



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**SCREENING DE POLIMORFISMOS E ANÁLISE  
COMPARATIVA DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO  
DE COPIAS DO GENE *TP53* EM GLIOMAS**

**JOSÉ REGINALDO NASCIMENTO BRITO**

BELÉM- PARÁ

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**JOSÉ REGINALDO NASCIMENTO BRITO**

***SCREENING* DE POLIMORFISMOS E ANÁLISE  
COMPARATIVA DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO  
DE COPIAS DO GENE *TP53* EM GLIOMAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo H. C. de Oliveira

BELÉM- PARÁ

2012

## AGRADECIMENTOS

O primeiro e sincero agradecimento vai para o grupo do Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Evandro Chagas (SAMAM), em particular ao Prof. Dr. Edivaldo Herculano de Oliveira, pelo estímulo, orientações e, sobretudo, muita paciência. Ainda de modo especial ao Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo por dividir seu precioso conhecimento em genética molecular, aos Mestres Fabio da Silva e Luciana Quintana por suas valiosas contribuições assim como ao Michel Platini de Souza.

Agradeço imensamente ao Hospital Ophir Loyola e sua Equipe de Neurocirurgiões, em especial ao Dr. Douglas Serra Vasconcelos, parceiro desde o início do projeto, por terem cedido material colhido em seus procedimentos, como também aos Residentes em Neurocirurgia pelo entendimento da importância de se estudar patologias tão freqüentes e tão mal compreendidas.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará e ao Programa CAPS/CNPQ.

Agradeço aos meus Pais por sempre estarem ao meu lado, à minha Esposa e meus filhos Paulo Vitor e Pedro Henrique, pois sempre são a minha inspiração e a Deus pela vida, saúde e sabedoria.

## RESUMO

As neoplasias astrocitárias correspondem a cerca de (60%) dos tumores do sistema nervoso central, sendo que atingem principalmente adultos numa fase altamente produtiva da vida e com evoluções pouco satisfatórias apesar dos tratamentos disponíveis. Um melhor entendimento de sua biologia molecular se faz necessário na tentativa de compreender sua evolução e melhor planejar e tratamento, assim como na busca de novas terapias. Este trabalho teve como objetivo analisar modificações no gene *TP53* com relação ao número de cópias e polimorfismos nos éxons de 4 a 11, considerados *hotspots* para mutações. Um total de 14 amostras de diferentes graus de malignidade foram analisadas por experimentos de FISH interfásico com sondas loco-específicas do gene *TP53* e centroméricas para o cromossomo 17, e também pela técnica de SSCP para o *screening* de polimorfismos dos éxons 4-10. Foram comparados os resultados obtidos entre tumores de graus I e II (benignos) com aqueles de graus III e IV (malignos). Os resultados referentes às sondas loco-específicas (gene *TP53* e centrômero do cromossomo 17) mostraram que a ocorrência de deleções ou ampliações, apesar de importantes estatisticamente em relação aos núcleos com número de marcações normais, não apresentou correlação com idade, sexo ou grau de malignação. Entretanto, as alterações foram encontradas com maior frequência nos paciente portadores de astrocitomas de grau intermediário (III). A técnica de SSCP revelou polimorfismos nos éxons 5, 7 e 10, e apesar de não estarem associados à malignidade tumoral, os casos polimórficos corresponderam aos pacientes com menor sobrevida após tratamentos, sugerindo, uma associação entre mutações nesses éxons e uma maior agressividade tumoral.

## ABSTRACT

Astrocytic neoplasms comprises around 60% of the Central Nervous System tumors, affecting mainly adults in a highly productive phase of life, and showing poor prognosis despite of the available treatments. A better knowledge of the molecular biology of this group of tumors is necessary to understand their evolution and to plan the treatment in a better way, as well as to develop new therapies. Hence, this study had the aim the analysis of modifications of gene *TP53* related to changes in the number of copies and the presence of polymorphisms in exons 4 to 11, considered hotspots for mutations. A total of 14 samples of different malignant grades were analyzed by interphasic FISH using locus-specific probes for gene *TP53* and centromeric for chromosome 17, and by SSCP for screening polymorphism in exons 4 to 11. The results were compared between tumors with grades I and II (benign) to those with grades III and IV (malign). The results concerning the locus specific probes (gene *TP53* and centromere of chromosome 17) showed that the occurrence of deletions and amplifications were statistically important when compared to nuclei with normal copy number. However, these alterations were not related to the age, sex or malignancy. On the other hand, these alterations were found more frequently in patients with tumors with intermediate grades (III). SSCP experiments revealed polymorphisms in exons 5, 7 and 10, and although they were not related to the malignancy of tumors, the samples with polymorphism corresponded to the patients with shorter survival after treatment, suggesting a relation between the mutations in these exons and higher aggressively tumors.

**SUMÁRIO**

1. Introdução	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Genética do Câncer	2
1.3 Epigenética em Câncer	3
1.4 Classificação dos tumores do SNC	5
1.5 Gliomas	7
1.5.1 Sistema de graduação dos Gliomas	8
1.5.2 Astrocitomas difusos	10
1.5.3 Astrocitomas Anaplásicos	12
1.5.4 Glioblastomas Multiformes	14
1.6 Curva de Sobrevida dos Gliomas	17
1.7 Vias genéticas de progressão dos Gliomas	18
1.8 Papel da mutação do gene <i>TP53</i> , na evolução dos Gliomas	23
1.9 Objetivos	30
1.9.1 Objetivos Gerais	30
1.9.2 Objetivos Específicos	30
2. Material e Métodos	31
2.1 Amostras	31
2.2 Coleta de Amostras	32
2.3 Obtenção de material interfásico	32
2.4 Preparação de lâminas e material pré-hibridização	33
2.5 Experimentos de hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (FISH) interfásico	34
2.5.1 Sondas	34
2.5.2 Hibridização	34
2.5.3 Lavagem de estrigência	35
2.5.4 Análises do experimento de FISH interfásico	35
2.6 Extração do DNA do tecido tumoral	36
2.7 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	37
2.8 Análises de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)	37
3. Resultados	39
3.1 Experimentos de Hibridização <i>in situ</i>	39
3.2 Análises estatísticas	40
3.3 Experimentos de SSCP	45
4. Discussão	48
5. Conclusão	54
6. Referências	55
Anexos	67

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 01- Imagem de Ressonância Magnética de encéfalo revelando uma lesão infiltrativa fronto-temporal direita, compatível com astrocitoma de baixo grau (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>)

Figura 02 - Astrocitoma fibrilar é caracterizado por aumento de celularidade, com uma população monomorfa de células infiltrativas (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas> )

Figura 03- Astrocitoma anaplasico é caracterizada por atipia nuclear e mitoses (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>).

Figura 04- Ressonancia Magnetica de encéfalo revelando lesão heterogênea captante de contraste frontal esquerda, compatível com astrocitoma de alto de grau de malignidade (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>)

Figura 05 - Glioblastoma é caracterizado por necrose e células em pseudopaliçada, além de proliferação vascular (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>)

Figura 06: Gráfico mostrando a sobrevida livre de progressão da doença. Sobrevida (A) e padrão de transformação maligna (B) (Fonte: Peraud *et al.*, 2002).

Figura 07: Vias genéticas de progressão dos gliomas. Os cromossomos inativados e genes deletados são representados por “-”. Genes amplificados são representados por “+”. AII, astrocitomas grau II; AIII, astrocitomas grau III; CDK, ciclino quinase dependente; EGFR, receptor do fator de crescimento da epiderme; GBMO, glioblastoma com componente oligodendroglial; OII, oligodendroglioma grau II; OIII, oligodendroglioma grau III; pGBM, glioblastoma multiforme primário; ScGBM, glioblastoma multiforme. Secundário (Fonte: Sanson *et al.* 2004).

Figura 08: Vias genéticas dos glioblastomas primários “de novo” e secundários. LOH 10q é freqüente em ambas as vias. Mutações da *TP53* são alterações freqüentes e precoces nos glioblastomas secundários. OHGAKI E KLEIHUES, 2007

Figura 09: Imagem representativa de experimentos de FISH utilizando sondas específicas para o locus *TP53* (vermelho) e o centrômero do cromossomo 17 (verde). Ambos os núcleos e a metáfase apresentaram número normal de marcações: duas do *TP53* e duas do centrômero do cromossomo 17.



Figura 10: Imagem representativa de experimentos de FISH utilizando sondas específicas para o locus *TP53* (vermelho) e o centrômero do cromossomo 17 (verde), mostrando núcleos normais, com deleções do cromossomo 17 ou apenas do *TP53*, e trissomia do 17.

Figura 11: Gráfico mostrando a relação entre os graus de malignidade e o sexo do paciente.

Figura 12: Análise de Variância comparando as médias de células normais de acordo com o grau de malignidade.

Figura 13: Análise de Variância comparando as médias de células com alterações de acordo com o grau de malignidade

Figura 14: Análise de Variância da média de células com deleções do *TP53* de acordo com o grau de malignidade.

Figura 15: Análise de Variância da média de células com ampliações do *TP53* de acordo com o grau de malignidade.

Figura 16: Gel de poliacrilamida exemplificando um éxon sem alterações em nenhuma das amostras (éxon 4). As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV.

Figura 17: Gel de poliacrilamida do éxon 5. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. As amostras CSN014, CSN031 e CSN101 apresentaram alterações no padrão de bandas (setas).

Figura 18: Gel de poliacrilamida do éxon 10. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. O padrão de três bandas foi observado em todas as amostras, com exceção da CSN014 (seta) que apresentou uma banda extra.

Figura 19: Gel de poliacrilamida do éxon 10. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. O padrão de três bandas foi observado em todas as amostras, com exceção da CSN014 (seta) que apresentou uma banda extra.

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Amostras de gliomas utilizadas nesse estudo.

Tabela II: Sequência dos *primers* forward e reverse utilizados na amplificação dos éxons 4, 5, 7, 8, 9 e 10 por PCR.

Tabela III: Ordenação dos dados obtidos do FISH interfásico para análises estatísticas

Tabela IV: Resultado das análises por SSCP (amostras CSN005, CSN114 e CSN209 não foram incluídos na análise por problemas técnicos).

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

De um modo geral, o câncer tem a sua origem associada ao acúmulo de alterações genéticas específicas dentro das células. Estas alterações podem causar uma proliferação celular de maneira inapropriada, podendo resultar em características de malignidade, como a perda da diferenciação característica do tecido de origem, capacidade de invadir tecidos vizinhos, de formar metástases e adquirir resistência a terapias anti-neoplásicas (WEN, 1995).

As alterações genômicas da célula neoplásica provavelmente permitem um crescimento autônomo e agressivo que são transmissíveis hereditariamente na multiplicação celular, embora possam variar de uma célula para outra na mesma neoplasia, de uma neoplasia para outra no mesmo hospedeiro e em neoplasia diferentes em hospedeiros diferentes (SIQUEIRA, 1998).

Todas as células apresentam vários genes que controlam seu crescimento e proliferação, alguns desses genes podem apresentar mutações que foram herdadas pelo portador, outros acumulam mutações ao longo do tempo (erros intrínsecos de replicação ou devido à exposição a agentes carcinogênicos). Assim, o controle de proliferação deteriora, e a célula adquire o fenótipo neoplásico. Dessa forma, a origem do câncer é explicada pelo modelo linear, que vem sendo utilizado nas últimas décadas como modelo padrão de carcinogênese (ARENDIS, 2000). Entretanto, a teoria linear parece não sustentar-se por si só, já que a ocorrência de neoplasias seria dependente de mecanismos seletivos resultantes da interação entre as alterações cromossômicas e/ou nucleotídicas e o meio ambiente (BRIVIK, 2005).

## 1.2 GENÉTICA DO CÂNCER

O aumento da incidência do câncer com a idade é tomado como evidência de que há vários passos limitantes no desenvolvimento desta doença; esses passos envolveriam modificações genéticas e/ou epigenéticas. As células modificadas sofrem uma expansão seletiva, ou seja, apenas daquelas portadoras de modificações que trazem vantagens na proliferação. Dessa forma, o câncer poderia ser considerado um processo evolutivo envolvendo tanto mudanças genéticas, epigenéticas, bem como a seleção (BECKMAN E LOEB, 2005).

Foi estabelecido também que a maioria dos cânceres é caracterizada por cariótipos anormais, seja por rearranjos numéricos, ou por rearranjos estruturais, evidenciando assim um tipo de instabilidade. Esta hipótese foi testada em 1997, quando a taxa de surgimento de rearranjos cromossômicos em linhagens de células neoplásicas foi medida, e os dados confirmaram uma instabilidade genética também no nível dos cromossomos (LENGAUER *ET AL.*, 1998). A instabilidade cromossômica (CIN, de *Chromosomal Instability*) é característica definida da maioria dos tumores humanos. Mutações em genes da CIN aumentam as chances de ocorrência de perdas ou ganhos de cromossomos ou segmentos cromossômicos durante a divisão celular, tendo como consequência o surgimento de cariótipos anormais (NOWAK, 2002).

Defeitos na segregação cromossômica, na dinâmica centrossômica, nas atividades do telômero, nas respostas a danos no DNA, problemas nos pontos de checagem do ciclo celular, entre outras, podem ter um papel importante no surgimento e manutenção da CIN, que é o primeiro impacto observado em células cancerosas. A CIN é uma das causas principais de quimio-resistência

de células. Dessa forma, um entendimento completo das bases biológicas da CIN é essencial para uma avaliação diagnóstica e prognóstica efetiva e intervenção terapêutica do câncer (GOLLIN, 2005).

### 1.3 EPIGENÉTICA EM CÂNCER

As causas das neoplasias são muito amplas e diversas e incluem desde a exposição a fatores externos ou ambientais, como por exemplo, a dieta e o hábito de fumar (ROTMAN *ET AL.*, 2001; TAIOLI, 2002), como também sucessivos eventos genéticos e/ou epigenéticos. A epigenética adquiriu um papel importante nas pesquisas, tanto biológico quanto no estudo de tumores, pois se sabe que ela desempenha um papel importante e que afeta a biologia do câncer (JONES E BAYLIN, 2002; NEUMEISTER *ET AL.*, 2002; YUASA, 2002), mas também age na latência viral (TAO *ET AL.*, 1999; ROBERTSONEWOLFE, 2000; TIERNEY *ET AL.*, 2000; TAKACS *ET AL.*, 2001), na atividade dos elementos móveis (HAGAN E RUDIN, 2002) e está sendo estudada na terapia de genes somáticos (HOWELL *ET AL.*, 2001; NELSON *ET AL.*, 2001; RIDEOUT *ET AL.*, 2001), na clonagem, nas tecnologias transgênicas, na senescência, no *imprinting* genômico (FEINBERG, 2001; ISSA, 2002; NEUMEISTER *ET AL.*, 2002) e nas anormalidades do desenvolvimento (FEINBERG, 2001).

A definição de efeito epigenético varia entre os investigadores. Uma das definições descreve epigenética como o estudo da herdabilidade mitótica, na qual a mudança na expressão de um gene não é causada por alteração na seqüência do DNA (LENGAUER E ISSA, 1998). Outra definição é aquela que diz que a epigenética concede uma herança de informação com base na expressão diferencial de um gene, considerando que o foco da genética é na

herança da informação contida na seqüência gênica (JONES E LAIRD, 1999). Os mecanismos de herança por modificações epigenéticas necessitam ainda de mais estudos para que sejam identificados. Entretanto, independentemente da definição usada, a diferença mais importante entre um mecanismo epigenético e um mecanismo genético, é que mudanças epigenéticas podem ser revertidas por agentes químicos (VERMA E SRIVASTAVA, 2002).

Os dois principais tipos de regulação da expressão gênica por epigenética são: a desacetilação das histonas, que causa uma mudança na estrutura da cromatina e a metilação da região promotora do gene (BURZYNKI, 2003). A metilação é necessária para o desenvolvimento normal das células, e uma metilação aberrante confere uma vantagem de crescimento seletiva que pode resultar em crescimento ou desenvolvimento do câncer (HU ET AL., 2000). As regiões promotoras de muitos genes podem ser metiladas em áreas chamada ilhas CpG (regiões ricas em citosina e guanina); os genes que são altamente metilados (hipermetilados) sofrem um “silenciamento”, o que significa que eles não podem ser transcritos (VERMA E SRIVASTAVA, 2002; BURZYNKI, 2003).

Resumidamente, podemos dizer que dentro da célula cancerosa observamos a ocorrência de vários eventos que incluem: a herança ou aquisição de defeitos no mecanismo de reparo do DNA e nos elementos ou fatores de transcrição, ausência ou a não obediência aos *checkpoints* do ciclo celular (EVAN E VOUSDEN, 2001), e possivelmente, defeitos na regulação dos eventos epigenéticos (BAYLIN E HERMAN, 2000). A produção e destruição de mutágenos endógenos, como os radicais livres, também podem afetar a probabilidade dos eventos mutacionais e também podem ser modificados pela

variação genética (OLDEN E WILSON, 2000; PETO, 2001; PETO E HOULSTON, 2001).

#### **1.4 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)**

Não existem métodos absolutos para o diagnóstico e classificação do grau de malignidade dos tumores do sistema nervoso. Com o advento de conhecimentos da biologia molecular e estudos citogenéticos, pesquisadores incorporaram alterações cromossômicas e/ou genes específicos na tentativa de melhorar a classificação (FRANKS E TEICH, 1990).

As primeiras tentativas de classificar estas neoplasias agruparam tumores de morfologia similar e definiram seus comportamentos, em termos de crescimento, como benignos ou malignos (RINGERTZ, 1950 *apud* SIQUEIRA, 1998).

As bases para os conceitos atuais da classificação foram lançadas por VIRCHOW em 1863 (*apud* SIQUEIRA, 1998), que descreveu os elementos de sustentação do sistema nervoso, denominados de neuroglia e deu enfoque citológico à classificação. Várias tentativas têm sido feitas para classificar estes tumores de forma que haja um consenso mundial.

