



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

**ANÁLISES DOS GENES *TP53*, *PTEN*, *IDH1* E *IDH2* EM  
TUMORES NÃO GLIAIS DO SISTEMA NERVOSO HUMANO**

**CLEITON MENDES LOPES**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.**

**Área de concentração: Neurociências**

**Orientador: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo.**

**BELÉM 2015**



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

**ANÁLISES DOS GENES *TP53*, *PTEN*, *IDH1* E *IDH2* EM TUMORES  
NÃO GLIAIS DO SISTEMA NERVOSO HUMANO**

**CLEITON MENDES LOPES**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo**  
**(ICB/UFPA-Orientador)**

---

**Prof. Dra. Bárbara do Nascimento Borges**  
**(ISARH/UFRA-Membro)**

---

**Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano**  
**(ICB/UFPA-Membro)**

---

**Prof. Dra. Claudia Regina Batista de Souza**  
**(ICB/UFPA-Suplente)**

**BELÉM 2015**

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- UFPA- Universidade Federal do Pará, Belém-PA. Laboratório de Biologia Molecular Francisco Mauro Salzano, ICB;
- Instituto Evandro Chagas. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética;
  - Hospital Ophir Loyola;
- CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;
- CNPq- Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento.

Dedico este trabalho e meus  
avanços acadêmicos a minha  
família. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade magnífica da vida com suas lutas, derrotas e conquistas inerentes, sobre tudo, agradeço pela dádiva de ter uma família amorosa e amigos tão especiais. Agradeço em especial a minha mãe Elila, ao meu pai Carlos e a minha irmã Gleice, pelo apoio incondicional, sem vocês, eu nunca conseguiria, obrigado por me ajudar em todos os aspectos possíveis, da minha vida pessoal e científica, sei o quanto suportaram em meu favor e serei eternamente grato. Amos vocês e sempre amarei.

Nem todas as páginas seriam o bastante para demonstrar minha imensa e eterna gratidão ao meu professor e orientador Dr. Nilson Praia Anselmo, agradeço muito pelo apoio, paciência, ensino e principalmente pela oportunidade. É um exemplo que vou sempre seguir para me tornar um professor digno do título. Jamais esquecerei o que o professor fez por mim. Desejo que tenhas vida longa, saudável e que sejas eternamente feliz. Um forte abraço e muito, muito, muito obrigado!

Agradeço, também, ao Prof. Dr. Edivaldo Oliveira pelo apoio e orientação de sempre, muito obrigado. E agradeço ao Prof. Rommel Burbano, Socorro e a toda equipe da secretaria que sempre me apoiaram em tudo! Muito Obrigado!

Um agradecimento muito especial aos meus amigos do laboratório e da minha vida pessoal que me apoiaram nessa grande jornada, Igor Pessoa, que me orientou e ajudou em tudo que foi possível, ao Júnior Santos, pelo ensino e apoio de sempre, ao Fábio Pacheco e aos demais que me ajudaram diretamente e indiretamente, tais como, Wallax, Prof. Dra. Bárbara, Prof. Dra. Cláudia, Diego, Sávio, Maricely, Elvira Bezerra, Marcio Lourinho, Renivaldo Santos e Marcus Braga. Obrigado por tudo!

Agradeço pelo apoio da Universidade Federal do Pará, à Pós Graduação, CNPq, Capes, IEC, Hospital Ophir Loyola e em especial aos pacientes que cederam suas amostras, muito obrigado! Carregarei esse título com muito orgulho e gratidão.

Estou muito feliz por este passo em minha vida, para muitos pode não significar tanto, mas para mim é motivo de grande alegria e imensa gratidão a Deus e a todos vocês, mais uma vez, muito obrigado e torço pela felicidade de todos.

**SUMÁRIO**

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 CÂNCER- ASPECTOS GERAIS .....	9
1.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	10
1.2.1 MENINGIOMAS.....	13
1.2.2 SCHWANNOMAS .....	15
1.2.3 NEUROCIOMAS.....	16
1.2.4 MEDULOBLASTOMAS.....	17
1.2.5 METÁSTASES .....	18
1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM TUMORES DO SNH .....	20
1.3.1 GENE <i>TP53</i> .....	21
1.3.2 POLIMORFISMOS NO GENE <i>TP53</i> .....	26
1.3.3 GENE <i>PTEN</i> .....	27
1.3.4 MUTAÇÕES NO <i>PTEN</i> .....	29
1.3.5 GENES <i>IDH1</i> E <i>IDH2</i> .....	32
1.3.6 MUTAÇÕES NOS GENES <i>IDH1</i> E <i>IDH2</i> .....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL .....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. REFERÊNCIAS.....	36

## RESUMO

Apesar da considerável incidência, estudos de alterações genéticas nos genes *TP53*, *PTEN*, *IDH1* e *IDH2*, em tumores não gliais, são raros e, em alguns casos, inexistentes. Os tumores não gliais são classificados geralmente como benignos e raramente evoluem à malignidade, apresentando diferentes classificações, incidências e localizações. Os genes supressores tumorais e de resposta a danos ao DNA, *TP53* e *PTEN*, estão entre os genes mais frequentemente mutados em tumores humanos. Os genes *IDH1* e *IDH2* estão envolvidos no metabolismo celular e, também, foram encontrados frequentemente mutados em gliomas, melanomas e leucemias, sendo atualmente considerados como bons marcadores em gliomas. Foram realizadas análises de alterações genéticas nos genes citados, a fim de verificar se estão associados à etiologia e/ou progressão de tumores não gliais do Sistema Nervoso Humano (SNH). Foram utilizadas as técnicas de PCR-SSCP para amplificação da região de interesse e triagem mutacional das amostras para posterior sequenciamento. Foram analisadas 37 amostras de tumores não gliais (14 schwannomas, 3 Meningiomas, 4 Meduloblastomas, 2 Neurocitomas e 14 Metástases do Sistema Nervoso Central (SNC)). Somente o gene *IDH1* apresentou polimorfismos na SSCP em 12 (32,4%) amostras, sendo, então, submetidas ao sequenciamento. No entanto, as reações de sequenciamento foram satisfatórias em apenas em 5 amostras, entre as polimórficas, (1 metástase, 1 meningioma e 3 schwannomas,). Análises dessas 5 amostras identificaram diferentes mutações, uma delas, presente em todas, uma transversão T→A no éxon 4 do códon 106 do gene *IDH1*, resultando na substituição do aminoácido treonina por serina. Foram, também, identificadas outras mutações em regiões não codificantes (intron 4) do gene *IDH1* em duas dessas amostras. As mutações encontradas em nosso estudo ainda não haviam sido relatadas na literatura. Nossos resultados indicam a participação do gene *IDH1* na patogênese desses tumores.

**Palavras-chave:** Meningiomas, Schwannomas, Neurocitomas, Metástases do SNC, Meduloblastomas.

## ABSTRACT

Despite the considerable incidence, studies of genetic changes in gene *TP53*, *PTEN*, *IDH2* and *IDH1*, in not glial tumors are rare and, in some cases, nonexistent. Glial tumors are usually not classified as benign and rarely evolve to malignancy, with different classifications, effects and locations. The tumor suppressor genes and response to DNA damage, *TP53* and *PTEN* are among the most commonly mutated gene in human tumors. The genes *IDH1* and *IDH2* are involved in cell metabolism and also were frequently found mutated in gliomas, melanomas and leukemias, currently being considered as good markers for gliomas. Genetic analyzes were performed in those genes, in order to verify that are associated with the etiology and/or progression of non-glial tumors of Human Nervous System (HNS). SSCP-PCR techniques for the amplification of the region of interest and mutational screening of samples for subsequent sequencing were used. We analyzed 37 samples of non-glial tumors (14 schwannomas, meningiomas 3, 4 Medulloblastomas, 2 neurocytomas and 14 metastases of Central Nervous System (CNS)). Only the gene *IDH1* polymorphisms presented on the SSCP 12 (32.4%) samples, and then subjected to sequencing. However, sequencing reactions were satisfactory in only 5 samples, of the polymorphic, (1 metastasis, meningioma 1 and 3 schwannomas). Analysis of these samples have identified 5 different mutations, one present in all, one transversion T → A in codon 106 of exon 4 of the *IDH1* gene resulting in amino acid substitution of threonine by serine. Were also identified other mutations in noncoding regions (intron 4) of gene *IDH1* in two of these samples. The mutations found in our study had not yet been reported in the literature. Our results indicate the participation the gene *IDH1* in the pathogenesis of these tumors.

**Keywords:** meningiomas, schwannomas, neurocytomas, CNS metastasis, medulloblastomas.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER- ASPECTOS GERAIS

O câncer é o crescimento descontrolado e disseminação de células, podendo afetar quase qualquer parte do corpo. Muitos tipos de cânceres podem ser prevenidos, não se expondo a fatores de risco comuns. Uma proporção significativa pode ser curada por cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, especialmente se forem detectados precocemente (WHO, 2015).

Hanahan e Weimberg, (2002), propuseram seis marcadores que constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica: a manutenção da sinalização proliferativa, fuga dos supressores do crescimento, resistência à morte celular, permissão à imortalidade replicativa, indução à angiogênese, ativação da invasão e metástase. Subjacente a estas características está a instabilidade genômica. Em 2011, os mesmo autores propuseram outras marcas à lista, entre elas, a reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune (Figura 01).

