar A, et al. Incidence and severity of postoperative cerebellar mutism syndrome in children with medulloblastoma: a prospective study by the Children's Oncology Group. *Journal of neurosurgery*. 2006;105(6 Suppl):444-51. Epub 2006/12/23.

Rosemberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2005;21(11):940-4. Epub 2005/07/27.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33. Epub 2001/03/10.

Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutation research*. 2000;462(2-3):235-46. Epub 2000/04/18.

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *Journal of molecular biology*. 1996;260(5):623-37. Epub 1996/08/02.

Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(11):507-12. Epub 2001/11/02.

Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(12):1924-31. Epub 2006/03/29.

Tabori U, Baskin B, Shago M, Alon N, Taylor MD, Ray PN, et al. Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(8):1345-50. Epub 2010/02/10.

Wang P, Guo X, Jia X, Li S, Xiao X, Zhang Q. Novel mutations of the PAX6 gene identified in Chinese patients with aniridia. *Molecular vision*. 2006;12:644-8. Epub 2006/06/21.

Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between

TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas. *Brain pathology*. 2009;19(2):188-94. Epub 2008/05/09.

Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, et al. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(3):832-45. Epub 1999/03/10.