A primeira tentativa de classificar os tumores do SNC foi editada por ZULCH e publicada em 1979. A segunda reflete avanços através da introdução da imunohistoquímica, editada por KLEIHUES *et al* (1993 *apud* LOUISET AL., 2007). A terceira editada por KLEIHUES E CAVENEE, publicada em 2000, quando foi incorporado o perfil genético. Na quarta edição, 25 patologistas e

geneticistas reunidos no *Germany Cancer Research* em Heidelberg, em Novembro de 2006, contribuíram para a classificação atual (LOUIS *ET AL.*, 2007).

As neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC) afetam uma em cada 10.000 pessoas em todo mundo, sendo que destes cerca de 24 mil tumores são primários do SNC, e um número igual de tumores metastáticos são diagnosticados nos EUA anualmente, admitindo-se uma população de 300 milhões de habitantes (CARR *ET AL.*, 2006). Esta doença corresponde a cerca de 3% de todos os tipos de câncer na população brasileira e 3,3% na população paraense, sendo que apesar de não representar uma das mais freqüentes, sem dúvidas é uma das principais causas de morbi-mortalidade (INCA, 2009).

Existe um aumento crescente na freqüência dos tumores do SNC, o que talvez se deva à melhora diagnóstica, com métodos cada vez mais sofisticados e precisos. Com isso, tem-se aumentado o número de pacientes submetidos a tratamentos: cirúrgicos, radio e quimioterápicos (SALCMAN, 1998 e ERWING *ET AL.*, 2010).

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

Entre todos os tumores do SNC, um dos mais importantes é o grupo dos gliomas, que são responsáveis pela forma de apresentação mais freqüente



entre os tumores desta região (SIQUEIRA, 1998, ERWING *ET AL.*, 2010). Dentre todos os gliomas, os astrocitomas merecem destaque em função de representarem os tipos mais freqüentes e os que causam maior índice de morbi-mortalidade (YOUMANS, 1980 e KLEIHUES *ET AL.*, 2000).

## **1.5 GLIOMAS**

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

Formam um grupo de tumores histologicamente heterogêneo que se originam no encéfalo através da desdiferenciação ou desenvolvimento anormal de células não-neuronais. São fundamentalmente de linhagem astrocítica (astrocitomas), oligodendroglial (oligodendrogliomas) ou ependimária (ependimomas), as quais têm características clínicas, histopatológicas e genéticas distintas (YOUMANS, 1980, SIQUEIRA, 1998, MARC-SANSON *ET AL.*, 2004) .

### **1.5.1 Sistema de graduação dos Gliomas**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), podemos classificar os gliomas em graus, de I a IV. O que realmente parece diferenciar estes grupos é o tempo de sobrevida a partir do início dos sintomas, diagnóstico e tratamento inicial (KLEIHUES *ET AL.*, 2002).

A graduação histológica tem papel fundamental no conhecimento do comportamento tumoral, sendo fundamental na escolha de terapias adjuvantes como radioterapia e protocolos de quimioterapias. Esta graduação inclui uma série de tumores em escala de malignidade (LOUIS *ET AL*, 2007).

- **Grau I:** São aplicadas a tumores de baixo potencial proliferativo, sendo realmente os únicos benignos ou de baixo grau, pois quando tratados de forma radical a sobrevida sem tumor é muito boa (geralmente contada em anos), podendo até mesmo ser curados. Fazem parte desta categoria os astrocitomas pilocíticos e astrocitomas subependimários.
- **Grau II:** São de baixa atividade proliferativa, entretanto infiltrativos. Correspondem aos astrocitomas fibrilares ou gliomas difusos, os quais são bem diferenciados e têm características morfológicas de benignidade, com uma história natural que prevê uma evolução para os graus mais avançados, apesar dos tratamentos realizados. Manifestam-se em hemisférios cerebrais de adultos jovens e que apesar dos tratamentos disponíveis têm uma média de sobrevida de 5 anos.
- **Grau III:** São reservados para aqueles onde já há alguma evidência de malignidade. São os astrocitomas anaplásicos, onde há aumento da celularidade, atipia nuclear, pleomorfismo e atividade mitótica como características importantes. Têm um comportamento agressivo intermediário com uma média de sobrevida de 2 a 3 anos.
- **Grau IV:** Correspondem aos malignos. São os glioblastomas multiformes, onde existe uma anarquia histológica com aparecimento de microproliferação vascular e/ou necrose, e têm o pior prognóstico entre todos os gliomas . Manifestam-se em pacientes numa faixa etária mais

avançada, com média de idade de 55 anos, e com um curso clínico curto, média de 12 meses de sobrevida apesar dos diversos tratamentos empregados.

Segundo SALCMAN(1996) é difícil obter informações fidedignas sobre a história natural dos gliomas considerados de baixo grau de malignidade; em consequência, tem sido igualmente difícil formular recomendações terapêuticas precisas para pacientes portadores destes tumores. O comportamento clínico dos gliomas de baixo grau é determinado pela idade do paciente e localização do tumor (área de maior ou menor eloqüência). A média de sobrevida em uma série de 38 pacientes adultos com astrocitomas de baixo grau, tratados, foi de 46 meses, e apenas 24% sobreviveram mais que 5 anos, revelando que o caráter benigno é relativo(SIQUEIRA, 1998).

Os gliomas malignos graus III e IV (anaplásicos e glioblastomas) são os tumores primários mais freqüentes do sistema nervoso em adultos e representam causa importante de morbidade e mortalidade na prática neurológica. Gliomas de alto grau de malignidade menos comuns incluem as variedades anaplásicas de oligodendrogliomas, ependimomas, gangliogliomas e outros tumores de células mistas (SALCMAN, 1991, SANSON *ET AL.*, 2004).

Estes pacientes em geral são acometidos pelo glioma na fase mais produtiva de sua vida; a deterioração freqüente das faculdades mentais e uma alta taxa de casos fatais contribuem para o grande impacto pessoal e social destes pacientes (SIQUEIRA, 1998). A sobrevida destes pacientes é fortemente condicionada a vários fatores prognósticos, cujos mais importantes são: idade, índice de Karnofsky (escala que mede a capacidade do paciente de ser auto-

suficiente, variando entre 30 e 100, sendo que este último valor representa a normalidade) e grau de ressecção do tumor. Quanto mais velho, mais debilitado e menor grau de ressecção, pior o prognóstico, e mais curta será sua sobrevida (SALCMAN, 1990, SANSON *ET AL.*, 2004).

### **1.5.2 Astrocitomas Difusos**

Correspondem ao grau II ou baixo grau. São caracterizados por alto grau de diferenciação celular, crescimento lento e infiltração difusa em estruturas cerebrais vizinhas (figura 01). Representam 10 a 15% dos tumores astrocíticos cerebrais, tendo um pico de incidência entre 30 e 40 anos, podendo estar localizado em qualquer região cerebral, mas preferencialmente em região frontal e temporal. As crises convulsivas são a forma mais comum de apresentação inicial, associado ou não a sintomas neurológicos focais do início a alguns meses antes do diagnóstico. Em função de sua natureza infiltrativa causam uma distorção e não destruição de tecidos vizinhos (KLEIHUS *ET AL.*, 2002).

São compostos por astrócitos fibrilares ou gemistocíticos bem diferenciados. A celularidade é apenas moderadamente aumentada com ocasional atipia celular, sem atividade mitótica evidente, necrose e proliferação microvascular. A variante histológica mais freqüente é a forma fibrilar, sendo que a ocorrência ocasional ou regional de gemistócito não invalida o diagnóstico de astrocitoma fibrilar (figura 02). A variante gemistocítica é caracterizada pela presença substancial de gemistócitos, em mais de 20% das células tumorais, entretanto a média é de 35%. Embora esta variante tenha uma predisposição maior para desenvolver glioblastoma anaplásico, não se

justifica ser classificado como astrocitoma anaplásico. A variante protoplásmica é rara, e tem uma história clínica de crises convulsivas de longa data (KLEIHUES *ET AL.*, 2002).

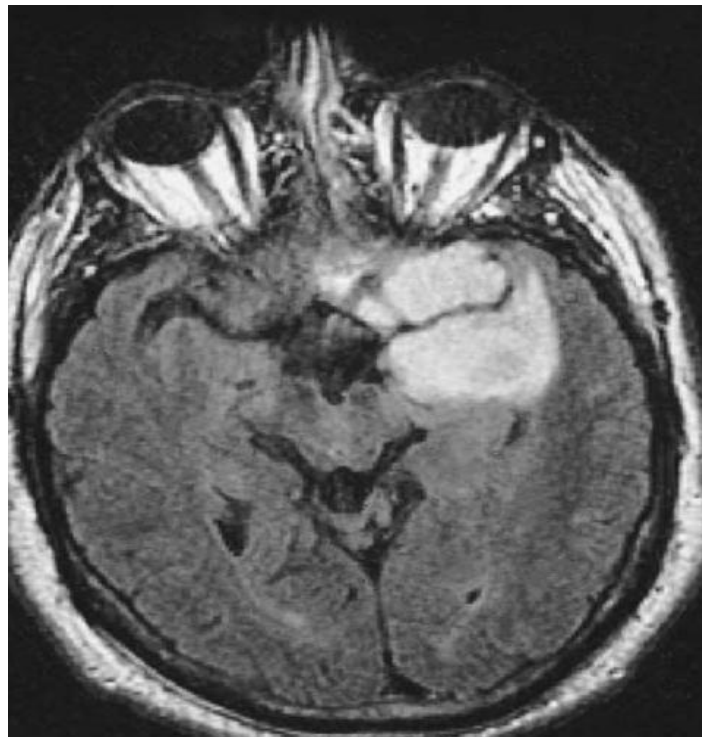


Figura 01- Imagem de Ressonância Magnética de encéfalo revelando uma lesão infiltrativa fronto-temporal direita, compatível com astrocitoma de baixo grau (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>).

Dentre as alterações moleculares, as mutações do *TP53* têm sido relacionadas em mais de 60%, sendo que em mais de 80% na variante gemistocítica. Durante o processo de malignização a frequência da mutação do *TP53* não parece aumentar significativamente, indicando ser esta alteração um evento precoce em cerca de 90%. Outras alterações genéticas: aumento da expressão do PDGFR, ganho do cromossomo 7q e amplificação do 8q, perda da heterozigose no 10p e 22q (ICHIMURA *ET AL.*, 1998).

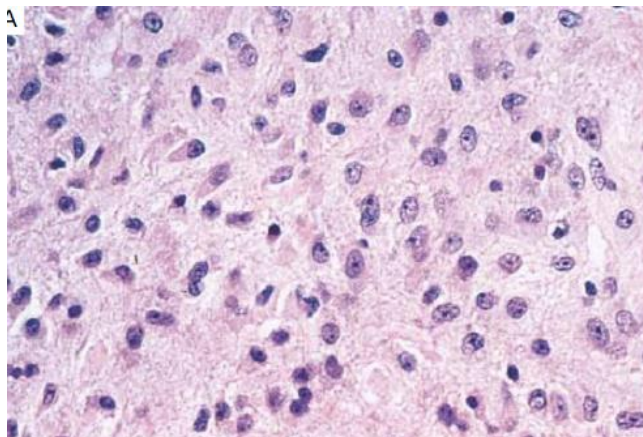


Figura 02 - Astrocitoma fibrilar é caracterizado por aumento de celularidade, com uma população monomorfa de células infiltrativas (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>).

A média de sobrevida após ressecção cirúrgica é de 5 anos, variando muito em função de localização encefálica. A progressão para glioblastoma multiforme tende ocorrer numa média de tempo de 4 a 5 anos. Parece que quando a mutação do *TP53* é encontrada na primeira biópsia, um longo período de sobrevida é esperado, se não houver adicionais alterações genéticas, semelhante à perda da heterozigose no 10 e 19q (WATANABE *ET AL.*, 1987). No estudo de CHOZIEK *ET AL.* (1994), a imunorreatividade para proteína TP53 em astrocitomas difuso foi associada a um período mais curto de sobrevida.

### 1.5.3 Astrocitomas Anaplásicos

Podem surgir como evolução dos de baixo grau, ou aparecer como lesão inicial. Têm uma tendência natural para progressão para glioblastoma. A idade média de aparecimento é de 41 anos, maior que a idade média dos de baixo grau que é de 31 anos. Mulheres são mais afetadas que homens (1,8:1). Não é raro estes tumores serem diagnosticados após poucas semanas de sintomas neurológicos, sem precedentes de astrocitomas grau II (KLEIHUESE *ET AL.*, 2002).

A principal característica histopatológica é o aumento da celularidade, com atipia nuclear e marcada atividade mitótica (figura 03). Células gemistocíticas são freqüentemente encontradas. De um ponto de vista clínico, morfológico e genético, esse tipo de tumor constitui um estágio intermediário na via de progressão tumoral. Apresenta uma alta freqüência de mutações no gene *TP53*, similar aos tumores grau II. Vários estudos demonstraram que em mais de 90% dos casos a mutação do gene *TP53* esta presente nos casos onde estes tumores evoluíram a partir da forma benigna (WATANABE,1997).

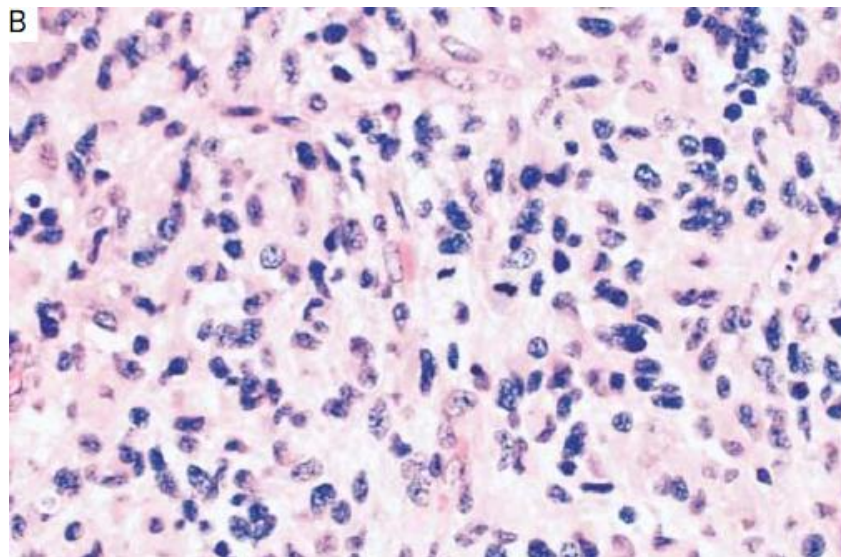


Fig. 03- Astrocitoma anaplasico é caracterizada por atipia nuclear e mitoses (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>).

Alterações genéticas adicionais que podem refletir alto grau de malignidade incluem: deleção do gene *p16* (30%), alterações no gene *RB*, (25%) deleção do *p19* (15%), amplificação *CDK4* em (10%). Foram também relatadas mutações no gene *PTEN/MAC* e perda da heterozigose (LOH; do inglês *loss of heterozygosity*) no braço longo do cromossomo 10 (10q) em 15 e 30% dos casos estudados, respectivamente. A LOH foi também observada no

braço longo do cromossomo 19(19q) em aproximadamente 40% e no braço longo do cromossomo 22 (22q) em aproximadamente 30%. A amplificação do gene *EGFR* é raramente observada (menos de 10%). O tempo de progressão para glioblastoma multiforme é muito variável, com uma média de 2 anos e um tempo total de doença de 3 anos (DEIMLING, 1994).

#### **1.5.4 Glioblastoma multiforme**

Foi identificado por VIRCHOW em 1863, como tumor glial (*apud* SIQUEIRA, 1998). É o tumor glial de maior grau de malignidade, compostos por astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados. Os glioblastomas multiformes podem se originar das formas benignas (grau II) ou dos próprios astrocitomas anaplásicos, sendo denominados de glioblastomas secundários. Entretanto, a sua manifestação mais freqüente é após uma história clínica curta, sem evidência de precursor benigno, quando são chamados de glioblastomas primários (KLEIHUES *ET AL.*,2002).

Podem se manifestar em qualquer idade, sendo mais freqüentes em adultos com pico de incidência entre 45 e 70anos. Em geral originam-se na substância branca sub-cortical dos hemisférios cerebrais, principalmente regiões temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%). A história clínica usualmente corresponde a sintomas de início recente, menos que 3 meses, tais como crises convulsivas, sinais neurológicos focais e cefaléia. O diagnóstico por imagem é realizado por Tomografia Computadorizada e Ressonância Nuclear Magnética, os quais revelam lesão expansiva heterogênea, captante de contraste com importante edema peritumoral (KLEIHUES *ET AL.*,2002) (figura 04).