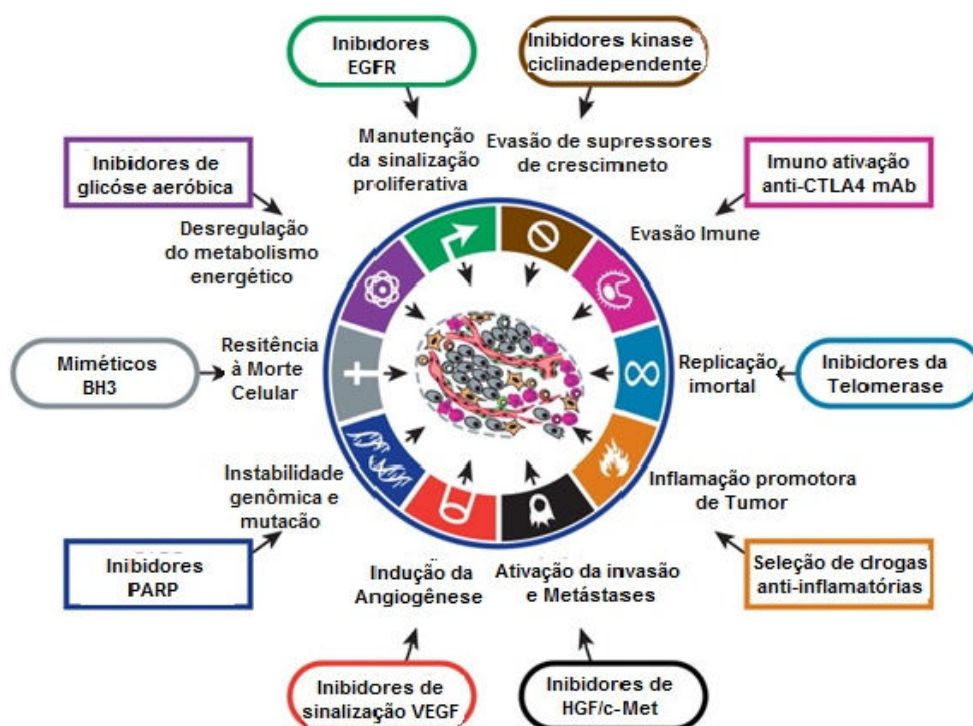


Figura 01: Os marcadores do Câncer. Adaptado de Hannahan & Weimberg, 2011.

Não conhece o motivo pelo qual alguns tecidos desenvolvem milhões de vezes mais tumores que outros. Foi observado que, o risco de vida para o câncer de diversos tipos é fortemente correlacionado ao número total de divisões das células normais (auto-renovação) e à manutenção da homeostase desse tecido. Estes resultados sugerem que apenas um terço da variação no risco de câncer entre os tecidos é atribuível a fatores ambientais ou predisposições herdadas. A maioria resulta de mutações aleatórias que surgem durante a replicação do DNA nas células-tronco normais, não cancerosas. Isto é importante não só para a compreensão da doença, mas também para a concepção de estratégias destinadas a limitar uma mortalidade resultante (Tomasetti & Vogelstein, 2015).

## **1.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) frequentemente apresentam um largo espectro morfológico e sua classificação depende do reconhecimento de áreas com características histológicas de um tipo particular de tumor. Métodos imunocitoquímicos podem ser necessários para demonstrar a expressão de um antígeno tipicamente expresso por um tipo de celular, auxiliando na classificação. Infelizmente, não existem anticorpos que identificam inequivocamente os diferentes tipos de tumores. A presença ou ausência de antígenos apenas acrescenta, ajudando a indicar o tipo de tumor (Collins *et al.*, 2004).

Quatro graus de malignidade são reconhecidos pelo sistema da Organização Mundial de saúde (OMS), variando em níveis de agressividade, do grau I (benigno) ao grau IV (maligno). Os critérios histológicos para malignidade não são uniformes para todos os tipos de tumores e, portanto, estes devem ser classificados antes que o grau de malignidade possa ser determinado. Alguns tumores cerebrais são bem conhecidos pela progressão, tornando-se mais malignos com o tempo. Um diagnóstico do paciente é baseado na parte mais maligna do tumor. Assim, é de extrema importância a qualidade das amostras, a fim de determinar o seu tipo e julgar seu potencial maligno (Collins *et al.*, 2004).

No Brasil, em 2014, foram estimados 4.960 casos de câncer do SNC em homens e 4.130 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do SNC, na região Norte, é o oitavo mais frequente em homens (2,39/100 mil) e o décimo mais frequente em mulheres (1,90/ 100 mil) (INCA, 2015).

Segundo o Instituto de Veille Sanitaire (INVS), nos países industrializados, as taxas de incidência padronizadas pela população mundial são 5,85/100.000 para os homens e para mulheres 4,06/100.000. O astrocitoma anaplásico e o glioblastomas representam aproximadamente 38% dos tumores primários do SNC; meningiomas e outros tumores mesenquimais representam em média 27%, já os tumores hipofisários, schwannomas, linfomas do SNC, oligodendrogliomas, ependimomas, astrocitomas de baixo grau e meduloblastomas são os menos comuns entre os tumores primários do Sistema Nervoso Humano (SNH) (Tabela 01) (Kim *et al.*, 2009).

Tabela 01. Classificação de tumores do SNH (WHO, 2007).

<b>TUMORES ASTROCÍTICOS</b>	I	II	III	IV
Astrocitoma de células gigantes subependimário	X			
Astrocitoma pilocítico	X			
Astrocitoma Pilomixoide		X		
Astrocitoma Difuso		X		
Xantastrocitoma Pleomorfico		X		
Astrocitoma Anaplásico			X	
Glioblastoma				X
Glioblastoma de células gigantes				X
Gliosarcoma				X
<b>TUMORES OLIGODENDROGLIAIS</b>				
Oligodendroglioma		X		
Oligodendroglioma Anaplásico			X	
<b>TUMORES EPENDIMAIS</b>				
Subependimoma	X			
Ependimoma Mixopapilar	X			
Ependimoma		X		
Ependimoma Anaplásico			X	
<b>TUMORES DA REGIÃO SELAR</b>				
Craniofaringioma	X			

Tumor de células granulares da neurohipofise	X			
Pituicitoma	X			
Oncocitoma células fusiformes da adenohipófise	X			
<b>TUMORES EMBRIONÁRIOS</b>				
Medulloblastoma				X
Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET)				X
Teratoide Atípico / Tumor Rabdoide				X
<b>TUMORES CRANIANOS E DOS NERVOS PARAVERTEBRAIS</b>				
Schwanoma	X			
Neurofibroma	X			
Perineurioma	X	X	X	
Tumor Maligno de Nervo Periférico (MPNST)		X	X	X
<b>TUMORES DAS MENINGES</b>				
Meningioma	X			
Meningioma Atípico		X		
Meningioma Maligno/Anaplásico			X	
Hemangiopericitoma		X		
Hemangiopericitoma Anaplásico			X	
Hemangioblastoma	X			
<b>TUMOR NEURONAL OU MISTO NEUROGLIAL</b>				
Gangliocitoma	X			
Ganglioglioma	X			
Ganglioglioma anaplásico			X	
Astrocitoma infantil Desmoplastico e Ganglioglioma	X			
Tumor Neuroepithelial disembríoplástico	X			
Neurocitoma central		X		
Neurocitomaextraventricular		X		
Liponeurocitoma cerebelar		X		
Paraganglioma da medula espinhal	X			
Tumor glioneuronal papilar	X			
Tumor glioneuronal formação-Rosette do quarto ventrículo	X			
<b>TUMORES EMBRIONÁRIOS</b>				
Medulloblastomas				X
Tumores primitivos neuroectodérmicos (PNETs)				X
Meduloepitelioma				X
Ependimoblastoma				X
Tumor Apical Teratoide/Rabdoide				X

### 1.2.1 MENINGIOMAS

Os meningiomas surgem a partir das células meningoteliais que compõem as vilosidades aracnóides das meninges, membranas protetoras que cobrem o cérebro e a medula espinhal. Estes tumores são geralmente benignos e de crescimento lento. Cerca de 90% dos meningiomas correspondem ao grau I dentre os tumores do SNC de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Os meningiomas são os tumores extra-axiais mais comuns e o segundo entre tumores primários do sistema nervoso central, sendo responsável por 13 a 26% das neoplasias malignas (Liu *et al.*, 2005).

Os meningiomas apresentam uma grande variedade histológica (Tabela 02). Os meningiomas meningoteliais, fibrosos e transicionais são os mais comuns dentre os subtipos na classificação OMS. A maioria se comporta de forma clínica comum, mas alguns, por exemplo, de grau II, possuem maior tendência a se repetir e seguir um curso clínico mais agressivo, incluindo metástase. Núcleos pleomórficos e mitoses ocasionais podem ser observados em qualquer um dos meningiomas variantes sem, necessariamente, conotar um comportamento mais agressivo. Além disso, os critérios utilizados para o diagnóstico de meningiomas atípicos são aplicados independente do subtipo específico de meningioma. Meningiomas são conhecidos por serem induzidos por baixa, moderada e altas doses de radiação. Quando induzidos por radiações são mais comumente atípicos ou agressivos, altamente proliferativos e geralmente ocorrem em idade mais jovem (WHO, 2007).

Os meningiomas podem apresentar progressão, portanto, devem ser identificadas áreas com histologia associada ao comportamento mais agressivo. Os critérios histológicos, indicando um comportamento mais agressivo e, portanto, um aumento no grau de malignidade, incluem mitoses frequentes, regiões de hiper celularidade, o crescimento em forma de folha, alta relação núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e necrose espontânea (Collins *et al.*, 2004). Traumas físicos na região da cabeça e traumas acústicos (casos de trabalhadores expostos a alto nível de som) são possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de meningioma e neurilemoma acústico, respectivamente (INCA, 2015).

Tabela 02. Meningiomas agrupados por probabilidade de recorrência e grau. Traduzido e adaptado (WHO, 2007).

MENINGIOMAS	Grau WHO
Meningioma meningotelial	Grau I WHO
Meningioma Fibroso	Grau I WHO
Meningioma Mixo	Grau I WHO
Meningioma Psamomatoso	Grau I WHO
Meningioma Angiomatoso	Grau I WHO
Meningioma Microcístico	Grau I WHO
Meningioma Secretor	Grau I WHO
Meningioma rico em células Linfoplasmáticas	Grau I WHO
Meningioma Metaplasmiático	Grau I WHO
Meningioma Cordoide	Grau II WHO
Meningioma de células claras (Intracraniano)	Grau II WHO
Meningioma Atípico	Grau IIA WHO
Meningioma Papilar	Grau III WHO
Meningioma Rabidoide	Grau III WHO
Meningioma Anaplásico (Maligno)	Grau III WHO

Cerca de 2-3% dos meningiomas apresentam sinais histológicos de malignidade, classificados como meningiomas anaplásicos (malignos) de grau III (WHO) e estão associados a um elevado risco de recorrência local e metástases. Tal como muitos outros tumores, os meningiomas resultam de alterações genéticas e/ou epigenéticas que alteram a função ou expressão de genes críticos para o controle da proliferação celular e/ou da morte celular (Figura 02) (Al-Khalaf *et al.*, 2007).