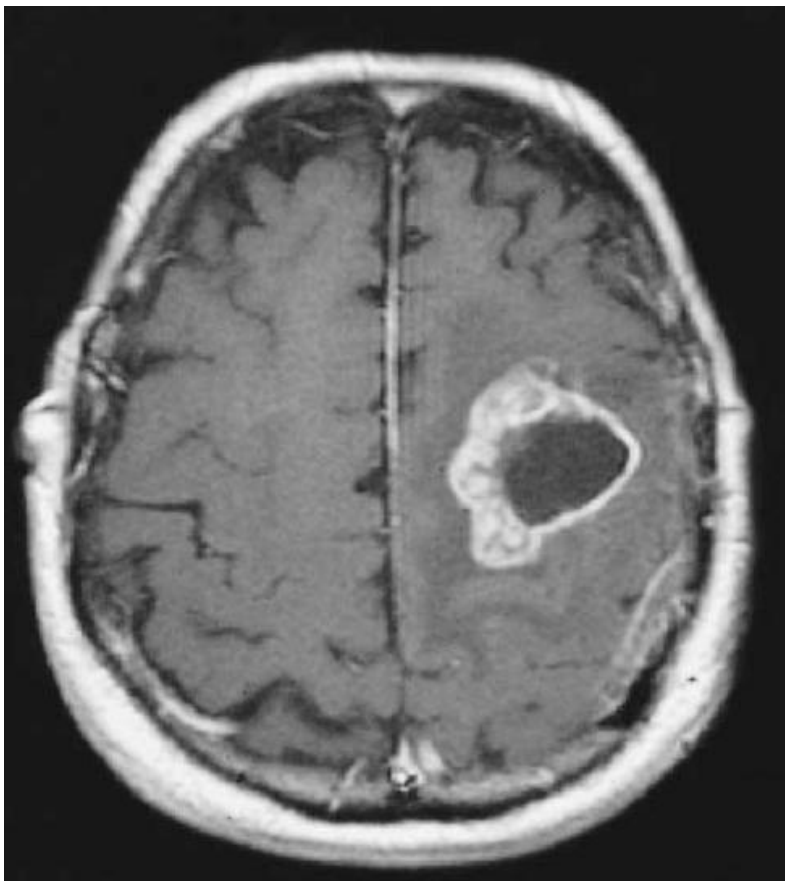


Fig. 04- Ressonancia Magnética de encéfalo revelando lesão heterogênea captante de contraste frontal esquerda, compatível com astrocitoma de alto de grau de malignidade (Fonte <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>)

Sob visão macroscópica são pobremente delimitados do tecido normal, com sua superfície mostrando uma massa acinzentada com regiões amareladas (necrose) e vermelhas ou marrons (sangramento recente ou antigo). A necrose central ocorre em 80% dos casos, ainda podemos observar presença de cistos. As características histopatológicas são de um conjunto de células pobremente diferenciadas, com pleomorfismo, atipia nuclear e intensa atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose, sendo estas duas ultimas características fundamentais para o diagnóstico (BURGER *ET AL.*, 1987 e KLEIHUES *ET AL.*, 2002) (figura 05).

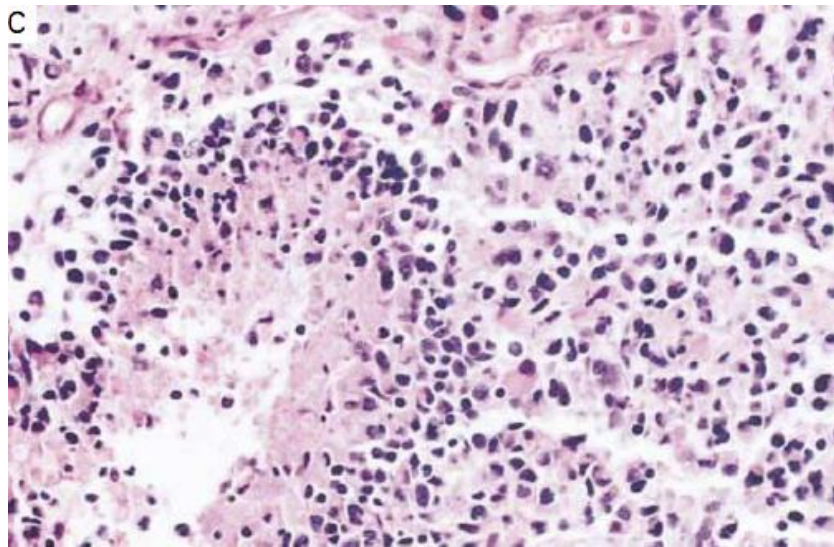


Fig. 05 - Glioblastoma é caracterizado por necrose e células em pseudopaliçada, além de proliferação vascular (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas>)

A microproliferação vascular aparece como tufo glomerulóides, localizados próximo a áreas de necrose, consistindo de multicamadas de células endoteliais, sendo que a trombose vascular é muito freqüente, desenvolvendo papel importante no desenvolvimento de isquemia e necrose (KLEIHUES *ET AL.*, 2002).

Dois tipos de necrose podem ser distinguidos: a observada sob visão macroscópica e por neuroimagem como áreas de tecido tumoral destruído sem captação de contraste e com freqüência compreendem 80% da massa neoplásica. A necrose microscópica aparece como um tecido amarelado ou esbranquiçado, com vasos tumorais dilatados e trombosados, não sendo facilmente distinguidas células do glioma. A presença dos vasos trombosados corrobora com a ideia de que a necrose possa ocorrer por insuficiência de suprimento sanguíneo. Grandes áreas de necrose estão relacionadas à pior prognóstico (BARKER *ET AL.*, 1996).

A transformação maligna das células neuroepiteliais é um processo de várias etapas comandadas pela aquisição de uma seqüência de alterações genéticas. A via genética dos glioblastomas *primários* difere dos tumores "novos" (SANSON *ET AL.*, 2004).

O gene *EGFR* encontra-se amplificado e superexpresso em 30 a 40% dos glioblastomas multiforme, podendo mostrar simultaneamente a perda do cromossomo 10. O estudo feito por THOMA *ET AL.* (1998) revelou que a amplificação do *EGFR* encontra-se presente em 39% dos glioblastomas secundário, enquanto que no grupo de glioblastomas primários nenhum mostrou a mesma alteração (KLEIHUES *ET AL.*, 2002).

## **1.6 CURVAS DE SOBREVIDA NOS GLIOMAS**

Tanto nos casos tratados de gliomas como naqueles sem tratamento, as curvas são exponenciais quanto à forma. Isso significa que um tempo constante pode ser calculado para essas curvas e que um modelo matemático pode ser construído para prognosticar com precisão a sobrevida da maioria dos pacientes com esta doença. As propriedades biológicas são tais que as curvas de sobrevida para pacientes em diferentes grupos de tratamento tendem a convergir inexoravelmente para 18 a 24 meses após o diagnóstico (SALCMAN E SALOMUN, 1984, PERAUD *ET AL.*, 2002).

Nessa fase, mais de 90% dos pacientes já morreram mesmo depois de realizado cirurgia e radioterapia. O padrão exponencial é dramaticamente diferente das curvas de sobrevivência na maioria dos outros tumores, incluindo astrocitoma cístico na infância e o meduloblastoma. Nessas doenças observa-

se um platô entre cinco e dez anos. A curva de sobrevida para tumores de baixo grau é também exponencial na forma, entretanto com uma constante de tempo maior, sendo a sobrevida média de cinco anos. A análise dessas curvas confirma a observação de que gliomas de baixo grau de malignidade representam um *continuum* biológico no qual um tumor representa simplesmente um estágio mais precoce no ciclo vital de outro tumor mais agressivo (SALCMAN E SALOMUN,1980, KLEIHUES *ET AL.*, 2004) .

Importantes resultados clínicos foram demonstrados por PERAUD *ET AL.* 2002(Fig.06), onde 159 pacientes com astrocitomas grau II, sendo 129 de 'novo', foram observados, num período de tempo. Destes, 84 evoluíram com progressão para tumor maligno, mesmos após procedimentos cirúrgicos e radioterápicos e 36 morreram, após um período médio de 108 meses.

### **1.7 VIAS GENÉTICAS DE PROGRESSÃO DOS GLIOMAS**

Faz se necessário entender os mecanismos genéticos através dos quais os gliomas progridem, no intuito de diagnosticar, prognosticar e usar esses conhecimentos como potenciais agentes terapêuticos (SANSON *ET AL.*, 2004). Estes mesmos autores descrevem vias distintas nesta progressão (Fig. 07), que incluem duas alterações precoces: a inativação da p53 (associada a astrocitomas) e a perda dos segmentos cromossômicos 1p e 19q. A deleção da *P16/CDKN2A* no 9p21, inativação do gene *RB1* no 13q, e amplificação do *CDK4* mutuamente, são mais freqüentes nos astrocitomas anaplásicos. A inativação do *PTEN* no cromossomo 10q, a amplificação e/ou rearranjo do *EGFR* são mais freqüentes nos glioblastomas.

A amplificação do *EGFR* ocorre em 40% dos glioblastomas primários e raramente nos secundários. A superexpressão do *EGFR* é também mais comum nos primários (60%) que secundários (10%). Todos os tumores com amplificação do *EGFR* têm superexpressão, e cerca de 70 a 90% com superexpressão têm amplificação (BIERNAT *ET AL.*, 2004).

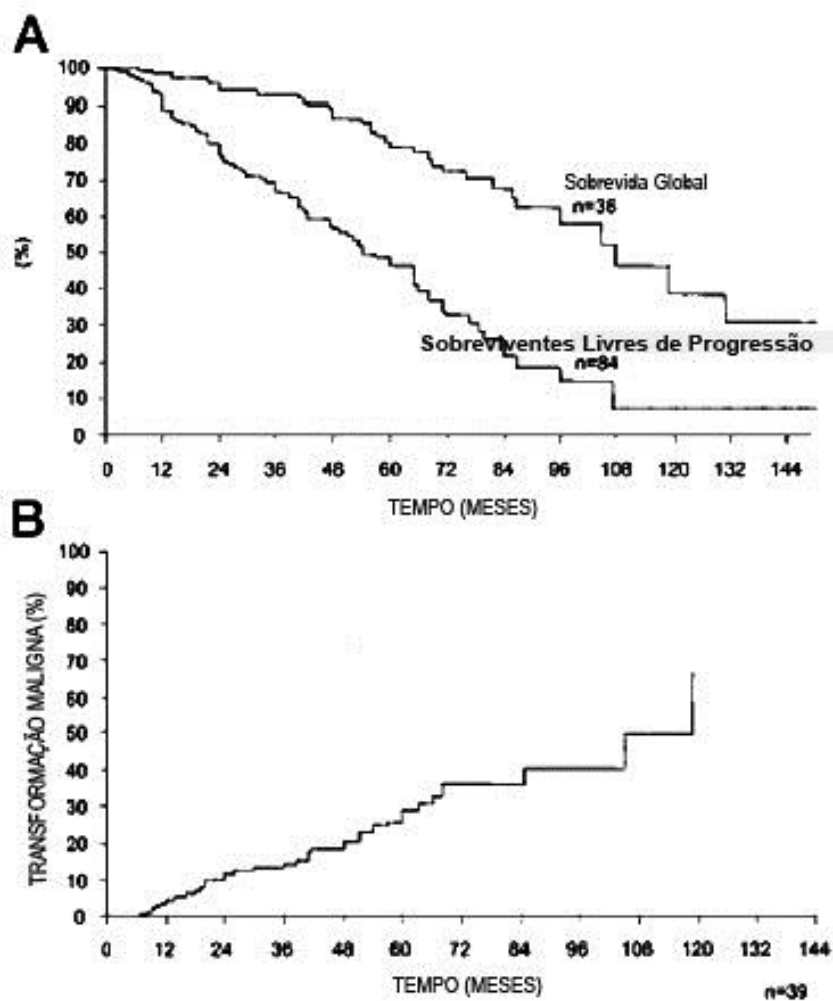


Figura 06: Gráfico mostrando a sobrevivência livre de progressão da doença. Sobrevivência (A) e padrão de transformação maligna (B) (Fonte: Peraud *et al.*, 2002).

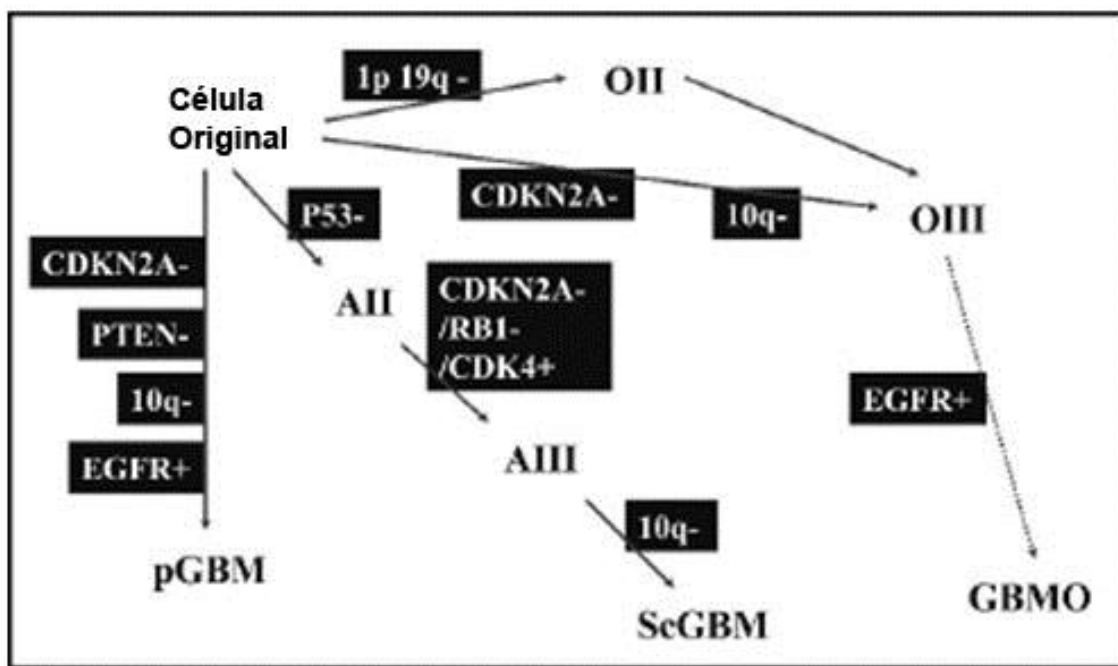


Fig.07: Vias genéticas de progressão dos gliomas. Os cromossomos inativados e genes deletados são representados por "-". Genes amplificados são representados por "+". AII, astrocitomas grau II; AIII, astrocitomas grau III; CDK, ciclino quinase dependente; EGFR, receptor do fator de crescimento da epiderme; GBMO, glioblastoma com componente oligodendroglial; OII, oligodendroglioma grau II; OIII, oligodendroglioma grau III; pGBM, glioblastoma multiforme primário; ScGBM, glioblastoma multiforme secundário (Fonte: Sanson *et al.* 2004).

Em outro grupo de estudo não foi identificada amplificação do *EGFR* em pacientes abaixo de 35 anos, sendo muito raro ou ausente em crianças (OHGAKIN *ET AL.*, 2004).

A inativação da p53, que gera instabilidade genética, tem papel fundamental no desenvolvimento dos glioblastomas secundários (SANSON *ETAL.*, 2004).

A mutação do *TP53* é a primeira alteração detectada em gliomas de baixo grau em dois terços destes tumores, o que é igual nos astrocitomas anaplásicos e glioblastomas derivados dos de baixo grau. Esta mutação também ocorre em glioblastomas primários, só que numa menor proporção (menos que 30%). Em glioblastomas secundários esta mutação tem sido

demonstrada estar localizada em dois *codons hot spot*: 248 e 273 (OHGAKI *ET AL.*, 1993).

A amplificação do *MDM2* ocorre em menos de 10% dos glioblastomas, quase que exclusivamente nos primários onde há ausência da mutação do *TP53* (REIFENBERGER *ET AL.*, 1993).

A perda da expressão da p14 tem sido encontrada em 76% dos glioblastomas, sendo que a metilação da região promotora do gene *p14* é mais freqüente no subtipo secundário que no primário, entretanto sem diferença significativa (BUGLER *ET AL.*, 1995).

A proteína RB1 controla o ciclo celular através da passagem da fase G1 para fase S. A proliferação celular é regulada em *checkpoints* na fase G1 e G2. As citocinas ciclino-dependentes (CDK) inibem por fosforilação o gene RB1 pelo fator de transcrição E2F. A liberação do fator E2F induz a transcrição de genes alvos que promovem a síntese de DNA. A D-CDK4 é inibida pela p16, produto do gene supressor de tumor *p16 CDKN2*, o qual é freqüentemente deletado ou hipermetilado em gliomas malignos (SANSON *ET AL.*, 2004)

Os gliomas podem ativar receptores da tirosina quinase por vários mecanismos: Superexpressão do ligante e receptor; PDGF e PDGFR, amplificação genômica e ou mutação de receptores (ex. *EGFR2*) ou ativação do sinal de transdução intracelular (ex. *PTEN*) (SANSON *ET AL.*, 2004).

O gene PI3K (fosfatidilinositol 3 – quinase) é freqüentemente ativado em gliomas malignos, promovendo diversas funções biológicas incluindo proliferação, sobrevivência e motilidade celular (CHOE *ET AL.*, 2003). Podem estar alterados através de vários mecanismos, sendo o mais comum a mutação ou

perda da heterozigose do *PTEN* ou amplificação de fatores de crescimento semelhante ao *EGFR*. Tem sido sugerido que estas alterações surgem em fases tardias dos gliomas, por isso sua ativação parece estar relacionada a progressão maligna. Parece ainda mediar radiorressistência nestes mesmos tipos de tumor, por supressão da apoptose (CHAKRAVARTI ET AL., 2004).

O *PTEN*, que codifica a proteína lipídeo fosfatase, é um gene supressor localizado no cromossomo 10q23, que tem um significativo papel não somente na indução da parada do ciclo celular como também na apoptose, além de outros aspectos fisiológicos como controle da adesão, migração e diferenciação celular. Tem sido demonstrado que o PI3k funciona como um dos substratos para esta proteína a qual é antagonizada (CRISTOFANO ET AL., 2000). O envolvimento do *PTEN* na regulação da adesão e migração celular pode explicar a freqüente perda deste gene em estágios tardios dos tumores, alguns já em fase de metástases (TAMURA ET AL., 1999, CRISTOFANO ET AL., 2000), também relatam que a LOH do 10q23 é um evento comum em estágios iniciais de tumores em 25 a 50%, entretanto a perda completa deste gene esta associada a estágios mais agressivos, exacerbando fatores fenotípicos inclusive produzindo metástases.

A LOH do 10q é a alteração genética mais freqüente em ambos os tipos primários e secundários, com similar freqüência (60 a 80%). A LOH do 10p é exclusivo dos primários. A LOH do 10q25 é associado a alteração da transição dos gliomas de baixo para alto grau (RASHER ET AL., 1995). Na via do glioblastomas multiformes secundários a mutação da *TP53* é um evento precoce e a LOH 10q é um evento tardio, entretanto a seqüência dos eventos genéticos primários não são bem definidos (HEGI, 2005).