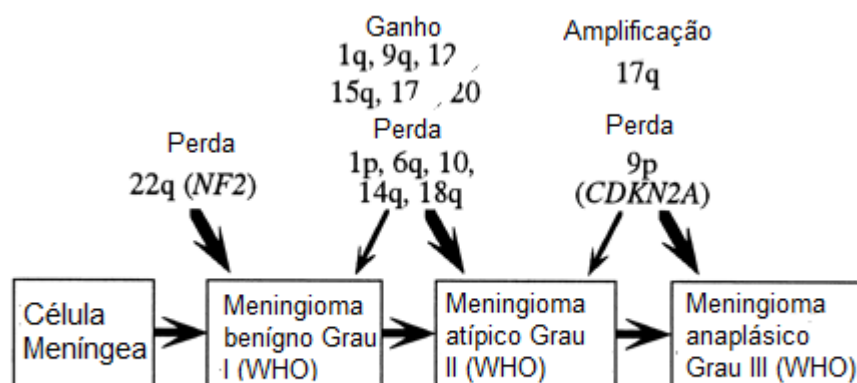


Figura 02. Modelo proposto de alterações genômicas na progressão do meningioma. Adaptado e traduzido (Weber *et al.*, 1997).

### 1.2.2 SCHWANNOMAS

Os schwannomas são tumores encapsulados de células de schwann, as principais células da glia periférica, não invadem o nervo, mas crescem em torno dele. Os schwannomas são tumores benignos e estão em segundo lugar destas, constituindo 5 a 10% de todas as neoplasias intracraniais. É extremamente raro um schwannoma tornar-se maligno (Hanemannet & Evans, 2006). A maioria dos schwannomas surgem espontaneamente e apenas 4% estão associados a neurofibromatose tipo 2 (NF2). Os schwannomas esporádicos representam 6% a 8% de todos os tumores intracranianos. Além disso, schwannomas perfazem 90% dos tumores que ocorrem na região do ângulo ponto-cerebelar (Michael *et al.*, 2011).

O schwannoma convencional é um tumor composto inteiramente de células neoplásicas de schwann, formando dois padrões básicos em diferentes proporções: áreas compactas com células alongadas (Padrão Antoni A), vagamente texturizado com processos indistintos, e, lipidização variável com padrão retiforme raramente visto (Antoni B). As células de schwann compreendem o tumor com quantidades moderadas de eosinófilo no citoplasma e sem bordas celulares discerníveis. A vasculatura do schwannoma é tipicamente de paredes espessas e hialinizada, além disso, vasos sanguíneos dilatados rodeados por hemorragia são comuns (WHO, 2007).

Durante a última década, um grande progresso tem sido feito na determinação de características moleculares e genéticas causadoras de ambas as formas esporádicas e familiares de schwannomas (Pećina-Šlaus *et al.*, 2012). A apresentação clínica pode ser de tumores esporádicos solitários ou como lesões múltiplas, envolvendo principalmente o ramo vestibular do oitavo nervo craniano. Meningiomas e schwannomas, em conjunto, representam a marca da NF2, uma grave desordem genética autossômica dominante que afeta ~ 1 em 40.000 nascidos vivos. O gene *NF2* foi isolado em 1993 e tem sido relatado um grande número de mutações, acompanhadas pela perda da heterozigose em 22q em schwannomas esporádicos (Gomez *et al.*, 2004).

### 1.2.3 NEUROKITOMAS

O Neurocitoma central (NC) é um raro tumor que possui típica localização no sistema ventricular supratentorial, próximo ao forame de Monro, primeiramente descrito por Hanssoun *et al.* (1982) e representa apenas 0,1 à 0,5% de todos os tumores primários intracraniais. Foram descritos nos sítios extraventriculares, incluindo o parênquima cerebral, tálamo, cerebello e coluna espinhal (Agarwal *et al.*, 2011). Neurocitomas espinhais são extremamente raros e são mais comumente encontrados em localizações intramedulares (Wu *et al.*, 2014). Foi inicialmente descrito como um tipo de tumor benigno, embora casos atípicos com comportamento mais agressivo tenham sido relatados. A estimativa pré-operatória para a atividade proliferativa do neurocitoma é uma das considerações mais importantes (Sakamoto *et al.*, 2014).

A origem celular do neurocitoma central e eventos moleculares que levam à tumorigênese, em grande parte, são desconhecidos (Kane *et al.*, 2011). Este tipo de tumor é composto de células redondas uniformes as quais demonstram evidência de diferenciação neuronal (Choudhari *et al.*, 2009). O NC é geralmente de cor acinzentada, assemelhando-se a massa cinzenta, bem circunscrita e com áreas de hemorragia (Li *et al.*, 2012). As culturas *in vitro* revelaram que o NC apresenta propriedades remanescentes de células precursoras bi-potenciais que podem apresentar tanto a diferenciação neuronal quanto glial (Westphal *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2012).

Microscopicamente, os neurocitomas são tumores bem diferenciados e de características histológicas benignas, o que pode indicar arquitetura histológica variada na mesma espécie. Estes tumores são compostos de células uniformes (pequenas e médias) com núcleos arredondados, cromatina finamente pontilhada (cromatina "sal e pimenta"), nucléolos imperceptíveis, citoplasma eosinofílico escasso e áreas com pequenas células com halos perinucleares que se assemelham oligodendroglioma. As células são normalmente estreitamente justapostas, mas podem também ser colocadas dentro de uma base de estroma finamente filamentoso. Em alguns lugares, os tumores exibem áreas celulares densas alternando com áreas fibrilares. Os últimos componentes são,



principalmente, perivascular e possuem matriz fibrilar que se assemelha às "rosetas de ependimoma". Em muitos casos, paredes finas dos canais vasculares dilatados e calcificação são facilmente identificadas (Sharma *et al.*, 2006).

Embora desconhecidos os mecanismos da tumorigenese, o NC se apresenta geneticamente distinto do neuroblastoma e oligodendroglioma, pois 26% dos neuroblastoma apresentam amplificação de N-myc e/ou perda de heterozigose em 1p36 (LOH), sendo anomalias raras no NC, além disso, no oligodendroglioma, aberrações de 1p e 19q são importantes. Todos os oito casos de NC do estudo não tiveram perda de alelos em 1p e 19q, assim, não está claro se esses marcadores genéticos são relevantes para NC (Myung *et al.*, 2013).

#### **1.2.4 MEDULOBLASTOMAS**

O meduloblastoma (MB) é um tumor neuroectodérmico primitivo decorrente de grânulos dos neurônios precursores no cerebelo ou a partir de células-tronco neurais do lábio rômico. Estes tumores altamente agressivos estão entre os tumores cerebrais malignos mais frequentemente diagnosticado em crianças. A cirurgia, radioterapia e quimioterapia têm contribuído para a melhoria dos resultados do tratamento, resultando em uma taxa de sobrevivência de 70-80% (Northcott *et al.*, 2012). Ainda assim, a taxa de mortalidade para pacientes com meduloblastoma continua a ser significativa e recorrência é observada na clínica, muitas vezes devido a resistência à radioterapia (Knockdown *et al.*, 2015).

De acordo com a classificação dos tumores do SNC de 2007 da OMS, o meduloblastoma consiste em cinco variantes histológicas, incluindo (listados em ordem de prevalência) clássico, desmoplásico/nodular, anaplástico, de grandes células e meduloblastoma com extensa nodularidade (MBEN). O variante anaplásica é considerada a forma clinicamente mais agressiva da doença em comparação com as outras (Giangaspero *et al.*, 1992). Em contrapartida, o fenótipo MBEN é enriquecido em crianças muito jovens e, recentemente, tem sido correlacionada com um prognóstico muito bom (Suresh *et al.*, 2004). Os subtipos histológicos não são

distribuídos uniformemente entre os subgrupos, o mais notável dos quais são as variantes desmoplásicas que parecem estar quase totalmente restrito com SHH tumores (Ellison *et al.*, 2011).

Durante as décadas passadas, estudos apresentaram melhores resultados para a compreensão das vias da tumorigenese do MB, tais como, as de receptores de sinalização, segundos mensageiros intracelulares, fatores de transcrição e regulação genética (Kay *et al.*, 2013).

Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que os meduloblastomas pediátricos e adultos são geneticamente distintos e podem se comportar de forma bastante diferente do ponto de vista clínico, o que sugere que os dois podem representar formas distintas da doença de origem potencialmente díspares (Korshunov *et al.*, 2010; Spreafico *et al.*, 2005) Observações feitas em estudos moleculares recentes sustenta a ideia de que o sub-agrupamento pode ser responsável por algumas dessas diferenças clínicas notáveis que existem entre os mais jovens versus os pacientes mais velhos que sofrem com meduloblastoma (Northcott *et al.*, 2012).

### **1.2.5 METÁSTASES**

As características histológicas, imunohistoquímicas e estruturais dos tumores secundários do SNC são diversas, assim como, nos tumores primários de onde se originam. As metástases intraparenquimatosas são relativamente e histologicamente bem demarcadas. Estes tumores frequentemente se expandem por crescimento de grupos de células tumorais, resultando na destruição neuroglial e uma variedade de alterações reativas, incluindo, gliose, inflamação e proliferação microvascular. A necrose tumoral pode ser extensa, deixando o tecido tumoral reconhecível apenas na periferia da lesão e em torno dos vasos sanguíneos. Metástases de alguns carcinomas, particularmente os carcinomas de células pequenas do pulmão, podem apresentar relativa infiltração ("pseudogliomatosa"). Em metástases leptomeningoteliais, as células tumorais são dispersas no espaço subaracnóide e de Virchow-Robin, podendo invadir o parênquima adjacente do SNC e raízes nervosas (WHO, 2007).

Os mecanismos subjacentes à invasão e metástase foram em grande parte um enigma. Ficou claro que carcinomas, a partir de tecidos epiteliais, progredem para graus mais elevados de malignidade, resultando na invasão local e metástases. As células cancerosas desenvolvem, tipicamente, alterações em sua forma, fixação em outras células e à matriz extracelular (Berx & van Roy, 2009). O processo de invasão e metástase foi esquematizado como uma sequência de passos discretos, muitas vezes, chamados de invasão em cascata (Talmadge & Fidler, 2010).

Esta representação (Figura 03) vislumbra uma sucessão de mudanças biológicas celulares, começando com a invasão local, em seguida, invasão de células cancerosas nos vasos sanguíneos e linfáticos próximos, trânsito de células cancerosas, através do sistema linfático e hematogênico, seguido de fuga das células cancerosas para o parênquima de tecidos distantes (extravasamento), formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases) e, finalmente, o crescimento das lesões micrometastáticas, sendo este último, denominado, “colonização”. A investigação, sobre a capacidade de invasão e metástase acelerou dramaticamente ao longo da última década, com modelos experimentais refinados, poderosas e novas ferramentas de pesquisa e, com isso, foram identificados genes críticos para regulação (Hanahan & Weinberg, 2011).

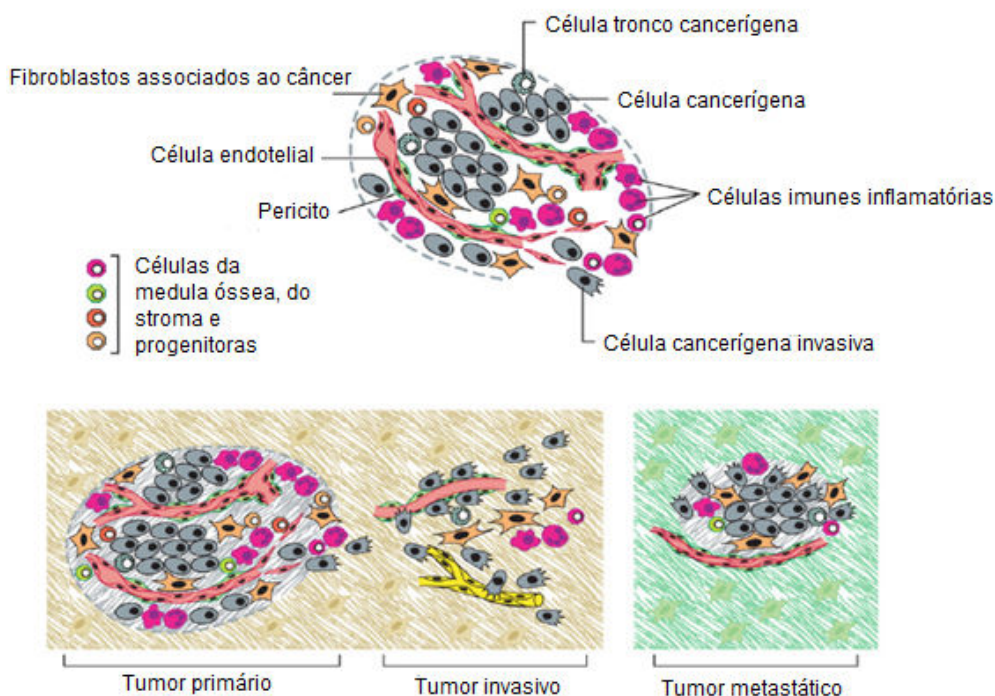


Figura 03. As células do microambiente tumoral. Adaptado de Hannahan & Weimberg, 2011.

Cerca de 100.000 pessoas morrem a cada ano com metástases cerebrais (Drevelegas *et al.*, 2005). A investigação, sobre a capacidade de invasão e metástase acelerou dramaticamente ao longo da última década, com modelos experimentais refinados, poderosas e novas ferramentas de pesquisa e, com isso, foram identificados genes críticos para regulação. As metástases cerebrais mais comuns estão localizadas no compartimento supra-tentorial (dural ou leptomeníngeo) (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM TUMORES DO SNH

Projetos de sequenciamentos tumorais foram iniciados na última década, com o objetivo de identificar genes promissores do câncer e potenciais alvos terapêuticos. Uma das descobertas inesperadas desses projetos foi a descoberta de que genomas tumorais contêm milhares de mutações “irrelevantes” para o desenvolvimento do tumor e que um pequeno número de mutações pode influenciar na progressão tumoral. Embora muitas vezes descartadas e consideradas “irrelevantes”, o valor dessas mutações não devem ser subestimadas, pois, são os indicadores mais importantes da exposição a vários agentes cancerígenos e são essenciais para avaliar a etiologia de tumores individuais. Espectros de mutações a partir de vários tipos de cânceres, não só confirmam os achados de análise ou epidemiologia molecular, mas também revelam novos perfis que ampliarão esse conhecimento aos tumores individuais em todos os tipos de cânceres (Soussi *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que muitos dos genes envolvidos na reparação de danos ao DNA possuem papéis adicionais na tumorigenese. Embora defeitos nestes genes sejam, causalmente, ligados à iniciação do tumor, o seu papel na progressão do tumor é controverso e parece depender do tipo tumoral (Huse e Holland, 2009). Em geral, a iniciação e progressão de tumores cerebrais primários, incluindo meduloblastomas e gliomas, são acompanhados pelo acúmulo de alterações genéticas em diversos produtos de genes supressores tumorais, como *PTEN*, *TP53*, *TP16INK4a* e/ou *TP19Arf* e produtos oncogênicos (Mimeault & Batra, 2011). Recentes descobertas na compreensão da biologia do tumor cerebral

possibilitaram uma série de estratégias terapêuticas visando vias oncogênicas distintas (Huse e Holland, 2008). Entre as vias oncogênicas desreguladas frequentemente, o fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), têm atraído muita atenção, devido sua influência fundamental nos meduloblastomas pediátricos e glioblastomas (Mimeault & Batra, 2011). As alterações genéticas que resultam da ativação contínua de diferentes cascatas tumorigênicas, mediadas através de diferentes receptores tirosina-quinase (RTK) e seus elementos de sinalização (PI3K)/Akt e RAS/ativadas por proteínas quinases (MAPKs), podem contribuir para a aquisição de fenótipos mais agressivos e vantagens na sobrevivência de células cancerígenas cerebrais (Huse & Holland, 2009; Mimeault & Batra, 2011).

As mutações na sequência do DNA de um proto-oncogene que resultaram em ganho de função, com aumento da atividade enzimática, podem resultar na desregulação da proliferação e/ou diferenciação, aumentando, assim, a propensão para o câncer desenvolver (Byrd *et al.*, 2012). Muitos genes que participam da resposta a danos ao DNA, tais como, *Rad9*, *PARP1*, *BRCA1*, *ATM* e *TP53* foram associados à metástase. Muitos desses genes atuam como fatores de transcrição, regulando outros genes implicados na patogênese do câncer, além disso, se expressam aberrantemente em vários tumores humanos, sendo causalmente relacionados à tumorigênese (Broustas & Lieberman, 2014). Os genes de resposta ao dano no DNA desempenham um papel vital na manutenção de um genoma saudável. Os defeitos no *checkpoint* do ciclo celular e genes de reparação do DNA, especialmente mutações aberrantes ou de regulação negativa, estão associados a um amplo espectro de doenças humanas, incluindo a predisposição ao desenvolvimento de condições neurodegenerativas e cânceres. Por outro lado, a hiper-ativação de genes de reparação do DNA, pode, também, causar câncer e aumento da resistência à terapia (Broustas & Lieberman, 2014).

### 1.3.1 GENE *TP53*

O gene *TP53* é um supressor tumoral, sendo um dos mais estudados e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (Figura 04), composto por 11

éxons (Figura 05) e codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) de massa molecular de 51 a 53 kDa. A proteína p53 é um potente fator de transcrição (Pflaum *et al.*, 2014) sendo constituída por 393 aminoácidos (Subhasree *et al.*, 2013).

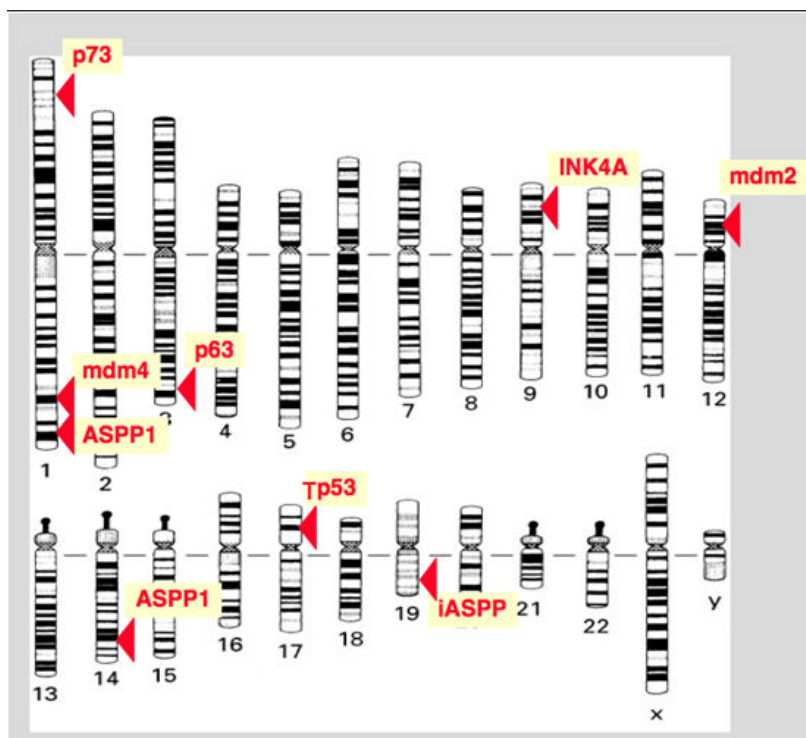


Figura 04. Localização do gene *TP53*. Adaptado de The TP53 Web Site ([http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_info.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_info.html)).

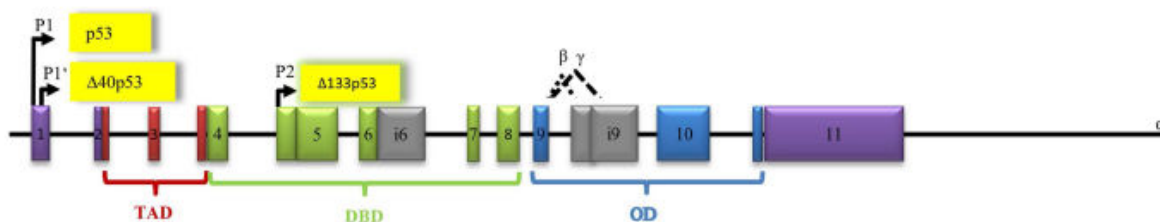


Figura 05. Arquitetura e estrutura do gene *TP53* humano: *splicing* alternativo ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), promotores alternativos (P1, P1', P2), domínio de ativação (TAD), domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de oligomerização (OD). O promotor P1 gera proteína com um domínio de ativação (TAD), ao passo que os promotores P1' e P2 o fazem sem este mesmo domínio (TAD) (Pflaum *et al.*, 2014).