## 1.8 PAPEL DA MUTAÇÃO DO GENE *TP53* NA EVOLUÇÃO DOS GLIOMAS

Astrocitomas e oligodendrogliomas de baixo grau têm uma tendência para progredir para fenótipo maligno, isto é: grau anaplásico e glioblastoma multiforme. Embora alguns destes tumores progridam rapidamente, outros permanecem inalterados por um período mais prolongado. O prognóstico final é fortemente determinado por fatores pré-tratamento: Pacientes jovens, abaixo de 40 anos de idade, com tumores pequenos (abaixo de 20ml), com poucas alterações neurológicas e exames de imagem sem captação de contraste, têm resultados melhores, com uma média de sobrevida de 5 anos em 70 a 80%. O tempo de sobrevida diminui drasticamente em pacientes que apresentam 2 ou 3 destes fatores prognósticos desfavoráveis (KRET ET AL., 1997 E BAUMAN ET AL., 1999).

Estratégias de tratamento como grau de ressecção, radioterapia e radiocirurgia são apenas parcialmente efetivas, e essa resposta não é uniforme. O maior impedimento na efetividade destes tratamentos é um incompleto conhecimento dos sinais moleculares que determinam a progressão destes tumores. Com base em estudos preliminares, a mutação do *TP53* tem sido considerada a mais freqüente e precoce alteração genética em pacientes com gliomas, embora a relevância prognóstica destes achados ainda permaneça em debate (PERAUD ET AL., 2002).

Em gliomas esporádicos (incluindo astrocitomas) a via da p53 está quase invariavelmente alterada, seja por mutações de ponto ou perda

cromossômica, evento freqüentemente associado à progressão da doença (FURNARI *ET AL.*, 2009).

O *TP53*, situado no *loci* 17p13.1, é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma (PINTO *ET AL.*, 2008). É ativado pelo surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Sua ativação produz uma proteína que estimula a síntese de outras proteínas, que, por vez, atuarão inibindo a replicação celular através da ligação com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e estimulando as enzimas de reparo do DNA genômico. Caso o reparo do DNA seja completo, o *TP53* é inativado e a célula retorna ao estado normal. Caso não haja reparo satisfatório, a célula permanece impedida de replicar-se e é induzida à apoptose (FMRP-USP, 2009). A apoptose é um tipo de morte celular, desencadeada, entre outros estímulos, por mutações potencialmente lesivas. Outra forma de atuação da proteína p53 é no envelhecimento celular. Durante este processo, as células vão reduzindo gradativamente a produção de mdm2, um inibidor fisiológico da p53. Com isso, células senescentes e diferenciadas continuam sua existência, mas perdem a capacidade de se multiplicar, protegendo o organismo contra tumores (HOFFEE, 2000).

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

Dentre as mutações identificadas do *TP53* em tumores cerebrais astrocíticos, as transições G:C→A: T são as mais freqüentes e estão predominantemente localizadas nos sítios CpG (OHGAKI *ET AL.*, 2007).

O mecanismo melhor caracterizado das transições G:C→A: T nos sítios CpG é a desaminação da 5-metilcitosina nesses sítios, resultando na substituição da 5-metilcitosina por timina. Isto ocorre espontaneamente ou mediado por fatores, como por exemplo, através da ação dos radicais de oxigênio ou de óxido nítrico produzido pela síntese de óxido nítrico sob condição de inflamação crônica (OHSHIMA E BARTSCH, 1994).

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

Mutações no gene *TP53* estão presentes em 50% dos tumores em geral (PINTO *ET AL.*, 2008) e sua sinalização está comprometida em 87% destes (CHIN E MEYERSON, 2008). O domínio de ligação de DNA da proteína p53 é denominado “*hot spot*” para mutações devido à maioria das mutações da proteína ocorrer nesta região (ZILFOU E LOWE, 2009).

No gene *TP53*, a região compreendida como *hot spot* se estende do éxon 4 ao 10 variando do 4/5 ao 9/10/11 de acordo com outros autores como FUKUSHIMA (2006). Além da forma mais conhecida da p53, já foram descritas

oito isoformas diferentes e uma nova região promotora no éxon 4 (BOURDON ET AL., 2005). Estas variantes apresentam padrão de expressão tecido específico e o promotor alternativo é conservado evolutivamente estando presente tanto na *Drosophila* quanto no homem (BARBOSA, 2007). Além disso, parece ocorrer expressão diferencial destas variantes no tecido de tumor de mama e a expressão diferencial destas isoformas pode explicar a dificuldade em associar o *status* da p53 com suas propriedades biológicas em cânceres humanos (BARBOSA, 2007).

A análise da correlação entre o curso clínico e a mutação do *TP53*, pode ser considerada um marco genético do início da formação do tumor até a sua progressão em tipos histológicos mais agressivos, podendo constituir uma promissora abordagem na detecção precoce, determinando novas terapias antineoplásicas e conseqüentemente um melhor prognóstico em gliomas de baixo grau (PERAUD ET AL., 2002).

Em um estudo retrospectivo de PERAUD ET AL. (2002), foram observadas conclusões divergentes, segundo o qual numa análise de 159 pacientes portadores de astrocitomas de baixo grau, concluiu-se que a mutação no gene *TP53* e a super-expressão da p53, foram acumulando-se no período da sobrevida livre de progressão das células tumorais. Essa concomitância entre a mutação do *TP53* e acúmulo da p53 foi encontrada em 89% de todos os tumores, sendo que apenas seis casos mostraram mutação do *TP53* sem acúmulo da p53 e dois com acúmulo da p53 sem a mutação, do total de 159 pacientes. Este estudo sugere que a expansão clonal da imunopositividade da p53 e provavelmente células tumorais mutantes ou regulação da estabilização da p53 são atribuídas à lesão do DNA num considerável número de pacientes.

Dadas as limitações de avaliações retrospectivas, não existe um consenso do papel prognóstico da mutação do *TP53* e acúmulo da p53. MEYER *ET AL.* (1994) observaram que pacientes com mutação do *TP53* sobrevivem por um período duas vezes mais longo, embora tenha avaliado apenas 15 pacientes.

ISHII *ET AL.* (1999) revelaram um forte impacto sugestivo de que a mutação do *TP53* em pacientes livres de progressão de tumor oferecem risco de malignidade, após avaliação de 36 pacientes com tumores "de novo" ou recorrentes a partir de grau II.

No trabalho de PERAUD *ET AL.* (2002) pôde ser observado o impacto prognóstico da mutação do *TP53* detectado por um período de sobrevida o qual tem uma correlação inversa com a idade, caracterizado ou correlacionado com o tempo necessário para malignização. Invariavelmente a mutação do *TP53* foi um fator desfavorável na sobrevida livre de progressão, principalmente observados no subtipo gemistocítico.

Pacientes com acúmulo de proteína p53 têm uma curta sobrevida livre de progressão da doença, embora não haja diferença estatística significativa, indicando limitação e inacurácia da imunohistoquímica na determinação da mutação do *TP53* (ANKER *ET AL.*, 1993).

Comparando os trabalhos de ISHII *ET AL.* (1999) (tamanho amostral pequeno, tratamento não muito bem definido) e o de PERAUD *ET AL.*, (2002) (curto período de acompanhamento dos pacientes), não há conclusões definitivas sobre o papel prognóstico da mutação do *TP53* na sobrevida quer seja por recorrência ou transformação maligna. Entretanto o papel na sobrevida livre de tumor pode ser bem determinado.

Em tumores astrogliais, mutações do *TP53* são localizadas em regiões com *clusters no códon 173* (7.5%), 248 (17.5%) e 273 (7.5%) (OHGAKI ET AL., 1993). Um dos achados do trabalho de PERAUD ET AL., 2002, é que mutações no *TP53* no *códon 175*, têm significativamente menor sobrevida livre de progressão do tumor e alto risco de transformação maligna, quando comparados com esta mutação em outros *hot spots codons*. Estes autores concluíram que a mutação do *TP53* é um evento precoce e freqüente em gliomas de baixo grau com uma clara preferência para o subtipo gemistocítico, principalmente sendo estas mutações localizadas no *códon 173*, levando o paciente a uma curta sobrevida livre da doença e alto risco de malignização.

Os glioblastomas multiformes representam um grupo de doenças distintas, afetando idades diferentes, desenvolvendo-se em vias genéticas diferentes. A maioria dos glioblastomas multiformes são **primários**, e se desenvolvem rapidamente “de novo”, sem evidências clínicas e radiológicas de tumores menos agressivos prévios. Afetam pessoas mais idosas e têm como características a perda da heterozigose 10q (70% dos casos), amplificação do *EGFR* em 36% , deleção do p16 em 31% e mutação do *PTEN* em 25%. Os glioblastomas **secundários** desenvolvem-se a partir de gliomas difusos de baixo grau ou anaplásico, em pacientes mais jovens, com uma via genética onde é observada a mutação do *TP53*, como a alteração mais precoce e frequente. Esta mutação é detectada em cerca de 60% dos astrocitomas precursores. Na evolução destes, existem mutações adicionais, incluindo a heterozigose do 10q ( OHGAKI E KLEIHUES, 2007)

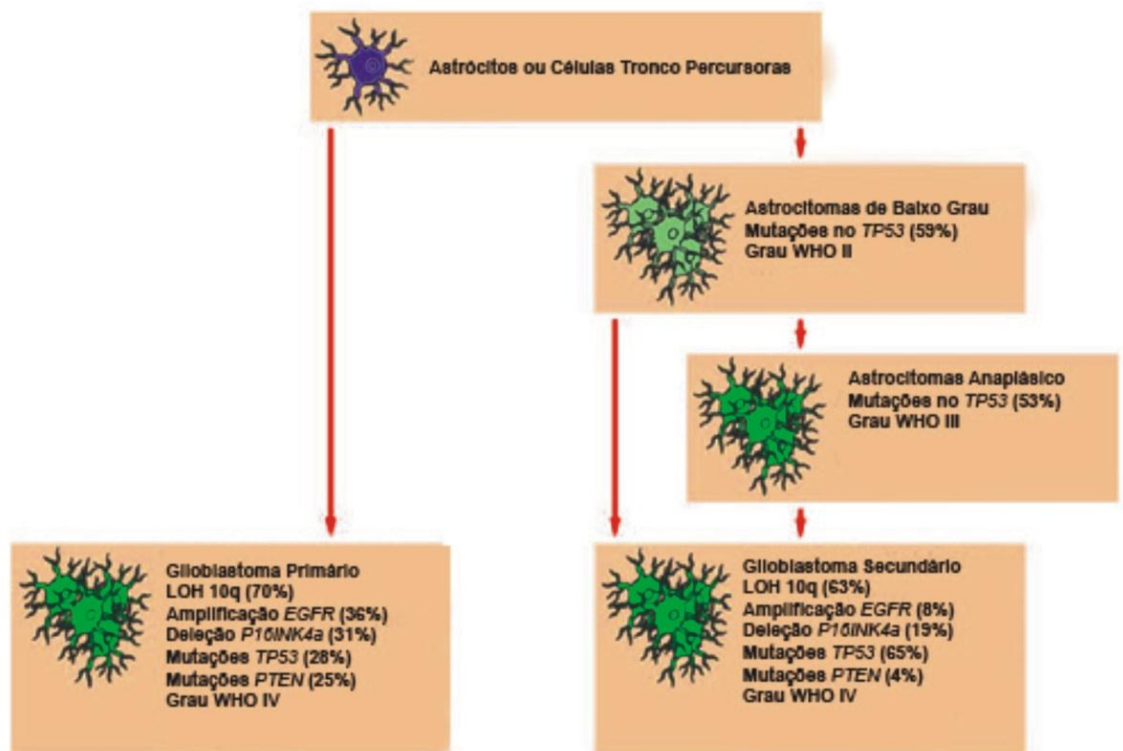


Fig. 08: Vias genéticas dos glioblastomas primários “de novo” e secundários. LOH 10q é freqüente em ambas as vias. Mutações da TP53 são alterações freqüentes e precoces nos glioblastomas secundários. (OHGAKI E KLEIHUES, 2007)

## 1.9 OBJETIVOS

### 1.9.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a importância das mutações no gene *TP53* nas diferentes propostas da gênese e progressão de gliomas, o presente trabalho tem como objetivo geral analisar a ocorrência de deleções ou duplicações desse gene, além de realizar um *screening* de polimorfismos dos éxons 4-10 desse gene nas amostras de gliomas com aplicação da técnica de SSCP, comparando os resultados obtidos entre tumores de graus I e II (benignos) com aqueles de graus III e IV (malignos), coletados no Hospital Ophir Loyola, Belém- PA.

### 1.9.2 Objetivos Específicos

- Aplicar sondas loco-específicas do gene *TP53* em experimentos de FISH interfásico em material obtido de gliomas;
- Analisar o estado mutacional dos éxons 4 ao 10 do gene *TP53*, utilizando como ferramenta a técnica de PCR-SSCP, em amostras de gliomas;
- Verificar uma possível associação das alterações nos éxons do gene *TP53* e o grau de estadiamento do tumor;
- Correlacionar os resultados encontrados com possíveis vias de progressão tumoral.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Estudos Citogenéticos e Moleculares em Tumores do Sistema Nervoso Humano na População Paraense”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde da Universidade Federal do Pará (025/06 CEP-CCS/UFGPA) (Anexo I). Os pacientes ou seus parentes próximos foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitou-se a assinatura de um termo de livre consentimento (Anexo II). As análises foram realizadas em quinze amostras de gliomas de diferentes graus de malignidade, segundo tabela I. Para controle da técnica de FISH, foi analisada uma amostra de preparação obtida a partir de cultura de linfócitos de um indivíduo hígido que não foi exposto a radiações ou medicamentos que pudessem interferir no resultado do estudo, em período próximo à coleta.

Tabela I: Amostras de gliomas utilizadas nesse estudo.

CSN	SEXO	IDADE	GRAU	HISTOPATOLÓGICO
005	F	9	I	Astrocitoma Pilocítico
108	M	20	I	Astrocitoma Sub-ependimário de Células Gigantes
116	F	3	I	Astrocitoma Pilocítico
010	F	12	II	Astrocitoma Fibrilar
209	M	32	II	Astrocitoma Fibrilar
031	F	55	III	Astrocitoma Anaplásico
088	F	63	III	Oligoastrocitoma Anaplásico
146	F	31	III	Astrocitoma Anaplásico
017	F	64	IV	Glioblastoma Multiforme
021	M	3	IV	Glioblastoma Multiforme
101	M	79	IV	Glioblastoma Multiforme
104	M	54	IV	Glioblastoma Multiforme
114	M	58	IV	Glioblastoma Multiforme
154	M	43	IV	Glioblastoma Multiforme
14	F	68	IV	Glioblastoma Multiforme

## **2.2 COLETA DE AMOSTRAS**

Amostras de tecido tumoral foram coletadas durante o procedimento cirúrgico pela equipe de Neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola. Os laudos histopatológicos desse hospital seguem os padrões da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). O material foi coletado em meio de cultura RPMI, contendo antibióticos. Imediatamente após sua coleta, o material foi encaminhado ao laboratório para processamento.

## **2.3 OBTENÇÕES DE MATERIAL INTERFÁSICO**

O método foi adaptado de FORD E HAMERTON, 1956. O material tumoral foi desagregado com o uso de bisturi, tesoura e colagenase em uma placa de Petri. Depois da dissociação completa do tecido, acrescentaram-se cerca de 0,2 mL de colchicina e 5 mL de meio RPMI enriquecido com 10% de soro bovino fetal. O material foi transferido para um macerador, e após sua maceração, foi transferido para uma placa de Petri e incubado por aproximadamente 3 horas a 37°C. Depois disso, o material foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e adicionaram-se 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M). O material foi então ressuspendido e incubado por 15 minutos a 37°C. Depois de transcorrido esse tempo, acrescentaram-se 5 mL fixador Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético) e ressuspendeu-se. Após centrifugar-se o material por 10 minutos a aproximadamente 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante com o uso de uma pipeta Pasteur, acrescentando-se novo fixador (5 mL). Após ressuspensão, o material foi novamente centrifugado. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Após a última etapa,

acrescentaram-se apenas 2mL de fixador. O material foi então mantido em freezer.

## **2.4 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS E PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO**

As lâminas para uso foram primeiramente lavadas, deixando-as por alguns minutos em solução de álcool / éter (50%). Após esse procedimento:

1. Após a última centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se cerca de 1 ml de fixador novo ao material, que foi ressuspenso com ajuda de uma pipeta Pasteur.
2. Pingou-se uma gota do material na lâmina.
3. Quando o fixador começou a evaporar, adicionou-se mais uma gota de fixador sobre a preparação na lâmina.

No caso de preparações apresentando restos de citoplasma, repetia-se a lavagem por mais vezes ou aplicava-se o tratamento com pepsina:

1. Incubava-se a lâmina em solução com 50 µl de pepsina/100 ml, 0,01 M HCl, pH 2,3, a 37°C.
2. Incubava-se em 1x PBS por 5 minutos, por três vezes.

Depois de gotejado o material, as lâminas foram desidratadas em etanol (70%, 90% e 100%, cada um por três minutos), e então incubadas a 60°C por uma hora, ou por uma noite a 37°C. Após isso, as lâminas foram utilizadas para a hibridização.

## 2.4 EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA (FISH) INTERFÁSICO.

### 2.4.1 Sondas

Foram utilizadas sondas comerciais da marca *Abbott Molecular* (Illinois, EUA). As sondas foram utilizadas em experimentos dual-colors, utilizando-se dois fluoróforos distintos: *SpectroRed* e *SpectroGreen*. No experimento para detecção de aneuploidias do cromossomo 17 e rearranjos envolvendo o gene *tp53*, utilizamos as sondas específicas para o centrômero do 17 (*Vysis CEP 17 17p11.1-q11.1 Alpha Satellite*) e para 17p13.1 (*Vysis LSI TP53*), respectivamente.