O *TP53* suprime a proliferação de células do tumor por indução à apoptose, interrupção do ciclo celular ou senescência, em resposta a uma variedade de

estresses, incluindo danos ao DNA, ativação de oncogenes e hipóxia (Vousden *et al.*, 2002; Kenzelmann *et al.*, 2010). A perda da influência funcional da proteína p53, não só controla *checkpoint* do ciclo celular e apoptose, age, também, na regulação de outras importantes etapas na progressão metastática, migração celular e invasão tecidual. Em cerca de metade de todos os cânceres humanos, o gene supressor de tumor *TP53*, é deletado ou mutado (Vasconcelos *et al.*, 2013) Em células normais, a p53 é suprimida pelo seu principal regulador negativo Mdm2, que promove a sua rápida degradação proteossômica. Estresses celulares induzem modificações pós-traducionais na p53 e Mdm2, provocando a quebra da interação Mdm2-p53 e consequente estabilização e ativação p53. Em resposta aos sinais de estresses, a p53 impede a proliferação de células danificadas, ou, transitoriamente, por interrupção do ciclo celular, ou, a apoptose permanente, ou, por meio da senescência. O *TP53* tem sido proposto como condutor dessas respostas, servindo como ativador transcricional, induzindo uma série de genes alvo envolvidos na interrupção do ciclo celular, apoptose e senescência, assim como, pelo envolvimento em processos independentes de ativação transcricional. Através destes diversos mecanismos, o *TP53* impõe uma importante barreira contra o desenvolvimento de tumores (Kenzelmann & Attardi, 2010).

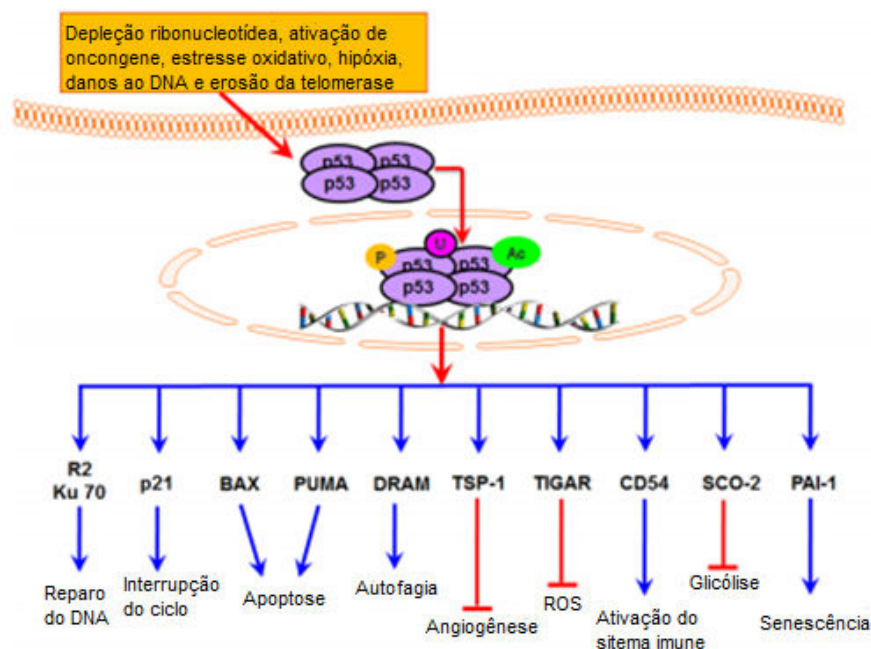


Figura 06. Contribuições da p53 em múltiplos processos celulares em resposta a diversos estresses celulares (Subhasree *et al.*, 2013).

O efeito inibitório do *TP53* no ciclo celular, apoptose ou em genes relacionados com a senescência em resposta ao dano no DNA, protegem a integridade do material genético da célula. Destacando suas críticas funções supressoras de tumor, o *TP53* encontra-se mutado, deletado ou funcionalmente inativado em quase todos os tipos de cânceres. Quando mutado dentro do seu domínio de ligação ao DNA, a instabilidade normal da p53 é interrompida e propriedades de ganho de função oncogênicas são observadas, acompanhadas por acumulação maciça dos níveis de proteína p53 mutante, em relação ao nível do estado estacionário baixo ou indetectável no tipo selvagem em células normais. A mutação no *TP53* pode afetar a estabilidade por uma combinação de propriedades bioquímicas e biofísicas inerentes às mutações no próprio gene, assim como, nas vias anormalmente ativadas e nas células geneticamente danificadas. O aumento da estabilidade da proteína p53 mutante é a chave para capacidade de acumular níveis elevados e a presença de propriedades fenotípicas "ganho de função" (Figura 07) (Frum & Grossman, 2014). Mutações no *TP53* são muitas e diversas, do tipo esporádica, germinativa, ganho de função (GoF), oncogênica, indutoras de metástase, mediadoras da quimio-resistência e modificadoras de células tronco. Mutantes *TP53* podem impactar variáveis clínicas importantes de diversas maneiras (Bisio *et al.*, 2014).

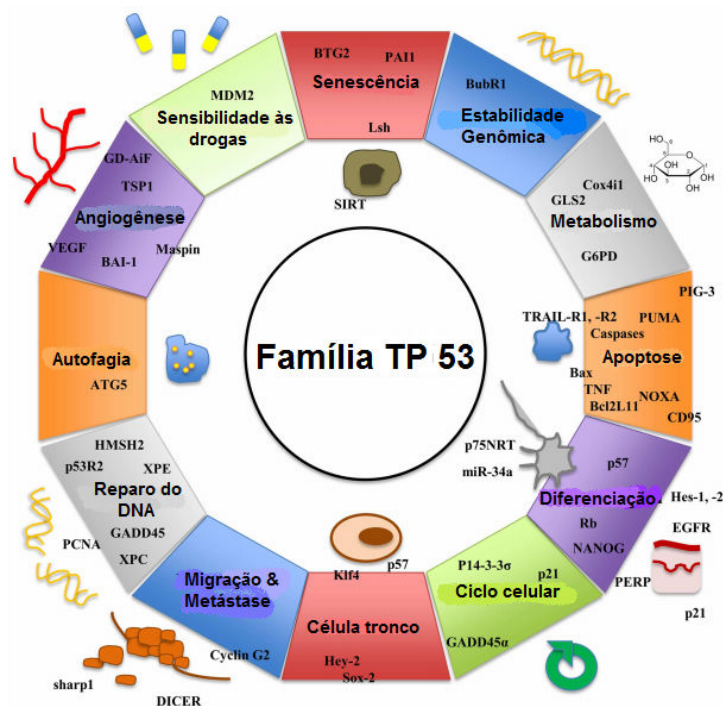


Figura 07. Funções do gene *TP53*, homólogos *TP63* e *TP73* e seus alvos (Pflaum *et al.*, 2014).



Foi observado que a inativação ou a perda do gene *TP53* está associada a um mau prognóstico, estágios mais avançados dos tumores e progressão neoplásica, sugerindo que a inativação deste gene ou a supressão da região 17p é de grande importância na carcinogênese, como foi observado nos cânceres de mama, fígado, estômago, cólon e tumores de cabeça e pescoço (Herrera *et al.*, 2010).

A proteína p53 humana é constituída por vários domínios. O domínio central de ligação ao DNA é compartilhado pela maioria das isoformas e liga-se a elementos de resposta aos genes-alvo. Um grande número de mutações do gene *TP53* ocorre dentro desta região do gene (Muller *et al.*, 2014). O domínio de ativação da transcrição N-terminal é o local de regulação positiva (p300/CBP, TAFII40/60), ou, de reguladores negativos (MDM2 e MDMX). A oligomerização do domínio C-terminal (CTD) é sujeito a *splicing* alternativo e modificação pós-transcricional, demonstrando, também, influenciar na ligação ao DNA e atividade transcricional dos membros da família p53 (Pflaum *et al.*, 2014). Apesar do progresso impressionante na compreensão mecanicista da estrutura e função da proteína p53, as pesquisas ainda não geraram aplicações de grande impacto na gestão e terapia do câncer (Lotter *et al.*, 2010). O espectro mutacional do *TP53* em tumores cerebrais é caracterizado por um aumento na frequência de mutação no códon 273 (Figura 08) (Oliver *et al.*, 2002).

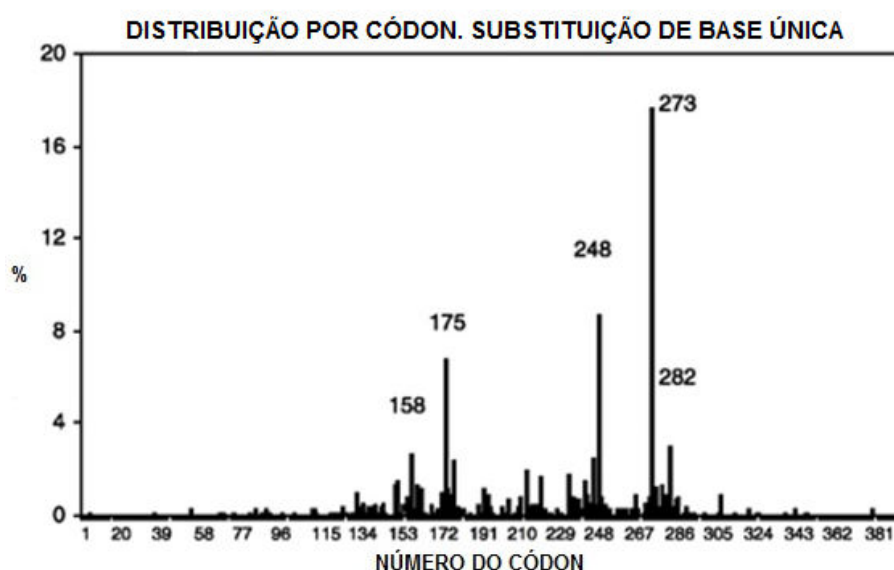


Figura 08. Espectro mutacional do *TP53* em tumores cerebrais primários de acordo com o banco de dados de mutações do *TP53*. Adaptado e traduzido (Oliver *et al.*, 2002).