### 2.4.2 Hibridização

Foram seguidas as instruções do fabricante (*Abbott Molecular*):

1. Em um *ependorf*, as sondas foram misturadas ao tampão de hibridização: 7 µl de tampão, 1 µl de sonda e 2 µl de água deionizada.
2. O material foi misturado no vortex por 5 segundos e centrifugado.
3. As sondas foram desnaturadas em banho-maria a 73°C por 10 minutos.
4. Após sua desnaturação (5 minutos em formamida a 70% a 73°C), as lâminas foram desidratadas em bateria de alcoóis (etanol 70% gelado, 4 minutos, 70%, 90% e 90%, temperatura ambiente, 2 minutos cada, e 100% temperatura ambiente, 4 minutos).

5. Depois da evaporação total do álcool, as lâminas foram colocadas em placa quente a 50°C, e despejou-se 10 µl de solução de hibridização (tampão e sondas).
6. Após dois minutos, as lâminas foram retiradas da placa quente. Uma lamínula foi colocada sobre o material e as lâminas foram incubadas em recipiente fechado a 42°C por 45 minutos.

### **2.4.3 Lavagem de Estringência**

Após a incubação e retirada das lamínulas, as lâminas foram incubadas em 0.4xSSC/0.3% Tween a 73oC por dois minutos. Em seguida, as lâminas permaneceram por um minuto em 2xSSC/0,1% Tween. As lâminas foram então coradas em DAPI e cerca de 10 µl de *antifade* foram aplicados em cada lâmina. Uma lamínula de 24mmx24mm foi colocada sobre o material. As lâminas foram mantidas em geladeira até a análise ao microscópio.

### **2.4.4 Análises dos experimentos do FISH Interfásico**

A análise dos experimentos de FISH foi feita com objetiva de imersão em microscópio de fluorescência IMAGER acoplado a uma câmera digital. A captura de imagens foi feita com o auxílio do programa AXIOVISION. Usando os critérios de HOPMAN *ET AL.*(1994) *apud* CARLSON *ET AL.* (2000), foram analisados 40 núcleos intactos de 3 a 5 áreas separadas (120 a 200 núcleos no total). Regiões com *background* ou que não exibiam pelo menos um sinal de hibridização não foram consideradas.

#### **2.4.5 Análises Estatísticas**

Foram utilizados os programas *EpiInfo 2000* e *Microsoft Excel 2010* para o armazenamento das informações na forma de bancos de dados, bem como para realização da análise estatística descritiva das amostras, demonstrando os indicadores epidemiológicos na forma de frequências, percentuais, representações tabulares e gráficas a partir da investigação feita, traçando assim o perfil do grupo pesquisado.

Foram aplicados os testes estatísticos Exato de Fisher e ANOVA (Análise de Variância) para 1 critério, para comparação entre as frequências e as médias dos escores de cada grupo, respectivamente, observado possíveis diferenças estatísticas significantes. Adicionalmente, foram realizadas as Correlações de Spearman e Linear de Pearson, para verificar a possível existência de associações entre as variáveis estudadas nas amostras.

Em todos os testes, foi utilizado o software estatístico *Bioestat 5.0* (AYRES *ET AL.*, 2009), com nível de significância 5% e poder do Teste de 80%, com a finalidade de garantir a detecção das diferenças estatisticamente significantes.

### **2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO TUMORAL**

Primeiramente as amostras de tecidos tumorais foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e posteriormente homogeneizados em tampão de extração e digeridos com proteinase K. Após esta digestão o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol. O DNA foi dissolvido com tampão TE e conservado em freezer (SAMBROOK *ET AL.*, 1989).

## 2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

De acordo com PAVARINO-BERTELLI ET AL. (2002), que classificam como região de *hot spot* aquela compreendida entre os éxons 4 e 10, foram desenhados e sintetizados *primers* específicos para os éxons 4, 5, 7, 8, 9 e 10, com o auxílio do Banco de Dados do MegaBlast (NCBI) e *Primer3Plus* (tabela II). Após a extração de amostras de DNA, foram feitas reações de PCR, utilizando-se esses *primers*, realizando-se uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de ciclos repetidos por 35 vezes: desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores; extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 7 minutos.

## 2.7 ANÁLISE DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)

O produto das ampliações foi submetido à técnica descrita por ORITA ET AL. (1989). Resumidamente, um volume de 5µl do produto final do PCR foi adicionado a 4µl do corante; após a desnaturação a 95°C por 5 minutos, a amostra foi transferida para gelo e posteriormente aplicada em gel de poliacrilamida com concentração que variando de 8% a 10%, dependendo do éxon a ser analisado (tabela II). A corrida foi realizada em tampão BTE 1x durante aproximadamente 4 a 12 horas com a voltagem de 100 V ou 240 V. O gel foi corado com prata, de acordo com a técnica descrita por OTO ET AL., 1993.

Tabela II: Sequência dos primers *forward* e *reverse* utilizados na amplificação dos éxons 4, 5, 7, 8, 9 e 10 por PCR.

Éxon	Sentido	Sequência
4	<i>Forward</i>	TTTCACCCATCTACAGTCCC
	<i>Reverse</i>	CATTGAAGTCTCATGGAAGC
5	<i>Forward</i>	AACCAGCCCTGTCCGTCTC
	<i>Reverse</i>	TTCACTTGTGCCCTGACTT
7	<i>Forward</i>	TGCTTGCCACAGGTCT
	<i>Reverse</i>	ACAGCAGGCAGTGT
8	<i>Forward</i>	CCACCGCTTCTTGTCTGC
	<i>Reverse</i>	CCTACTGCCTCTTTGCTTC
9	<i>Forward</i>	AGGGTGCAGTTATGCCTCAG
	<i>Reverse</i>	ACTTGATAAGAGGTCC
10	<i>Forward</i>	CTGAGGCACAAGAATCAC
	<i>Reverse</i>	TCCTATGGCTTTCCAACC



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

As sondas utilizadas produziram sinais claramente detectáveis e de fácil interpretação. A utilização de experimentos empregando-se duas sondas simultaneamente permitiu um melhor controle acerca do comportamento do cromossomo 17. Nas figuras 9 e 10 apresentamos imagens representativas das hibridizações em núcleos interfásicos e em metáfases encontradas em alguns casos, respectivamente.

O número de núcleos analisados por caso variou de 120 a 200, de acordo com o estado de cada uma das lâminas empregadas nos experimentos de hibridização *in situ*. As diferentes combinações de números de sinais em cada núcleo e experimento foram agrupadas em três classes diferentes, sendo considerados normais os núcleos que apresentaram dois sinais de cada uma das sondas utilizadas (Tabela III). A ausência de um sinal foi considerada como deleção do segmento ou cromossomo em questão. A presença demais de dois sinais foi considerada como trissomia ou amplificação do segmento em questão.

Os resultados referentes ao gene *TP53* e à sonda do centrômero do cromossomo 17 indicaram uma pequena variação de marcações entre os casos analisados. Os núcleos normais, com duas marcações de cada sonda, foram a situação com maior porcentagem em todos os casos, com exceção dos casos CSN114 (apenas 9%), CSN146 (36%) e 209 (7%). Nesses casos, as situações mais comuns foram a presença de dois cromossomos 17, mas deleção de cópias do *TP53* (CSN114) ou presença de mais de duas cópias do

cromossomo 17 e duas cópias do *TP53* (CSN 146) ou mais de duas cópias do cromossomo 7, porém menos que duas cópias do *TP53* (CSN 209). Considerando as classes com núcleos com menos que dois sinais do *TP53* como deleções permite considerar esse rearranjo como o mais observado em todas as amostras, seguido de ganho do cromossomo 17 (presença de mais de dois sinais da sonda centromérica (Tabela III).

Tabela III: Ordenação dos dados obtidos do *FISH* interfásico para análises estatísticas

<b>AMOSTRA</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>	<b>GRAU</b>	<b>TP53=2</b>	<b>TP53 &lt;2</b>	<b>TP53 &gt;2</b>	<b>COM CÉLS ALTERADAS</b>	<b>HISTOPATOLOGICO</b>
5	F	9	I	91	8	1	9	ASTROCITOMA PILOCITICO
108	M	20	I	77	19	4	23	ASTROCITOMA SUB-EPENDIMÁRIO DE CÉLS GIGANTES
116	F	3	I	68	31	1	32	ASTROCITOMA PILOCÍTICO
10	F	12	II	68	27	5	32	ASTROCITOMA FIBRILAR
209	M	32	II	24	1	75	76	ASTROCITOMA FIBRILAR
31	F	55	III	68	21	11	32	ASTROCITOMA ANAPLÁSICO
88	F	63	III	44	33	23	56	OLIGOASTROCITOMA ANAPLASICO
146	F	31	III	37	42	21	63	ASTROCITOMA ANAPLÁSICO
017	F	64	IV	74	5	27	32	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
021	M	3	IV	77	4	19	23	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
101	M	79	IV	68	13	19	32	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
104	M	54	IV	75	3	22	25	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
114	M	58	IV	31	6	63	69	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
154	M	43	IV	45	18	37	55	GLIOBLASTOMA MULTIFORME
14	F	68	IV	60	32	8	40	GLIOBLASTOMA MULTIFORME

### 3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A Estatística Descritiva está apresentada no anexo III. A correlação linear de Pearson, para dados paramétricos, verificou que não existe associação entre as variáveis estudadas para a amostra. É possível afirmar que nestes casos, a idade em anos dos indivíduos não se mostrou associada

ao grau de malignidade, mesmo considerando a grande variação da amplitude total verificada para a característica “idade” na amostra (76 anos).

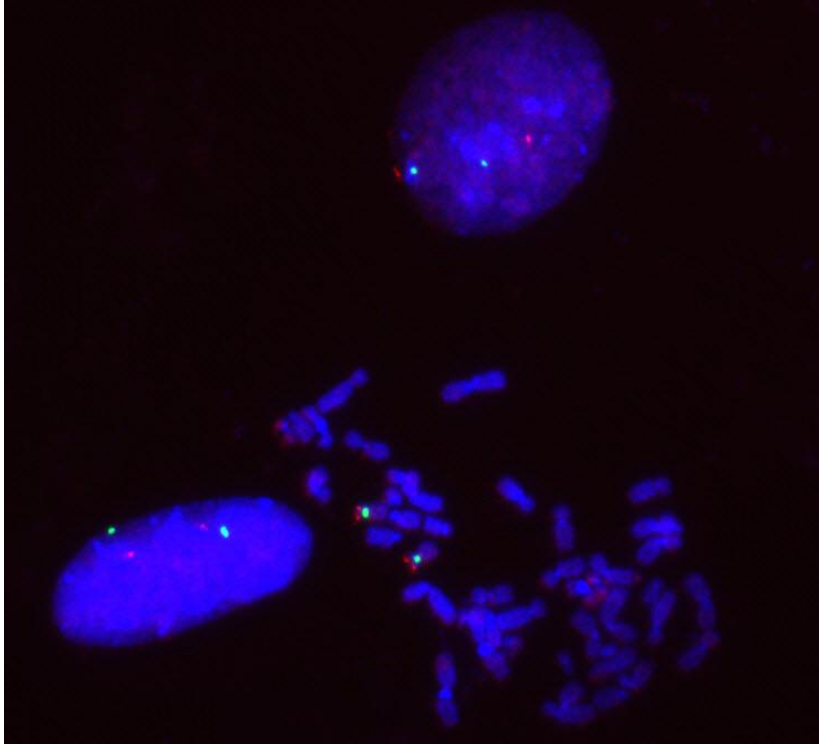


Figura 09 – Imagem representativa de experimentos de FISH utilizando sondas específicas para o locus *TP53* (vermelho) e o centrômero do cromossomo 17 (verde). Ambos os núcleos e a metáfase apresentaram número normal de marcações: duas do *TP53* e duas do centrômero do cromossomo 17.

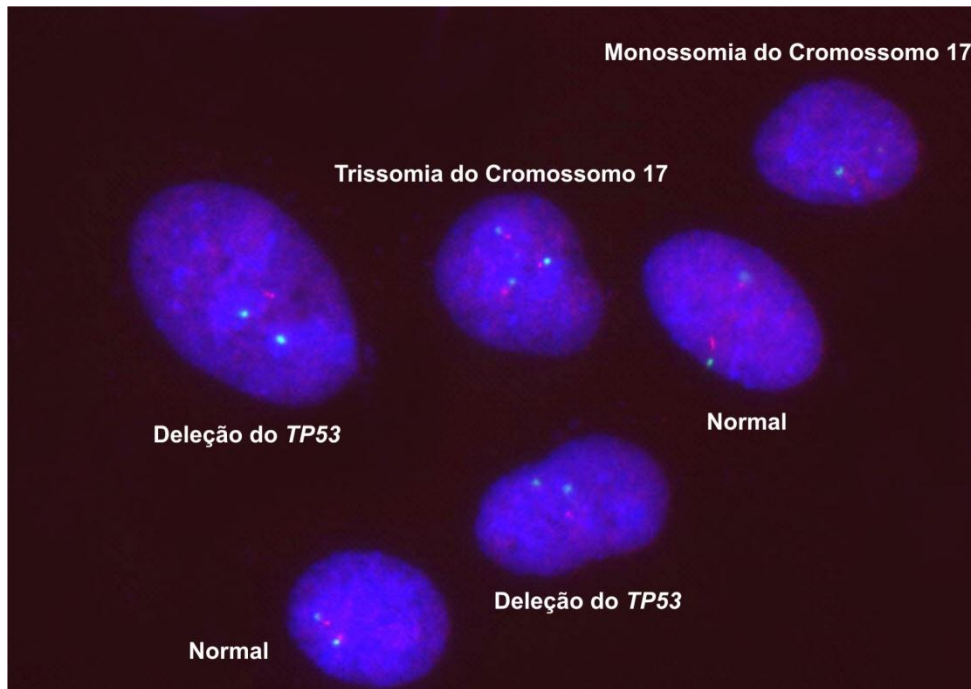


Figura 10 – Imagem representativa de experimentos de FISH utilizando sondas específicas para o locus *TP53* (vermelho) e o centrômero do cromossomo 17 (verde), mostrando núcleos normais, com deleções do cromossomo 17 ou apenas do *TP53*, e trissomia do 17.

Para verificar o grau de associação de duas características onde pelo menos uma é mensurada a nível ordinal, ou seja, se a variação de uma delas interfere no comportamento da outra, utilizamos a correlação de Spearman. Observou-se uma correlação moderada, na qual as variáveis estão positivamente associadas, ou seja, quanto maior o número de células com amplificação, maior o grau de malignidade.

Em relação ao Teste Exato de Fisher para comparação entre as freqüências dos graus de malignidade de acordo com o sexo.  $p=0,6573$ , as diferenças não foram significantes, e as freqüências são iguais (figura 11).

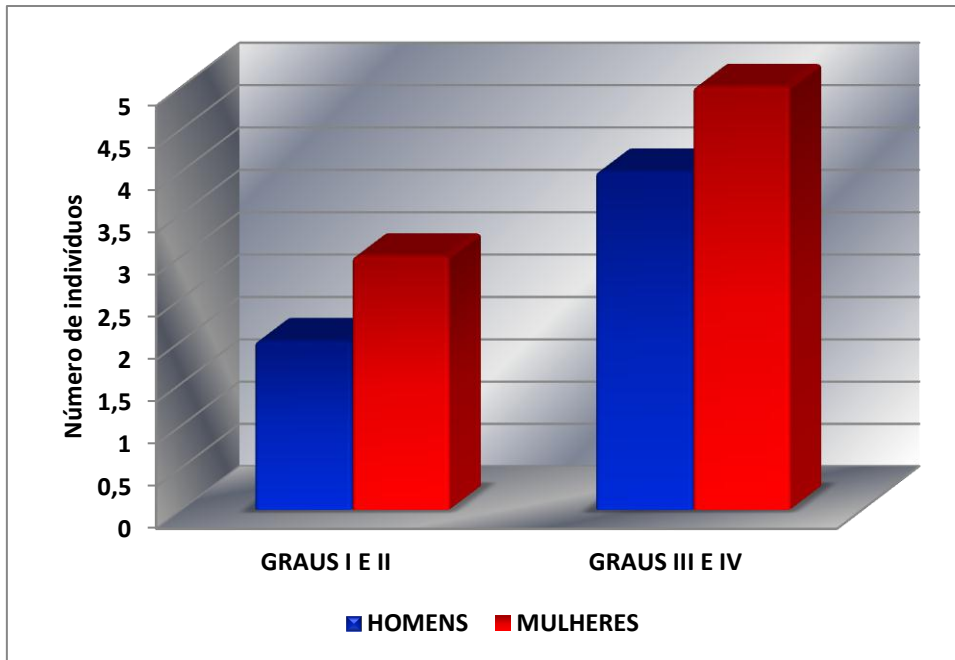


Figura 11: Gráfico mostrando a relação entre os graus de malignidade e o sexo do paciente.

Os resultados da análise de variância para comparação entre as médias de células em cada grupo são demonstradas nas figuras 12 a 15, comparando dados como a percentagem de células normais em relação à idade (figura 12) e percentagem de células normais ou alteradas em relação à malignidade (figuras 13 a 15).

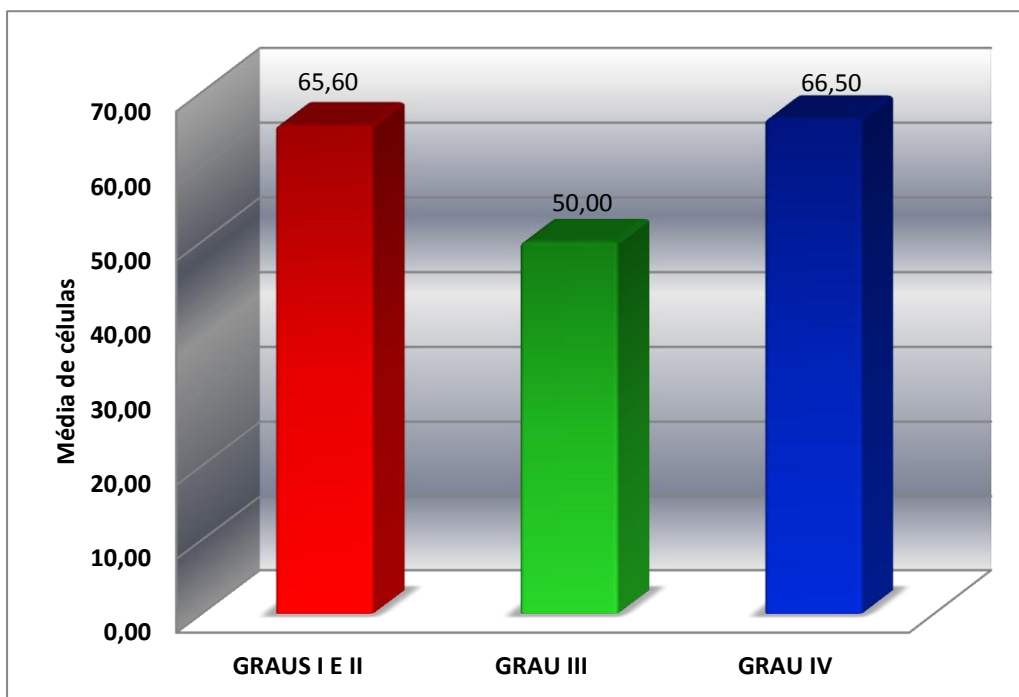


Figura 12: Análise de Variância comparando as médias de células normais de acordo com o grau de malignidade.

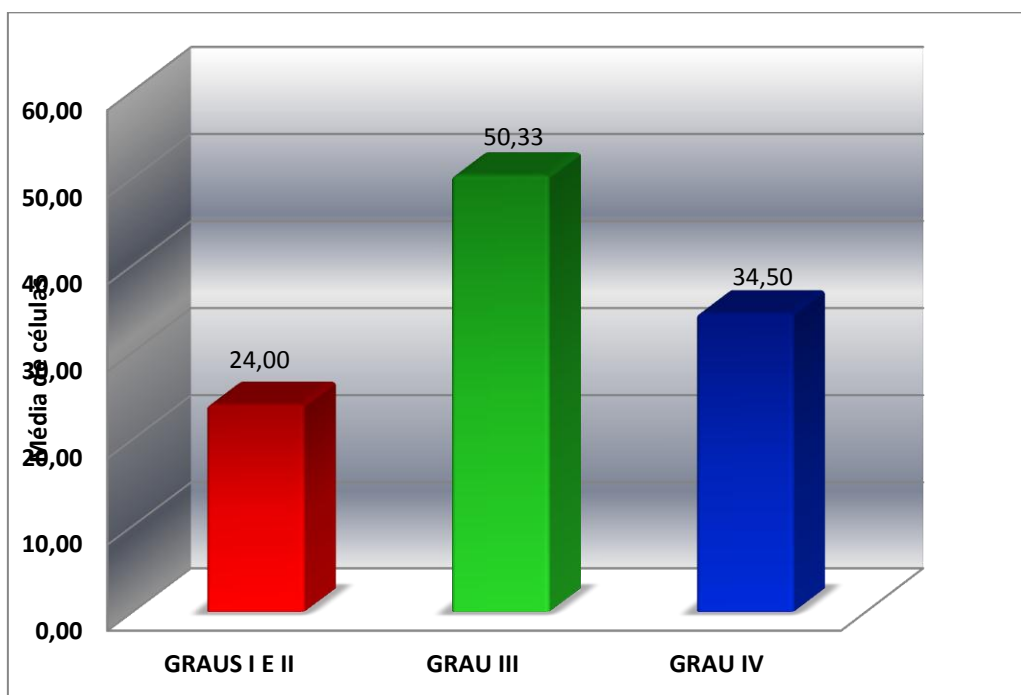


Figura 13: Análise de Variância comparando as médias de células com alterações de acordo com o grau de malignidade

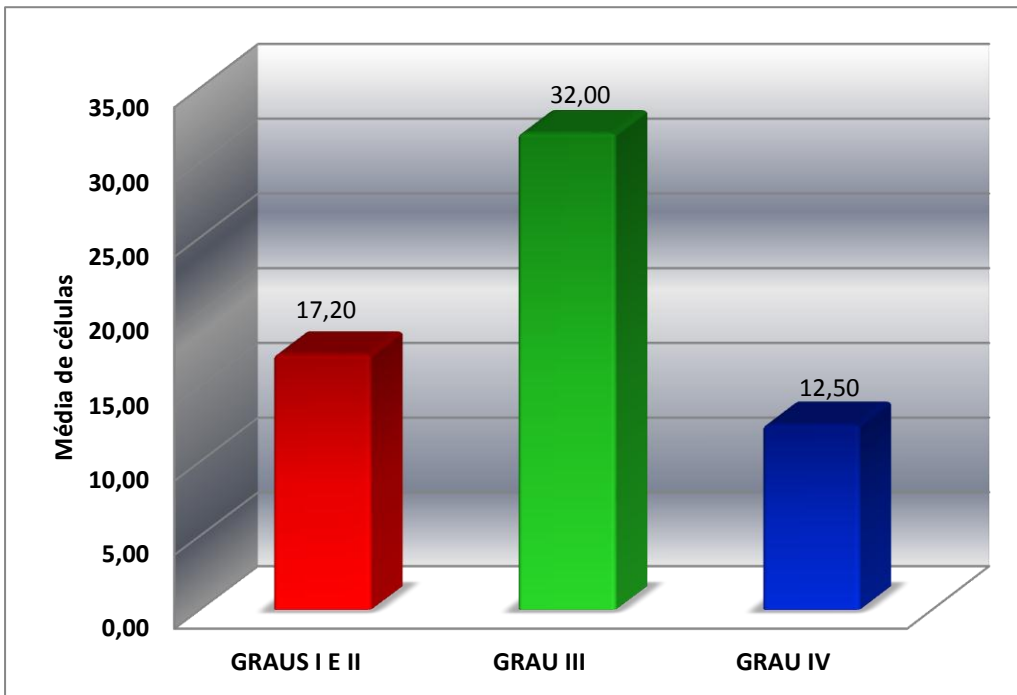


Figura 14: Análise de Variância da média de células com deleções do *TP53* de acordo com o grau de malignidade.

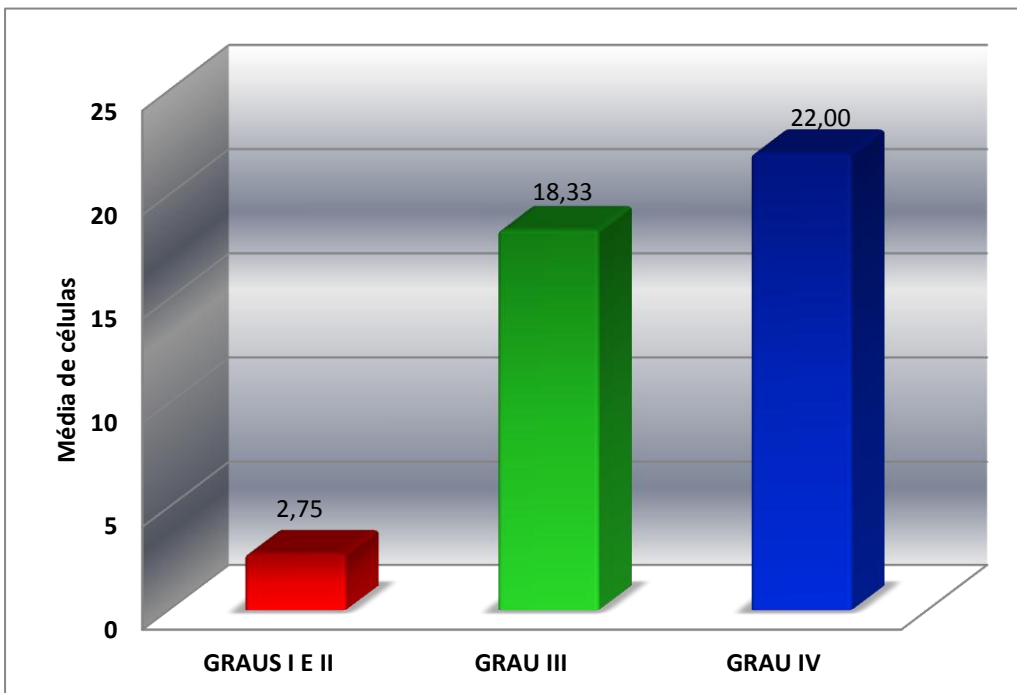


Figura 15: Análise de Variância da média de células com amplificações do *TP53* de acordo com o grau de malignidade.

### 3.3 EXPERIMENTOS DE SSCP

De 15 amostras coletadas, doze apresentaram resultados positivos para a análise de PCR-SSCP. Dessas, três eram de baixa malignidade (CSN010, CSN108 e CSN116) e nove de alta malignidade (CSN014, CSN017, CSN021, CSN031, CSN088, CSN101, CSN104, CSN146 e CSN154). Em todas elas, foram analisados os exons 4, 5, 7, 8, 9 e 10, consideradas regiões *hot spot* em relação a mutações no gene *TP53*. As amostras CSN005, CSN146 e CSN209 não apresentaram resultados positivos nas reações de PCR que permitissem sua análise por PCR-SSCP.

Apenas três éxons apresentaram indícios de alterações pela técnica de PCR-SSCP nas amostras analisadas: 5,7 e 10 (Tabela VI). Essas alterações foram observadas em gliomas com alto grau de malignidade (III e IV), sendo em dois glioblastomas multiformes (CSN014, éxons 5 e 10; CSN101, éxon 5) e dois astrocitomas anaplásicos de grau III (CSN031, éxons 5 e 7; CSN146, éxon 7) . Nenhuma amostra de baixa malignidade apresentou alterações nos éxons analisados, assim como dois dos quatro glioblastomas multiformes analisados.

Nas figuras 16, 17, 18 e 19 mostramos o resultado dos géis de poliacrilamida para um éxon sem alterações em nenhuma das amostras (figura 16, éxon 4), e dos três éxons que apresentaram alterações (éxons 5, 7 e 10 nas figuras 17, 18 e 19, respectivamente).



Tabela IV: Resultado das análises por SSCP (amostras CSN005, CSN114 e CSN209 não foram incluídos na análise por problemas técnicos).

CSN	GRAU	HISTOPATOLÓGICO	Exons	Alterações
116	I	Astrocitoma Pilocítico	4,5,7,8,9,10	-
108	I	Astrocitoma Sub-ependimário de Células Gigantes	7,8	-
10	II	Astrocitoma Fibrilar	4,5,7,8,9,10	-
31	III	Astrocitoma Anaplásico	4,5,7,8,9,10	5 e 7
88	III	Oligo-astrocitoma Anaplásico		-
146	III	Astrocitoma Anaplásico	4,5,7,8,9,10	7
14	IV	Glioblastoma Multiforme	4,5,7,8,9,10	5 e 10
17	IV	Glioblastoma Multiforme	4,5,7,8,9,10	-
21	IV	Glioblastoma Multiforme	4,5,7,8,9,10	-
101	IV	Glioblastoma Multiforme	4,5,7,8,9	5
104	IV	Glioblastoma Multiforme		-
154	IV	Glioblastoma Multiforme	4,5,7,8,9,10	-

CSN010 CSN014 CSN017 CSN021 CSN031 CSN088 CSN101 CSN104 CSN108 CSN116 CSN146 CSN154

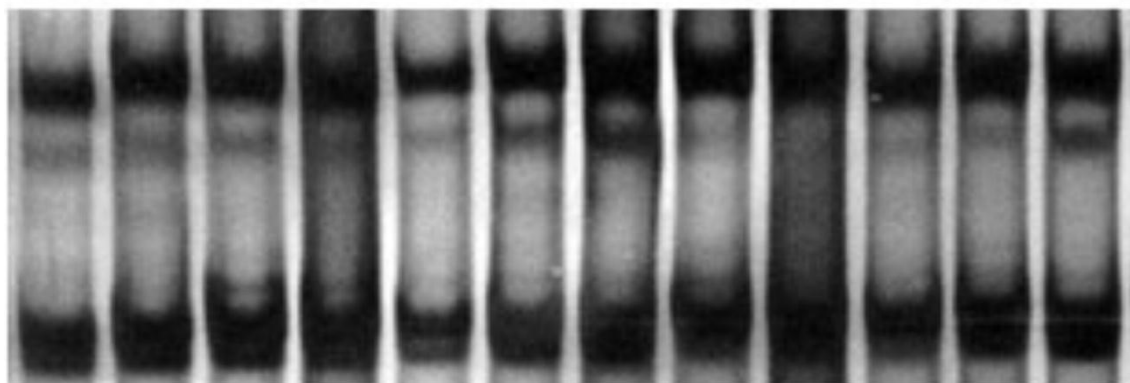


Figura 16 – Gel de poli-acrilamida exemplificando um éxon sem alterações em nenhuma das amostras (éxon 4). As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV.

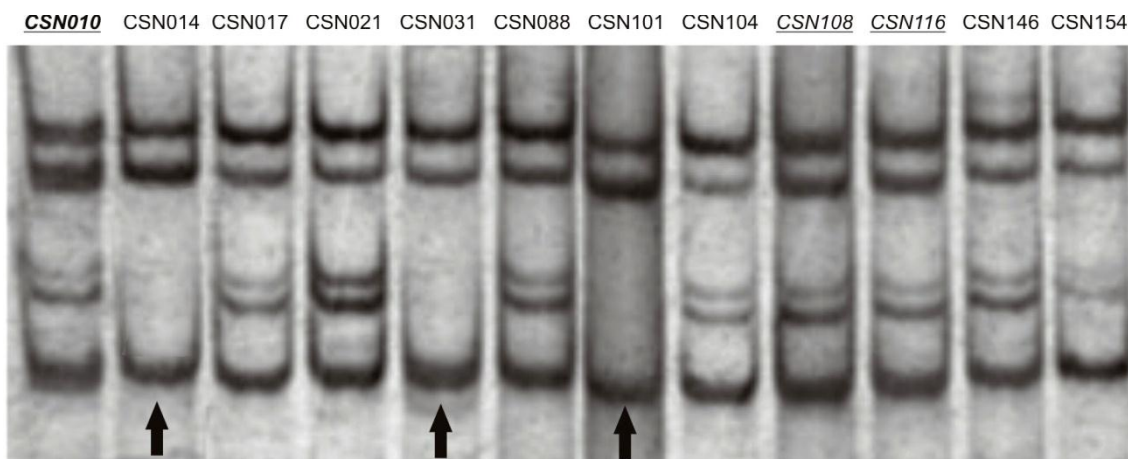


Figura 17 – Gel de poliacrilamida do éxon 5. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. As amostras CSN014, CSN031 e CSN101 apresentaram alterações no padrão de bandas (setas).

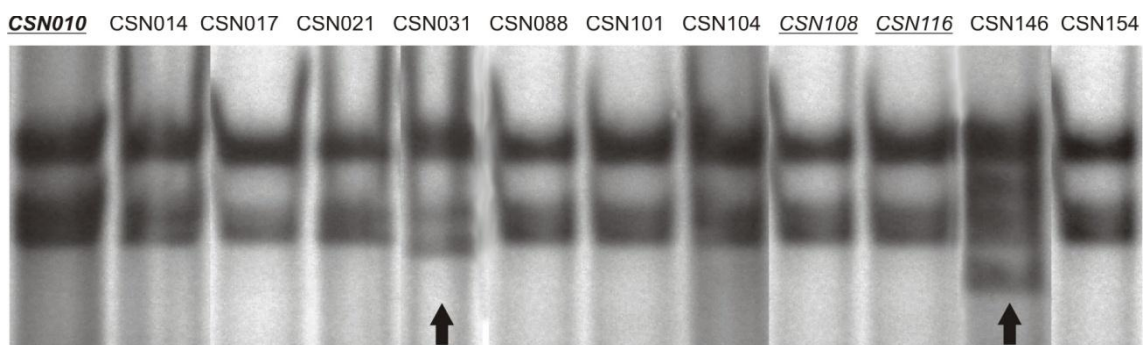


Figura 18 – Gel de poliacrilamida do éxon 7. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. O padrão de três bandas foi observado em todas as amostras, com exceção da CSN014 (seta) que apresentou uma banda extra.

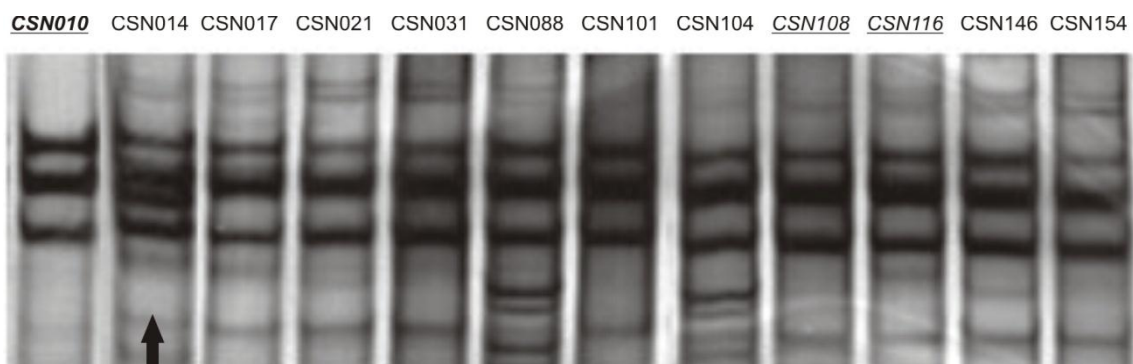


Figura 19 – Gel de poliacrilamida do éxon 10. As amostras em itálico e sublinhadas correspondem aos tumores de graus I e II, enquanto o restante corresponde aos graus III e IV. O padrão de três bandas foi observado em todas as amostras, com exceção da CSN014 (seta) que apresentou uma banda extra.

### 3. DISCUSSÃO

Os gliomas representam um grupo de neoplasias que tem origem em células de sustentação do sistema de nervoso central e que representam a grande maioria dos tumores encefálicos atingindo pacientes da terceira a sétima décadas de vida, grande parte deles numa fase altamente produtiva, cuja sobrevida pós-operatória, esta relacionado a características moleculares, histológicas, idade e desempenho neurológico (FELSBERG *ET AL.*, 2009).