A perda da função do gene *TP53* não só coopera para a iniciação e progressão do tumor, mas também permite que tumores mais rapidamente adquiram um repertório completo de facilitações para metastases. A p53 influencia diretamente a transcrição de genes envolvidos na metástase por promotores de ligação de uma variedade de genes que estão envolvidos na regulação da motilidade celular e adesão, processos importantes para a metástase tumoral (Yeudall *et al.*, 2014). O câncer de mama é a segunda origem mais comum de metástases cerebrais, depois do câncer de pulmão, e representa 14-20% de todos os casos. Anormalidades do cromossomo 17 são eventos genéticos importantes do câncer de mama humano, sendo que vários oncogenes e genes supressores de tumor, estão localizados neste cromossomo (Vasconcelos *et al.*, 2013).

Foram analisadas alterações específicas no gene *TP53* em 30 schwannomas vestibulares humanos (SV) compreendendo 10 casos confirmados de NF2 e 20 casos esporádicos. Foi observada perda de heterozigosidade (LOH) no gene *TP53* em 54% dos casos. Os níveis aumentados do RNAm e da proteína p53, de tamanhos normais, foram encontrados em todos os tumores analisados, assim, o *TP53* parece estar desregulado em todos os tumores, sugerindo que as alterações do *TP53* possa ser associado a progressão do tumor SV, sugerindo que o gene *TP53* possui papel importante no desenvolvimento de schwannomas vestibulares humanos (Dayalan *et al.*, 2006).

Análises citogenéticas e genéticas dos principais subtipos histológicos de tumores do sistema nervoso, gliomas, meningiomas e neurinomas, forneceram informações interessantes sobre os mecanismos responsáveis ou que contribuem para a sua origem e desenvolvimento. As mutações no gene *TP53* em tumores de baixo grau conduzem a uma vantagem seletiva *in vivo* e parece um passo crítico na transformação de baixo para alto grau em gliomas (Rey *et al.*, 1992).

### 1.3.2 POLIMORFISMOS NO GENE TP53

Embora a etiologia dos tumores primários do cérebro seja largamente desconhecida, estudos prévios sugerem que os polimorfismos de genes de

reparação ao DNA podem influenciar no risco de gliomas. O reparo do DNA alterado também é susceptível a afetar o risco de meningiomas e neuromas acústicos, no entanto, esses tumores ainda não foram bem estudados (Bello *et al.*, 2010).

Os polimorfismos genéticos são associados à predisposição a vários cânceres humanos o que pode representar uma importante contribuição para suscetibilidade ao câncer e ao comportamento do tumor. O *TP53* é altamente polifórmico, tanto em regiões codificadoras quanto não codificadoras (Almeida *et al.*, 2009). Entre os polimorfismos humanos mais estudados do *TP53*, incluem o polimorfismo do códon 72 (éxon 4) de um único nucleótido, que leva a substituição de Arginina por Prolina (Arg72Pro) (Gomez *et al.*, 2008). O polimorfismo do *TP53* no códon 72 (arginina/prolina) altera o potencial apoptótico da célula via interação diferencial com Mdm2. Foi observado que o alelo Arg72 tem uma maior interação com Mdm2, causando a indução a apoptose transcricionalmente independente. Enquanto isso, o alelo Pro72, que se encontra correlacionado ao desenvolvimento de cânceres, diminuiu (Chang *et al.*, 2009). Assim, a variante de Arg72 do *TP53* é um indutor mais potente de apoptose e transformação oncogênica do que a variante Pro72 (Gomez *et al.*, 2008).

### 1.3.3 GENE *PTEN*

O *PTEN* abreviado de “*Phosphatase and Tensin Homologue*” possui localização no cromossomo 10q23.3, foi identificado como um supressor tumoral, estando entre os genes mais mutados descobertos até o momento. O *PTEN* contém nove éxons e codifica uma proteína de 403 aminoácidos. Logo após sua descoberta, foi demonstrado que esta proteína possuía também uma potente atividade de fosfatase para o segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um produto lipídico da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), o que caracteriza sua importante função de supressora tumoral. A *PTEN* hidrolisa o fosfato 3' de PIP3 para gerar PIP2, assim, antagoniza diretamente a função de PI3K por anulação da ativação de eventos de sinalização mediados por PIP3, incluindo PDK1 e Akt / mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos). O *PTEN* desempenha um papel

fundamental no controle de sinalização intracelular para a sobrevivência e proliferação das células, inibindo a via PI3K/Akt (Zhang & Yu, 2010).

A estrutura molecular do PTEN mostra regiões características de uma proteína fosfatase. O domínio de terminal-N exerce atividade de fosfatase, enquanto a região da cauda C-terminal contém vários sítios de fosforilação (S362, T366, S370, S380, T382, T383 e S385), que, modulam funções do *PTEN* que são vitais para a atividade celular normal. A atividade funcional de *PTEN* é regulada pela fosforilação, oxidação e acetilação de interações proteína-proteína, e dentre as funções celulares que são regulados por *PTEN*, incluem a proliferação celular, a progressão do ciclo celular, a quimiotaxia, a angiogênese, a apoptose, o envelhecimento, a contratilidade do músculo e resposta a danos ao DNA. A ativação do *PTEN* leva à inibição das vias celulares associadas com doenças relacionadas ao *PTEN* (Figura 09). Além disso, três das vias de sinalização celular comum que estão associados com PTEN são mostrados (Figura 10) (Boosani *et al.*, 2013).

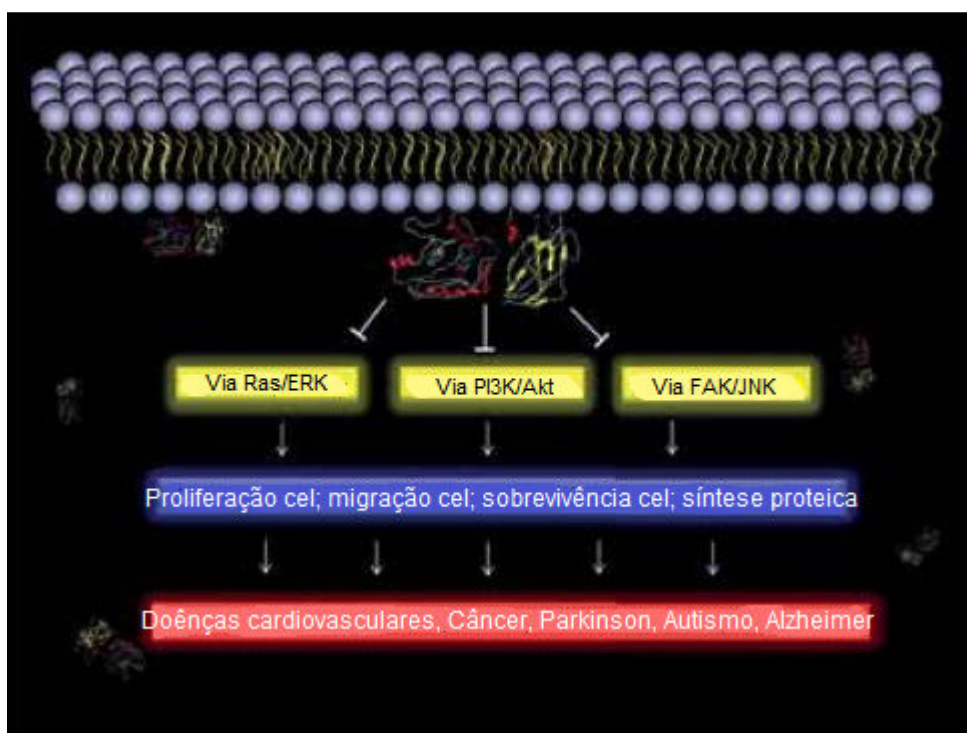


Figura 09. Ligação e ativação do *PTEN*, levando à inibição das vias celulares associadas à doenças humanas específicas (Boosani *et al* 2013).

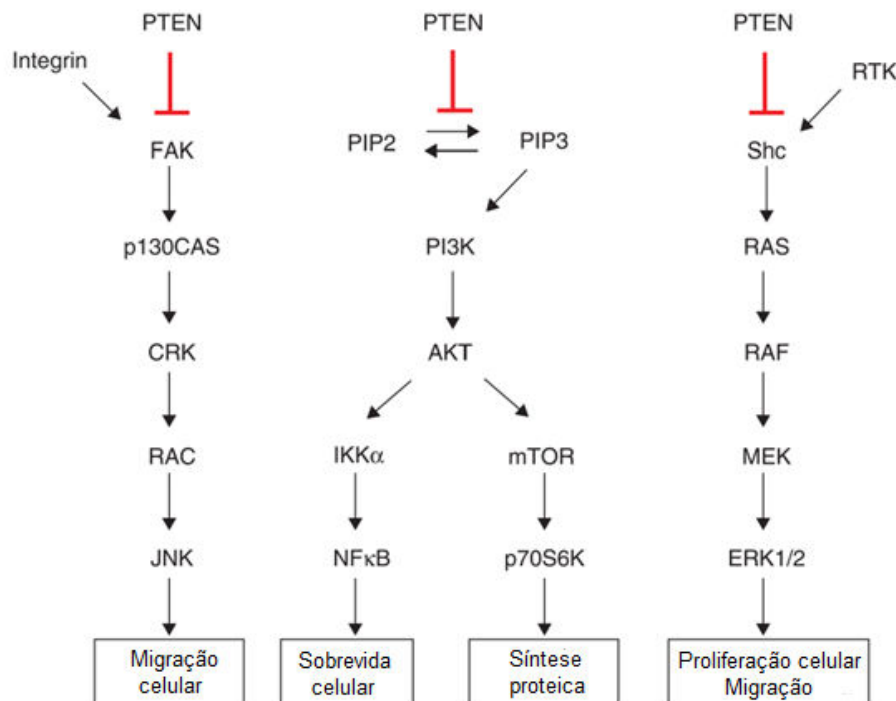


Figura 10. O *PTEN* inibe diferentes caminhos celulares. O papel inibidor de *PTEN* é realçado para indicar seus alvos moleculares em vias de sinalização celular que afetam a migração celular, proliferação, sobrevivência e síntese de proteínas (Boosani *et al* 2013).