Em gliomas de baixo grau (I e II) poucas alterações genéticas têm sido identificadas. Três grupos de alterações genéticas podem ser caracterizados nestes tumores: 1) com mutação no *TP53* e *IDH1/2* (32%), estes mais comuns nos astrocitomas difusos; 2) com LOH 1p19q e mutação no *IDH1/2* (37%) mais frequentes nos oligodendrogliomas; e 3) um grupo com somente mutação no *IDH1/2* (17%). A maioria dos astrocitomas pilocíticos são citogeneticamente normais (KIM *ET AL.*, 2010).

O projeto *Cancer Genome Atlas* tem revelado dados da expressão do mRNA e números de cópias de DNA alterados em um número significativo de glioblastomas multiformes. A combinação de todas as deleções homozigotas, ampliações focais e substituições de nucleotídeos revelaram três grandes vias que afetam uma grande porcentagem dos GBMs: 1) Via do receptor da tirosina quinase (88%); 2) via do *TP53* (87%); e 3) via de pRB (78%) (LINDA *ET AL.*, 2011). A via do *TP53* é muito importante na apoptose, senescência e parada do ciclo celular em resposta a lesão do DNA.

A classificação atual dos gliomas é baseada em sua aparência histológica, o que não é suficiente em muitas situações para definir com

perfeição os subtipos destes tumores o que poderia ser melhorado se a classificação for baseada em similaridades do perfil de expressão dos genes.

Mutações podem ocorrer por todo o comprimento do gene *TP53*; entretanto, mutações no segmento incluído entre os éxons 5 e 8 representam 94, 2% de todas as mutações somáticas registradas no banco de dados do *International Agency for Research on Cancer* (PETITJEAN ET AL., 2007). No presente estudo, incluímos a análise dos éxons 4 a 10 do gene *TP53*, através da técnica de PCR-SSCP, com o intuito de detectar a ocorrência de mutações.

Mutações podem ocorrer também como alterações no número de cópias do gene *TP53*, que podem ser perdidas por deleção, ou amplificadas pela ocorrência do ganho de cópias extras do cromossomo 17. As análises por FISH interfásico revelaram a ocorrência de ambos os casos – perdas ou ganhos de cópias – e as análises estatísticas buscaram a existência de algum significado dessas alterações com o grau de malignidade ou outra variável importante, como sexo, idade ou sobrevida dos pacientes.

Em relação à idade, a faixa etária foi variável entre 3 e 79 anos com uma mediana de 37.5. No cruzamento entre idade e células alteradas concluímos que a idade em anos não se mostrou associada ao grau de malignidade, ainda que considerando a grande amplitude total da amostra, o que vai de encontro a estudos de outros autores como LINDA ET AL (2011), e OHGAKI e KLEIHUES (2009), nos quais o fator idade aponta pior prognósticos para aqueles acima de 50 anos. Um fato de nossa casuística que talvez tenha levando a esta divergente conclusão seria que das 14 amostras, dois casos são referentes a pacientes muito jovens de três anos de idade, o que não é freqüente nas casuísticas em geral. STARK ET AL (2003) avaliaram 143

pacientes portadores de glioblastoma multiforme, os quais foram divididos de acordo com a idade (menos de 40 anos, entre 40 e 60 anos e acima de 60 anos), mensurando as proteínas p53, mdm-2 e EGFR, sendo observado que a expressão da p53 diminui conforme o aumento da idade enquanto as outras proteínas aumentaram suas expressões.

Segundo o Teste Exato de Fisher comparando a frequência do grau de malignidade com o sexo, verificou-se não haver importância significativa. Parece não haver hipóteses biológicas que corroborem um substrato teórico necessário para o desenvolvimento de estudos mais específicos relativos à relação do sexo nesta temática.

Núcleos normais com duas marcações representam a maioria, exceto em dois casos de GBM e um caso de astrocitoma grau II. As deleções corresponderam à alteração numérica mais observada em todas as amostras, seguido de amplificação. A aplicação do teste de Spearman revelou a inexistência de correlação entre a percentagem de células com deleção do *TP53* e a maior malignidade dos tumores. Entretanto, esta alteração foi encontrada com maior frequência nos paciente portadores de astrocitomas de grau intermediário (III). Considerando todas as células alteradas, o grau III foi o que apresentou o maior número quando comparados aos graus I, II e IV, valendo ressaltar que as alterações foram identificadas em todos os graus. Não há explicação alicerçada em hipóteses biológicas que justifiquem essa predominância, devendo ser levado em conta o pequeno número deste subtipo histológico na amostra estudada, o que pode ter produzido um viés estatístico.

As amostras classificadas como benignas (graus I e II) se comportaram como um grupo homogêneo tanto nas análises estatísticas (menor número de alterações nas cópias do gene *TP53*) como nas análises por PCR-SSC, na qual não se detectaram polimorfismos relacionados a possíveis mutações (apesar de, nessa técnica, apenas três das cinco amostras benignas terem sido analisadas, por problemas técnicos). Entretanto, a análise do histórico dos pacientes mostrou que, entre esses três casos benignos, um permaneceu benigno, enquanto dois evoluíram para malignidade no período observado. Assim, aparentemente, a possibilidade de malignização parece ser independente de mutações no número de cópias ou nos éxons analisados do *TP53*.

Apenas três éxons apresentaram indícios de alterações pela técnica de PCR-SSCP nas amostras analisadas: 5, 7 e 10. Essas alterações foram observadas em gliomas com alto grau de malignidade (III e IV), sendo dois glioblastomas multiformes (CSN014, éxons 5 e 10; CSN101, éxon 5) e dois astrocitomas anaplásicos de grau III (CSN031, éxons 5 e 7; CSN146, éxon 7). Apesar disso, os pacientes do grupo de tumores malignos evoluíram todos para óbito num tempo máximo de 16 meses, após tratamento cirúrgico, radio e quimioterápico. Entretanto, aqueles onde foram observadas alterações, corresponderam aos pacientes de menor sobrevida após tratamentos, permitindo uma associação entre a presença de mutações nos éxons 5, 7 e 10 com uma maior agressividade tumoral. Com exceção do éxon 10, os éxons que apresentaram mutações estão contidos na região onde mais de 90% das mutações desse gene estão localizadas (PETITJEAN ET AL., 2007). Uma menor sobrevida em pacientes apresentando mutações nos éxons de 5 a 8 também

foi observada em casos de tumores de ovário (WEN ET AL., 2000), o que reforça a maior agressividade de tumores com alterações na seqüência de nucleotídeos do gene *TP53*.

No trabalho de VON DEIMLING ET AL (1994) foi avaliado o gene *TP53* em 22 astrocitomas grau II e III, sendo observadas mutações em três dos oito tumores grau II e em quatro dos quatorze grau III, concluindo que mutações neste gene não são restritas aos grau IV, corroborando com a afirmação de que alterações da via p53 são um evento genético precoce na gênese deste tipo de tumor, o que também foi demonstrado em nosso estudo.

Um outro estudo (LOUIS E CAVENEE, 2003) revisou a biologia molecular dos tumores do SNC onde observaram que as alterações no gene *TP53* estão presentes em estágios precoces da tumorigênese dos astrocitomas em aproximadamente 30% dos casos, também em concordância com nossos resultados, sugerindo que a inativação desta molécula é importante na formação e evolução de tumores de baixo grau.

Um aspecto interessante que pode justificar resultados divergentes em trabalhos de vários autores é que a expressão da p53 pode ser diferente em populações distintas, dependendo da área geográfica estudada, o que pode acontecer por existirem diversos fatores mutagênicos ambientais em diversas regiões do mundo (SHIELDS E HARRIS, 1991). Como exemplo, um estudo genético de DAS ET AL (2002) avaliou a incidência de GBM na população asiática, haja visto que a incidência desta patologia na população de Cingapura era apenas de 25% entre as neoplasias primárias do SNC, bem menor do que a média mundial de 40 a 60%. Neste estudo foram analisados os genes *EGFR*, *MDM-2*, *PDGRF-ALFA*, a proteína p53 e o gene *TP53* em 39 pacientes

asiáticos portadores de GBM, e os resultados sugeriram que ambas as vias genéticas, tanto para GBM primários quanto para secundário estavam presentes na maioria dos tumores, sugerindo um modelo de carcinogênese do GBM diferente da população mundial.

A detecção de modificações tanto no número de cópias como na seqüência do gene *TP53* no presente estudo, e em vários outros estudos realizados não só com tumores de sistema nervoso central, mostra que a importância de alterações nesse gene, e conseqüentemente na proteína TP53, é fundamental no processo de carcinogênese. Entretanto, mesmo com o grande número de estudos, com diferentes metodologias e diferentes tipos tumorais, ainda não se foi obtido uma definição da relação entre as distintas alterações do gene *TP53* e o estadiamento ou agressividade tumoral. Apesar da sugestão de KLEIHUES E CAVENEE (2000) de que a classificação de tumores de sistema nervoso central deva incluir aspectos relacionados com alterações no *TP53*, até o momento não há uma compilação de dados referentes a essas alterações que associem indubitavelmente certos tipos de alterações com determinados tipos tumorais ou graus de malignidade.



#### 4. CONCLUSÕES

- Alterações no número de cópias do gene TP53 foram encontradas em amostras correspondendo a todos os graus de malignidade, sugerindo uma participação dessas alterações desde o início do processo de malignização.
  
- Tumores de grau III apresentaram a maior frequência de alterações numéricas do gene TP53, sugerindo uma via de malignização alternativa entre graus III e IV.
  
- Não houve correspondência entre alterações no número de cópias do gene *TP53* e o sexo, idade ou grau de malignidade tumoral em gliomas.
  
- Os éxons 5, 7 e 10 apresentaram-se polimórficos na amostra. Não houve correlação entre alterações nesses exons e malignidade tumoral. Entretanto, as amostras polimórficas corresponderam a pacientes com menor tempo de sobrevida após o tratamento, sugerindo uma ligação entre a presença dessas alterações e a agressividade tumoral.

## 5. REFERENCIAS

- AMBROSE D, RESNICOFF M, COPPOLA D(1994). Growth regulation of human glioblastomas T98G cells by insulin-like growth factor-1 its receptor. *J Cell Physiol* 159:92.
- ANDERSEN LB, FOUNTAIN JW, GUTMANN DH, *et al*(1993). Mutation in neurofibromatose 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nature genetics* 3: 118.
- ANKER L., OHGAKI H. ET AL. (1993). P53 accumulation and gene mutation in human glioma. *Int. J. Cancer.* 55:982-987
- ANSELMO NP (2003). Estudos moleculares em tumores cerebrais humanos. Tese apresentada junto ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- ARENDIS JW. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol*;190:412–6.
- AYRES, M.; AYRES, M.J.; AYRES, D.L.; SANTOS, A. de A. dos. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências bilógicas e médicas. Belém Sociedade Civil mamiraua/CNPQ. 2009.
- BARBOSA, R.N.F. (2007) Dissertação de Mestrado: **Análise molecular dos éxons 8 a 11 do gene da p53 em amostras de câncer de colo do útero no Rio Grande do Norte.** Natal-RN. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 66pp.
- BARKER FG, DAVES, RL, CHANG, SM, PRADOS, LD (1996). Necrosis as prognostic factor in GBM. *Cancer* 77:1161-1786.
- BAYLIN, SB (1997). Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science*, 277: 1948-1949.
- BAYLIN SB, HERMAN JG (2000). Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 249: 35-34.
- BAUMAN G., LOTE K. ET AL.(1999). Pré-treatment factores predict overall survival for patients with low grade gliomas: A recursive partitioning analysis. *J. Radiot. Oncol. Biol. Phys.* 45:923-929

- BELLO, M.J.; ALONSO, M.E.; AMINOSO, C.; ANSELMO, N.P.; ARJONA, D.; GONZALEZ-GOMEZ, P.; LOPEZ-MARIN, I.; DE CAMPOS, J.M.; GUTIERREZ, M.; ISLA, A.; KUSAK, M.E.; LASSALETTA, L.; SARASA, J.L.; VAQUERO, J.; CASARTELLI, C. & REY, J.A. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. **Mutation Research**. **554**: 23-32. 2004.
- BECKMAN RA & LOEB LA (2005). Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Seminars Cancer Bio* 15:423-435.
- BIERNAT W., HUANG H., ET AL. (2004). Predominant expression of mutant EGFR is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol*. 14:131-136.
- BLACK PM (1991). Brain tumors (second part). *N Engl J Med* 324: 1555-1564.
- BOURDON, J.C.; FERNANDES, K.; MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LIU, G.; DIOT, A.; XIRODIMAS, D.P. SAVILLE, M.K. & LANE, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Development*, 15;19(18); 2122-2137.
- BRALTEN, LBC, FRENCH, PJ (2011). Genetic Alterations in Gliomas. *Cancer* 3: 1129-1140
- BREIVIK J. *Seminars in Cancer Biology*. 15 (2005) 51-60.
- BURGER KL (1987). Patient age histological features and survival patients with GBM. *Cancer* 59:1617-1625
- BURGER O., HUANG H. J. ET AL. (1995). The P53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*. 15:308-327.
- BURZYNSKI SR (2003). Gene silencing - a new theory of aging. *Med Hypotheses*, 60 (4): 578-583.
- CARR J, BELL E, PEARSON AD, et al. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res* 2006;66:2138 – 45.
- CHAKRAVART ET AL. The contribution of Epidermal growth factor receptor (EGFR) Signaling pathway to resistance in human gliomas: A review of preclinical and correlative clinical data. *Int J. Radiation Oncology Biol Phys* Vol 58 n 3 pp927-931, 2004.

- CHIN, L. & MEYERSON, M(2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455: 1061-1068.
- CHOE ET AL. Analyses of the phosphatidylinositol 3'- kinase signaling pathway in glioblastoma Patients *in vivo*. *Cancer Research* 63, 2742-2746, 2003.'
- CHOZICK BS, PEZZULLO JC, EPSTEIN HH. (1994). Prognóctic implications of p53 overexpression in supratentorial astrocytic tumors. *Neurosurgery*. 35: 831-837.
- CRISTOFANO A D and PANDOLFI P P. The multiple roles of PTEN, in tumor suppression. *Cell*, vol 100, 387-390, February 18, 2000.
- DAS, A. TAN, WL, TEO, JM SMITH, DR (2002). Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 302-206.
- DEY, P. (2005).Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J. Clin. Pathol* 57;1245-1249.
- EL-DEIRY WS, HARPER, JW, O'CONNOR PM(1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54:1164.
- EYFJORD, J.E.; THORLACIUS, S.; STEINARSDOTTIR, M.; VALGARDSOTTIR, R.; OGMUNDSDOTTIR, H.M. & ANAMTHAWAT-JONSSON, K. p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. **Cancer Research**, 55: 656-651. 1995.
- EVANS, G. & LITTLEWOOD, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322.
- EVANS, GI, VOUSDEN, KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis. *Nature* 411, 342, 2001
- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Site didático de anatomia patológica, neuropatologia e neuroimagem. 2009. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas> Acesso em: Nov/2009.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo (FMRPUSP). Disponível em: <http://lgmb.fmrp.usp.br/dgfto/.../APOSTILA-GENETICA E CÂNCER.doc> Acesso em nov/2009.

- FAN, K.J. & PEZESHKPOUR, G.H. Ethnic distribution of primary central nervous system tumors in Washington, DC, 1971 to 1985. **Journal of National Medicine Association**, **84**: 858-863. 1992.
- FEINBERG AP (2001). Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2): 392-394
- FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol*, Nov; 31(6): 247-251, 1956.
- FRANKS, L. M. & TEICH, N. (1990) Introdução à biologia celular e molecular do cancer. 1ª ed. Roca, São Paulo, p. 1-238.
- FURNARI, F.B.; FENTON, T. & BACHOO, R.M. Malignant Astrocytic Glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, **21**: 2683-2710. 2009.
- FUKUSHIMA, T.; FAVEREAUX, A.; HUANG, H.; SHIMIZU, T.; YONEKAWA Y.; NAKAZATO Y.; & OHAGKI, H. (2006) Genetic alterations in primary glioblastomas in Japan. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(1): 12-18.
- GOLLIN, S.M. (2005). Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin in Cancer Biol* 15 (2005) 33–42.
- GORRINGE KL, CHIN SF, M PHAROAH, P, STAINES JM, OLIVEIRA C ET AL. (2005). Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer. *Carcinogenesis* 26(5):923-930.
- HAGAN CR & RUDIN CM (2002). Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications. *Am J Pharmacogenomics*, 2 (1): 25-35.
- HARRIS CC (1996) The 1995 Walter Hubert Lecture--molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene. *Br. J. Cancer*; 73(3): 261-269.
- HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (18): 9821-9826.
- HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T, HAMOU MF, DE TRIBOLET N, WELLER M, KROS JM, HAINFELLNER JA, MASON W, MARIANI L,

- BROMBERG JE, HAU P, MIRIMANOFF RO, CAIRNCROSS JG, JANZER RC, STUPP R (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352:997–1003
- HIESIGER EM, HAYES RL, PIERZ DM (1999). Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor and c-neu/erb B2 expression in GBM. *J neurooncology* 16:93.
- HOFFEE P.A. *Medical Molecular Genetics*. Pittsburgh-PA: University of Pittsburgh School of Medicine, 2000. 319pp.
- HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN, P (1991). P53 mutation in human cancers. *Science* 253:49-53.
- HOWELL CY, BESTOR TH, DING F, LATHAM KE, MERTINEIT C, TRASLER JM, CHAILLET JR (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104 (6): 829-838.
- HU, L, TROYANOVSKY B, ZHANG X, TRIVEDI P, ERNBERG I, KLEIN G (2000). Differences in the immunogenicity of latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus genomes derived from LMP1-positive and -negative nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 60 (19): 5589-5593.
- ICHIMURA K., SCHMIDT EE ETAL, (1998). Distinct patterns of deletion on 10p and suggest in involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas malignancy grades. *Cancer* 22:9-15.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Acesso em: Dez/ 2009.
- ISHII N., TADA M. ET AL. (1999). Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumores evolve clonally to malignancy and unfavorable prognostic factor. *Oncogene*. 18: 5870-5878.
- ISSA JP (2002). Epigenetic variation and human disease. *J Nutr.* 132(8 Suppl): 2388S-2392S.
- JAMES CD, CARLBOM E, DUMANSKI HJ (1988) Clonal genomic alteration in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48: 5546-5551.
- JAMES CD, CARLBOM E, NURDENSJOLD, COLLINS, VP, CAVENEE, WK (1988). Mitotic recombination of chromosomal 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2858-2862.