### 1.3.4 MUTAÇÕES NO *PTEN*

Numerosas mutações, de pontuais a perdas alélicas, foram detectadas em altas frequências no gene *PTEN* em diferentes doenças malignas (Boosani *et al* 2013). Curiosamente, muitas mutações hereditárias no *PTEN* são diferentes das mutações encontradas em tumores do SNC esporádicos, embora algumas mutações se apresentem de maneiras sobrepostas. As mutações mais frequentemente observadas em tumores do SNC são substituições de aminoácidos (arginina 173) e mutação sem sentido (arginina 130). Mutações germinativas no *PTEN* causam efeitos pleiotrópicos, incluindo, a predisposição ao câncer e uma variedade de distúrbios neurológicos, revelando funções especializadas do *PTEN* na manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso (Figura 10). Mutações somáticas no *PTEN* ocorrem com frequência, como eventos tardios em tumores cerebrais esporádicos. Modelos de rato, com base na deleção do *PTEN* cerebral, têm nos fornecido *insights* sobre as funções do *PTEN* no sistema nervoso (iniciação e progressão de gliomas).

O comprometimento funcional do *PTEN* pode contribuir para gliomagenese pela interrupção da regulação da proliferação, migração, invasão, angiogênese, auto-renovação de células-tronco e de outras vias de supressores tumorais, tais como, a p53. Achados clínicos em gliomas de alto grau sugerem que alterações no gene *PTEN* estejam associadas a um mau prognóstico, podendo influenciar na resposta terapêutica específica (Figura 11) (Endersby e Baker *et al.*, 2008).

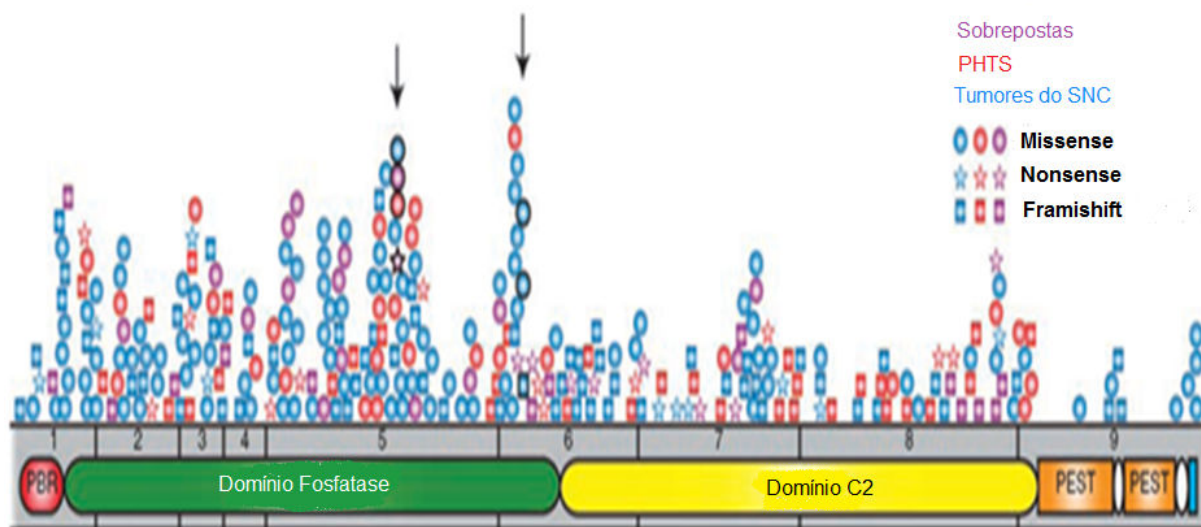


Figura 11. Representação gráfica de mutações do *PTEN* em Tumores e PHTS no sistema nervoso central (SNC). Éxons (cinza), região de ligação PIP2 (PBR, vermelho), o domínio fosfatase (verde), um domínio C2 (amarelo), cauda C-terminal (laranja) e PDZ em (azul). Substituições de aminoácidos (mutações de sentido trocado) são mostradas como círculos, mutações sem sentido são estrelas e mutações envolvendo inserções ou exclusões de DNA são quadrados. Mutações hereditárias no *PTEN* (vermelho, mutações esporádicas encontradas em tumores do SNC (azul), mutações de maneiras sobrepostas (roxos) e mutações mais frequentemente observadas em tumores do SNC (setas, contorno preto). Note-se que as mutações são distribuídas ao longo de todo o gene, apesar das agregações de mutações serem vistas dentro dos éxons que codificam o domínio da fosfatase. As mutações mais complexas não estão inclusas aqui, como translocações ou inserções locais. As Mutações somáticas foram compiladas a partir da base de dados COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) e mutações germinativas eram do banco de dados da Human Gene Mutation (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Adaptado de Endersby e Baker, 2008.

Mutações específicas no gene *PTEN* foram atribuídas a doenças hereditárias, como a síndrome de Cowden, síndrome Bannayan Zonana (síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley), síndrome de Lhermitte-Duclos, síndrome de Proteus e síndrome Proteus-like, que são clinicamente conhecidas como Síndrome do Tumor Hamartoma (PHTS). Além de suas alterações genéticas, a expressão do *PTEN* é também afetada por metilação do DNA, degradação do RNAm, modificações pós-

traducionais, regulação da transcrição e tradução para dentro da célula, indicando o *PTEN* como alvo em muitas doenças humanas (Wiencke *et al.*, 2007).

O fato de muitas mutações perturbarem o domínio de fosfatase ou resultarem na produção de uma proteína inativa por truncagem ou instabilidade, serve de apoio para a descoberta de que a perda da função de *PTEN* é a explicação para as características clínicas da PHTS. A mesma mutação pode causar síndrome Cowden ou síndrome de Riley- Ruvalcada Bannayan dentro da mesma família, sugerindo fortemente que as diferentes desordens mutacionais no *PTEN*, são, de fato, uma de espectro largo e altamente variável em suas características clínicas, como ocorre em outras desordens autossômicas dominantes de supressores tumorais, tais como, a neurofibromatose tipo I (Lachlan *et al.*, 2007).

O *PTEN* alterado por mutação ou silenciamento epigenético é observado em diferentes tumores cerebrais, incluindo, gliomas de alto grau. A perda do cromossomo 10 foi observada em todos os casos de gliomas. Um caso apresentou deleção homozigota do *PTEN*; e foram encontradas duas mutações pontuais no éxon 7 do *PTEN* (G251D e Q261). A imuno-histoquímica revelou diminuição ou perda da proteína *PTEN* e aumento da expressão de p-Akt e p-S6 (Goschzik *et al.*, 2014). Foi realizada uma meta-análise, a fim de investigar as relações entre mutações no gene *PTEN* e o prognóstico em glioma. Os resultados indicaram que pacientes com mutações no gene *PTEN* exibem uma sobrevida significativamente menor, se comparado aqueles sem mutações no gene *PTEN*. Análise de subgrupo estratificado por etnia demonstrou que, entre os americanos, as mutações no gene *PTEN* estão intimamente ligadas ao mau prognóstico, enquanto que correlações semelhantes não foram observadas entre as populações na Suécia, Itália e Malásia, fornecendo, desta forma, fortes e diretas evidências para a hipótese de correlação entre mutações genéticas do *PTEN* e um mau prognóstico de pacientes com glioma na população americana (Xiao *et al.*, 2014).

### 1.3.5 GENES *IDH1* E *IDH2*

A influência de alterações de genes metabólicos na tumorigenese, até o momento, é pouco compreendida, isto se dá, em grande parte, devido ao fato de que, até muito recentemente, não eram conhecidos por influenciarem no processo tumoral. A recente descoberta de mutações dirigidas por genes metabólicos tem um interesse renovado no metabolismo do câncer. Oito genes: *FH*, *SdhA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *IDH1* e *IDH2*, codificam 4 enzimas metabólicas diferentes: fumarato hidratase (FH), succinato desidrogenase (SDH) e isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) que são frequentemente mutados (Oermann *et al.*, 2012). Estas mutações são ambas germinais e somáticas, ocorrem em uma ampla gama de cânceres humanos (Yang *et al.*, 2012).

Três enzimas oxidam isocitrato à  $\alpha$ -cetoglutarato em células humanas: isocitrato-desidrogenase1 (*IDH1*), isocitrato-desidrogenase 2 (*IDH2*), e isocitrato desidrogenase 3 (*IDH3*). Apesar das semelhanças entre os nomes, estas enzimas se diferem significativamente umas das outras. O *IDH1* e *IDH2* são genes, respectivamente, localizados em 2q33 e 15q26. O *IDH3* é um heterotetrâmero composto por duas subunidades alfa, uma subunidade beta e uma sub-unidade gama (Horbinski *et al.*, 2013). Apenas o *IDH3* parece participar do ciclo de Krebs (Yen *et al.*, 2010). Genes que codificam os Isocitrato desidrogenases (*IDH1* e *IDH2*) são frequentemente mutados em vários tipos de cânceres humanos. As mutações dos genes *IDH1* e *IDH2* resultam na perda simultânea da sua atividade catalítica normal, a produção de  $\alpha$ -cetoglutarato, ganho de uma nova função e a produção de 2-hidroxioglutarato (2-HG). O 2-HG é estruturalmente semelhante ao  $\alpha$ 1-KG e atua como um antagonista  $\alpha$ -KG para inibir competitivamente vários dioxigenases  $\alpha$ -KG-dependentes (Yang *et al.*, 2012). O papel exato da enzima *IDH2* mitocondrial é obscuro, embora possa agir como uma fonte de NADPH para a mitocôndria. Durante a hipóxia ou disfunção mitocondrial, o *IDH1* e *IDH2* podem reduzir  $\alpha$ -KG para isocitrato, ajudando a célula a reabastecer outros intermediários do ciclo do ácido cítrico e ácido graxo precursor da acetil-CoA (Figura 12) (Filipp *et al.*, 2012).