- JONES PA & LAIRD PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 21 (2): 163-167
- JONES PA & BAYLIN SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3 (6): 415-428.
- KAMB, A, GRUIS NA, WEAVER-FELDHAUS J, LIU Q, HARSHMAN K, TAVTIGIAN SV, STOCKERT S, DAY RS 3RD, JOHNSON BE, SKOLNICK MH (1994). A cell cycle regulation potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436.
- KOSCHNY, R., KOSCHNY, T., FROSTER, U.G., KRUPP, W., ZUBER, M.A. (2002). Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 135 (2002) 147–159
- KLEIHUESP, ET AL (2002). Histological typing of tumors of the nervous system. *World Health Organization. International histological classification.*
- KRETH F. W., FAIST M. ET AL (1997). Supratentorial WHO grau II astroцитomas and oligodendrogliomas. *Câncer.* 79: 370-379.
- KRUPP W, GEIGR K, SCHOB R, SIEGERT G, ET AL(2004).Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis in diffuse astrocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 153:32-38.
- LANE, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, **358**(6381): 15-16. 1992.
- LENGAUER C & ISSA JP (1998). The role of epigenetics in cancer. DNA Methylation, Imprinting and the Epigenetics of Cancer--an American Association for Cancer Research Special Conference. Las Croabas, Puerto Rico, 12-16 1997 December. *Mol Med Today*4 (3):102-103.
- LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B.(1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643–9.
- LYNCH HT, KRUSH AJ, HARLAN WL, SHARP EA (1973). Association of soft tissue sarcoma, leukemia and brain tumors in families affected with breast cancer. *Am J Surg* 39:199-266.
- LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W. & KLEIHUES, P. The WHO Classification of tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathology**, **114**: 97-109. 2007.

- LOUIS, DN, CAVENEE, WK (2003). Molecular biology of central nervous system tumors. Brain Tumor Center. Disponível em <http://brain.mgh.harvard.edu/moleculargenetics.htm>
- MALMER, B.; ISELIUS, L.; HOLMBERG, E.; COLLINS, A.; HENRIKSSON, R. & GRONBERG, H. Genetic epidemiology of glioma. **British Journal of Cancer**, **84**: 429-434. 2001.
- MEYEL J., RAMSEY ET AL. (1994). P53 mutation, expression and DNA ploidy in involving gliomas: Evidence for two pathways of progression. *J Natl.Cancer Inst.* 86:1011-1017.
- NELSON WG, DE MARZO AM, DEWEESE TL, LIN X, BROOKS JD, PUTZI MJ, NELSON CP, GROOPMAN JD, KENSLER TW (2001). Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 952: 135-144.
- NEWCOMB EW COHEN H, LEE SR, BHALLA SK, BLOOM J, HAYES RL, MILLER DC,1998. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGRF, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 8 (4):655-667.
- NEUMEISTER P, ALBANESE C, BALENT B, GREALLY J, PESTELL RG (2002). Senescence and epigenetic dysregulation in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.*34 (11): 1475-1490.
- NOVAK MA ET AL. The Role of chromosomal instability in tumor initiation. *PNAS*, December 10, 2002, vol 99n 25.
- OHGAKI H., EIBL R. ET AL. (1993).Mutations of the P53 tumor supressor gene in neoplasms of the human nervous sistem. *Mol. Carcinog.*8:74-80.
- OHGAKI H., DESSEN P. ET AL (2004). Genetic pathways to glioblastomas: a population based study. *Cancer Res.* 64:6892-6899.
- OHGAKY H., KLEIHUES P., (2007). Genetic Pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170:1445-1453
- OHGAKI, H. Epidemiology of Brain Tumors. *Methods of Molecular Biology, Câncer Epidemiology*, 472: 323-342. 2009.
- OHGAKI H., KLEIHUES P., (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science.*Vol 100, numero 12:2235-2241.



- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYSHI K, SEKIYA T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (8): 2766-2770.
- OSHIMA, H., BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, 305: 253-264. 1994.
- OTO M, MIYAKE S, YUASA Y (1993). Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem.* 213 (1): 19-22.
- PAVARINO-BERTELLI, EC; QUEIROZ, RGP; RODRIGUES, FC. TAPPARO, L; SILVA JUNIOR, W; ARAUJOTEH (2002). Skin carcinogenesis in southeastern Brazil: analysis of TP53 gene in nonmelanoma skin tumors. *An. bras. dermatol*;77(1):35-44
- PERAUD A, FRIEDRICH W, ET AL (2002). Prognostic of TP53 mutations and P53 overexpression in Supratentorial WHO grau II astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Clinical Cancer Reserch*, Vol 8:1117-1124.
- PERERA FP (1997). Environment and cancer: who are susceptible? *Science*, 278:1068-1073.
- PETITJEAN A ET AL. Impact of mutantp53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutant* 28:622-629, 2007.
- PETO J (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*411 (6835): 390-395.
- PETO J & HOULSTON RS (2001). Genetics and the common cancers. *Eur. J. Cancer* 37 (Suppl 8): S88-S96
- PINTO, G.R.; YOSHIOKA, F.K.N.; SILVA, R.L.L.; CLARA, C.A.; SANTOS, M.J.; ALMEIDA, J.R.W.; BURBANO, R.R.; REY, J.A. & CASARTELLI, C. (2008). Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7(1): 207216..
- RASHEED, B.K., MCLENDON, R.E., HERNDON, J.E., FRIEDMAN, H.S., FRIEDMAN, A.H., BIGNER, D.D., BIGNER, S.H. (1994) Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res.* 54: 1324-1330

- REIFENBERGER G., LIU L., ET AL(1993). Amplification and overexpression of the MDM2 in a subset of human malignant gliomas without P53 mutations. *Cancer Res.* 53:2736-2739.
- RIDEOUT WM 3RD, EGGAN K, JAENISCH R (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*293 (5532): 1093-1098.
- RINGERTZ J(1990). Grading of gliomas. *Acta pathol microbial Scand* 27:51-64.
- ROBERTSON KD & WOLFFE AP (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.*1 (1): 11-19.
- ROTHMAN N, WACHOLDER S, CAPORASO NE, GARCIA-CLOSAS M, BUETOW K, FRAUMENI JF JR (2001). The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochim Biophys Acta* 1471 (2): C1-C10.
- SALLINEMETAL.Arm -Specific multicolor fluorescence in situ hybridization reveals widespread chromosomal instability in gliomas cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 144 (2003), 52-60.
- SALCMAN M, SALOMUN L (1984). Ocurrence of glioblastomas multiform in three generation of cancer family. *Neurosurgery* 14:557-561
- SALCMAN M(1990). The natural history of low grade In Apuzzo MLS. Ed Benig cerebral glioma. *American Associantion Neurological Surgery Illinois*,213-229.
- SALCMAN M. Terapeutic implications of the natural of low-grade glial tumors. In Salcman M (ed) current techniques in neurosurgery, 2 ed. philadelphia: Curent Medicine/Churchil Livingstone, 1996. P109-122.
- SALCMAN M(1998). Implication of the natural history of low grade glial tumors. In Salcman M (ed) Current Techiques in neurosurgery. 2 ed, Philadelphia. *Cur Medicine* 109-122.
- SALCMAN M(1991). Neurobiology of brain tumors. *In: Concepts in Neurosurgery.* Willian & Wilkins(Ed) vol 4: 386p .
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- SANGER F., NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors *Proc Nat Acad Sci USA*, 74:5463-5467
- SANSON M, THILLET J, XUAN K.(2004). Molecular changes in gliomas. *Limppincott Willian and Wilkins*:1040-8746.
- SCHMIDEK HH(1987). The molecular genetics of nervous system tumors. *J Neurosurg* 67:1-16.
- SIQUEIRA GM E NOVAES V (1998). Tumores intracranianos. Biologia, Diagnóstico e tratamento. Ed Ravinter. São Paulo.
- SHAPIRO ET AL.,(1986). Radiation-induced intracranial malignant gliomas. *J Neurosurg*. 71:77-82.
- STARK, AM, WITZEL, P, STREGE, RJ, HUGO, HH, MEHDORN, HM (2003). p53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:779–783
- STELL GG, (1977). Growth kinetics of tumors. *Clarendon Press Oxford*.
- TAIOLI, E (2002). International collaborative study on genetic susceptibility to environmental carcinogens. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 8: 727–728.
- TAMURA, M, GU, J, DANEM, EHJ, TAKINO, T, MIYAMOTO, S, YAMADA, KM (1999). PTEN Interactions with Focal Adhesion Kinase and Suppression of the Extracellular Matrix-dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 20693-20703.
- TAO Q, SWINNEN LJ, YANG J, SRIVASTAVA G, ROBERTSON KD, AMBINDER RF (1999). Methylation status of the Epstein-Barr virus major latent promoter C in iatrogenic B cell lymphoproliferative disease. Application of PCR-based analysis. *Am J Pathol*155 (2): 619-625.
- TAKACS M, SALAMON D, MYOHANEN S, LI H, SEGESDI J, UJVARI D, UHLIG J, NILLER HH, WOLF H, BERENCSI G, MINAROVITS J (2001). Epigenetics of latent Epstein-Barr virus genomes: high resolution methylation analysis of the bidirectional promoter region of latent membrane protein 1 and 2B genes. *Biol Chem*. 382 (4): 699-705
- TIERNEY RJ, KIRBY HE, NAGRA JK, DESMOND J, BELL AI, RICKINSON AB (2000). Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-

- regulation during virus-induced B-cell transformation. *J Virol.* 74 (22): 10468-10479.
- TIERNEY EF, GEISS LS, EENGELAU MM, THOMPSON TH, SCHAUBERT D, SHIRELEY LA, et al. Populationbased estimates of mortality associated with diabetes:use of a death certificate check box in North Dakota. *Am J Public Health* 2001; 91:84-92.
- VAN MEIR EG, HADJIPANAYIS CG, NORDEN AD, SHU HK, WEN PY, OLSON JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:166-93.
- VERMA M & SRIVASTAVA S (2002). Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.* 3 (12): 755-763.
- VON DEIMLING A, LOUIS DN, SCHRAMM J, WIESTLER OD. (1994). Astrocytic gliomas: characterization on a molecular genetic basis. *Recent Results Cancer Res* 135: 33–42
- WATANABE K, SATO K, BIERNAT W, TACHIBANA O, VON AMMON K, OGATA N, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin. Cancer Res.* 3: 523-530.
- WEN PY ET AL(1995). *Neurologic clinics – Brain tumors in adult* 13:4,701-721.
- WEN PY ET AL, 2000. Comparison of TP53 Mutations identified by Oligonucleotide Microarray and Conventional DNA Sequence Analysis. *Cancer Res* 60; 2716-2722.
- WONG AJ, BIRGER SH, BIGNER DD, KINZLER KW, HAMILTON SR, VOLGELSTEIN B (1987). Expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Protec Natl Sci USA* 84:68-99.
- WU JK, FOLKERTH RD, YE Z DARRAS, TB (1993). Aggressive oligodendrogliomas predict by cromossomome 10 restriction fragment length polymorfism analysis. Case study. *J Neurooncology* 15:29-35.
- YOUMANS, JR (1980). A comprehensive reference guide to the diagnosis and management of neurological problems. In: *Neurological surgery*, Vol. 5, 2<sup>nd</sup> ed., Sauders Philadelphia.

- YAMAGUCHI K., SUGENO K., ET AL(1997). Polymerase chain reaction loss in the P53 tumor supressor gene in colon neoplasm. *Am J. Gastroenterol.* 92:307-312.
- YUASA Y (2002). DNA methylation in cancer and ageing. *Mech Ageing Dev.*123 (12): 1649-1654.
- ZILFOU, J.T. & LOWE, S (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring HarboPerspectives in Biology*, 1: 1-11.
- ZHENG, T.; CANTOR, K.F.; ZHANG, Y.; KEIM, S. & LYNCH C.F. (2001) Occupational risk factors for brain câncer: a population-based case-control study in Iowa. *Journal of Occupational and Environment Medicine*, 43: 317-324.
- ZULCH KJ (1986). Brain tumors. Their Biology and Pathology. *Springer*.

## **ANEXOS**


**Anexo I: Parecer do Comitê de Ética****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 Guamã 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

## Anexo II: Termo de Livre Consentimento

### ANEXO II: TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Universitário João de Barros Barreto - HUUJBB, 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 estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

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 encaminhado 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. Edivaldo H.C. de Oliveira ou com o Prof. Dr. Nilson P. Anselmo, através dos telefones 3183-1568 ou 3183-1558.

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 III: Estatística Descritiva

#### EM RELAÇÃO À IDADE

Tamanho da amostra =	14
Mínimo	3.00
Máximo	79.00
Amplitude Total	76.00
Mediana	37.50
Média Aritmética	38.29
Variância	678.99
Desvio Padrão	26.06
Erro Padrão	6.96
Coeficiente de Variação	68.06%

#### EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CÉLULAS NORMAIS

Tamanho da amostra =	14
Mínimo	24.00
Máximo	91.00
Amplitude Total	67.00
Mediana	68.00
Média Aritmética	62.57
Variância	340.73
Desvio Padrão	18.46
Erro Padrão	4.9333
Coeficiente de Variação	29.50%

#### EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CÉLULAS COM ALTERAÇÕES

Tamanho da amostra =	14
Mínimo	9.00
Máximo	76.00
Amplitude Total	67.00
Mediana	32.00
Média Aritmética	37.86
Variância	332.75
Desvio Padrão	18.24
Erro Padrão	4.88
Coeficiente de Variação	48.18%

#### EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CÉLULAS COM DELEÇÃO

Tamanho da amostra =	14
Mínimo	1.00
Máximo	42.00
Amplitude Total	41.00
Mediana	18.50
Média Aritmética	18.36
Variância	173.79
Desvio Padrão	13.18
Erro Padrão	3.52
Coeficiente de Variação	71.81%

#### EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CÉLULAS COM AMPLIFICAÇÃO

Tamanho da amostra =	14
Mínimo	1.00

Máximo	75.00
Amplitude Total	74.00
Mediana	19.00
Média Aritmética	19.50
Variância	369.50
Desvio Padrão	19.22
Erro Padrão	5.14
Coefficiente de Variação	98.58%

### **CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON (PARA DADOS PARAMÉTRICOS)**

#### IDADE E NÚMERO DE CÉLULAS NORMAIS

r (Pearson) = -0.2124  
p = 0.4659 (SEM CORRELAÇÃO)

#### IDADE E NÚMERO DE CÉLULAS ALTERADAS

r (Pearson) = 0.2399  
p = 0.4087 (SEM CORRELAÇÃO)

#### IDADE E CÉLULAS COM DELEÇÃO

r (Pearson) = 0.0154  
p = 0.9584 (SEM CORRELAÇÃO)

#### IDADE E CÉLULAS COM AMPLIFICAÇÃO

r (Pearson) = 0.2172  
p = 0.4558

### **CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (PARA DADOS ORDINAIS, não distribuídos normalmente)**

#### GRAU DE MALIGNIDADE E NÚMERO DE CÉLULAS NORMAIS

rs = -0,0878  
p = 0,7659 (SEM CORRELAÇÃO)

#### GRAU DE MALIGNIDADE E NÚMERO DE CÉLULAS COM ALTERAÇÕES

rs = 0,1385  
p = 0,6368 (SEM CORRELAÇÃO)

#### GRAU DE MALIGNIDADE E NÚMERO DE CÉLULAS COM DELEÇÃO

rs = -0.2174  
p = 0,4553 (SEM CORRELAÇÃO)

#### GRAU DE MALIGNIDADE E NÚMERO DE CÉLULAS COM AMPLIFICAÇÃO

n (pares) = 14  
r = 0,5562  
p = 0,0388 (CORRELAÇÃO MODERADA POSITIVA)

**PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE CÉLULAS EM CADA GRUPO****EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS NORMAIS**

GRAUS I E II	GRAU III	GRAU IV
91	68	60
77	44	74
68	37	77
68		68
24		75
		45
Média=65,60	Média=50,00	Média=66,50
F=0,9256; p=0,5724		

**EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS ALTERADAS**

GRAUS I E II	GRAU III	GRAU IV
9	32	40
23	56	32
32	63	23
32		32
		25
		55
Média=24,00	Média=50,33	Média=34,50

F=8,2352; p=0,00095

Teste de Tukey para comparar as médias individualmente

Graus I e II  $\neq$  Grau III:  $p < 0,05$ Graus I e III = Grau IV:  $p < 0,05$ Grau III  $\neq$  Grau IV:  $p < 0,05$ **EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS COM DELEÇÃO**

GRAUS I E II	GRAU III	GRAU IV
8	21	32
19	33	5
31	42	4
27		13
1		3
		18
Média=17,20	Média=32,00	Média=12,50

F=4,4681; p=0,0373

Teste de Tukey para comparar as médias individualmente

Graus I e II  $\neq$  Grau III:  $p < 0,05$ Graus I e III = Grau IV:  $p < 0,05$ Grau III  $\neq$  Grau IV:  $p < 0,05$ **EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS COM AMPLIFICAÇÃO**

GRAUS I E II	GRAU III	GRAU IV
1	11	8
4	23	27
1	21	19
5		19
		22
		37
Média=2,75	Média=18,33	Média=22,00

F=8,2844; p=0,0078

Teste de Tukey para comparar as médias individualmente

Graus I e II  $\neq$  Grau III:  $p < 0,05$ Graus I e III = Grau IV:  $p < 0,05$ Grau III  $\neq$  Grau IV:  $p < 0,05$