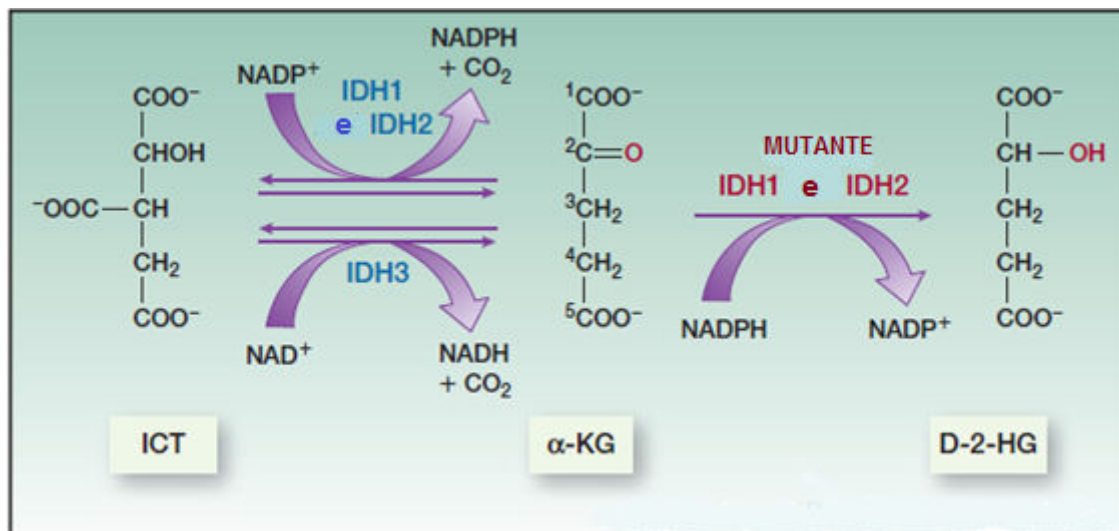


Figura 12. Reações químicas catalisadas por enzimas dos genes *IDH1* e *IDH2* do tipo selvagem e mutantes *IDH1/2* derivados de tumores. A única diferença estrutural entre α-KG e D-2-HG é o substituição do grupo 2-cetona de α-KG por um grupo hidroxilo em D-2-HG, indicado em vermelho (Yang *et al.*, 2012).

### 1.3.6 MUTAÇÕES NOS GENES *IDH1* E *IDH2*

Uma pergunta que sempre surge em estudos de mutações genéticas em câncer é se tais genes seriam chaves específicas para formação de tumores (oncogenese), se a mutação surge como um passo na progressão do tumor, ou, se é uma consequência acidental da reparação do DNA. Duas linhas de evidência apoiam o conceito de que a mutação do *IDH* funciona como um condutor direto para a oncogênese (Adam *et al.*, 2013). Primeiro, o mosaico somático do *IDH1* ou *IDH2* em R132 causam as síndromes encondromatose, doença de Ollier e síndrome de Maffucci, caracterizados por hemangiomas, tumores cartilagosos e apresentam um risco aumentado de gliomas (Amary *et al.*, 2011; Adam *et al.*, 2013). Em segundo lugar, a introdução de *IDH* mutado em células normais provoca aumento da proliferação, aumento das colônias e perda da diferenciação (Adam *et al.*, 2013).

As mutações no gene *IDH* são encontradas frequentemente em gliomas malignos e são propensos a se envolver na fase inicial de gliomagênese, antes mesmo das mutações no *TP53* ou perda de 1p e 19q. As mutações *IDH1* ocorrem frequentemente no resíduo conservado (R132) do éxon 4, que é de domínio catalítico, onde se liga ao seu substrato. As mutações em *IDH2* consistentemente

ocorrem no análogo do aminoácido R172 do éxon 4, funcionalmente equivalente ao aminoácido 132 do *IDH1*. Foram encontradas mutações no gene *IDH1* em cerca de 80% dos gliomas de graus II e III, glioblastomas secundários e em menos de 10 % dos glioblastomas primários. Mutações no *IDH2* foram, também, descritas em gliomas, embora uma frequência menor (Zou *et al.*, 2013).

Mutação isolada no *IDH2*, sem mutações no *IDH1*, em gliomas, está associada a um prognóstico um pouco mais favorável. Quatro características tornam as mutações nos genes *IDH1/2* facilmente detectáveis como biomarcadores confiáveis e específicos. Em primeiro lugar, mutações no *IDH1* *IDH2* ocorrem em um espectro de tumores altamente restrito, por outro lado, quase todas as mutações de tumores alvo *IDH1* derivam a um único resíduo Arg132, já o *IDH2*, em dois resíduos, Arg140 e Arg172, que estão localizados em um único éxon (4) e podem ser simplesmente identificado através da amplificação à base de PCR e seqüenciamento usando pequenas quantidades de amostras tumorais. Em terceiro lugar, os anticorpos que reconhecem especificamente a proteína mutante *IDH1* para R132H têm sido desenvolvidos, tornando possível a identificação da mutação *IDH1* por imunohistoquímica convencional. Em quarto lugar, a tecnologia de imagens do cérebro, embora ainda em fase experimental e ainda não pronto para a aplicação clínica de rotina, tem sido desenvolvida de forma não invasiva, detectando o acúmulo de 2-HG em pacientes com glioma (Yang *et al.*, 2012).

Em glioma de baixo grau e GBM secundário, mutações do gene *TP53* ocorrem cedo e frequentemente com mutação *IDH* (Yang *et al.*, 2010). Os efeitos das mutações no *IDH1/2* não podem ser explicados simplesmente pela inibição das suas contrapartes de tipo selvagem, porém, mais provavelmente representam um verdadeiro ganho de função (Horbinski *et al.*, 2013).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência de alterações nos genes *TP53*, *IDH1*, *IDH2* e *PTEN* em tumores não gliais do SNH.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar uma triagem de alterações genéticas nos éxons 4 - 11 do gene *TP53*, nos éxons 5 -7 do gene *PTEN* e éxon 4 dos genes *IDH1* e *IDH2* ;
2. Fazer a caracterização das alterações encontradas e correlacioná-las com o grau, gênero e tipo tumoral;
3. Determinar a frequência das mutações identificadas na população de estudo;
4. Avaliar a prevalência de alterações genéticas em diferentes variáveis, tais como, idade, tipo histológico e gradação tumoral, e assim, correlacionar os resultados com possíveis vias de progressão tumoral.

### 3. REFERÊNCIAS

Adam, L. *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas Published online: 27 March 2013. Springer Science+Business Media New York 2013.

Agarwal, S. *et al.* Extraventricular neurocytomas: a morphological and histogenetic consideration. A study of six cases. *Pathology*. 2011 Jun;43(4):327-34.

Al-khalaf, H. *et al.* The p53/p21 DNA damage-signaling pathway is defective in most meningioma cells. *J Neurooncol*. 2007 May;83(1):9-15.

Amary, M.F., DAMATO, S., HALAI, D. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet* 43(12):1262–1265 (2011).

Bello L, Zhang J, Nikas DC, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in meningiomas. *Neurosurgery*. 2000; 47:1185–95.

Berx, G., ROY, V.F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. 2009. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 1, a003129. *Cancer Res* 1998;58:29-33.

Byrd, A.E. *et al.* MicroRNA-30c-2\* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 2012 Mar 19;196(6):689-98. doi: 10.1083/jcb.201201077.

Bisio, A. *et al.* TP53 Mutants in the Tower of Babel of Cancer Progression. *Hum Mutat*. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/humu.22514.

Boosani, C.S., Agrawal, D.K. PTEN modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2013 May;23(5):569-80.

Chang, H. et al. 1p21 deletions are strongly associated with 1q21 gains and are an independent adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jan;45(1):117-21.

Choudhari, K.A., KALIAPERUMAL, C., JAIN, A. Central neurocytoma: a multi-disciplinary review. *Br J Neurosurg* 2009;23:585-95.

Collins, V.P. *et al.* brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004 75: ii2-ii11 : 10.1136/jnnp.2004.

Dayalan, A. H. *et al.* Age dependent phosphorylation and deregulation of p53 in human vestibular schwannomas. *Mol Carcinog*. 2006 Jan;45(1):38-46.

Drevelgas.*et al.* Extra-axial brain tumors. *Eur Radiol*. 2005 Mar;15(3):453-67. Epub 2004 Dec 31.

Ellison DW, Dalton J, Kocak M, et al. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/ WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 2011; 121(3):381–396.

Endersby, R., Baker, S. J. *PTEN* signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis .Department of Developmental Neurobiology, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA *Oncogene* (2008) 27, 5416–5430& 2008 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/08.

Filipp, F. V.*et al.* Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(3):375–383. (2012).

Frum, R. A. Grossman S. R. Mechanisms of mutant p53 stabilization in cancer. GAO, F.*et al.* DNA Methylation in the Malignant Transformation of Meningiomas. *PLoS One*. 2013;8(1):e54114.

Giargaspero, F. *et al.* Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior. *Am J Surg Pathol.* 1992; 16(7):687–693.

Gomez, P. G. Promoter methylation status of multiple genes in brain metastases of solid tumors. *Int J Mol Med.* 2004 Jan;13(1):93-8.

Gomez, P. G. *et al.* CpG Island Methylation in Sporadic and Neurofibromatosis Type 2-Associated Schwannomas *Clin Cancer Res* November 15, 2008 9; 560.

Goschzik, T. *et al.* PTEN mutations and activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in papillary tumors of the pineal region. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014 Aug;73(8):747-51.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* Volume 144, Issue 5, 4 March 2011, Pages 646–674.

Hanemann, C.O., Evans, D.G. News on the genetics, epidemiology, medical care and translational research of Schwannomas. *J Neurol.* 2006 Dec;253(12):1533-

Hansson, E. *et al.* Brain primary culture-- a characterization (part II). *Brain Res.* 1982 Jan 7;231(1):173-83.

Herrera, J.C. *et al.* Detection of chromosome 17 aneuploidy and TP53 gene deletion in a broad variety of solid tumors by dual-color fluorescence in situ hybridization (FISH). *Biomedica.* 2010 Jul-Sep;30(3):390-400.

Horbinski, C. *et al.* What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? Received: 18 February 2013 / Accepted: 9 March 2013 / Published online: 20 March 2013 .Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.

Huse, J. T. Holland, E. C. Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain Pathol.* 2009 Jan;19(1):132-43.

INCA. Instituto nacional de Câncer. Disponível em: [HTTP://www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) Acesso em 12/01/2015.

INVS. Institut de Veille Sanitaire. Disponível em: ([HTTP://www.invs.santre.fr](http://www.invs.santre.fr)). Acesso em 07 de janeiro de 2013.

Kay, K. *et al.* Signaling pathway and molecular subgroups of Medulloblastoma. Received April 19, 2013; Accepted May 21, 2013; Epub June 15, 2013; Published July 1, 2013.

Kenzelmann, M. Evidence for a magnetically driven superconducting Q phase of CeCoIn<sub>5</sub>. *Phys Rev Lett.* 2010 Mar 26;104(12):127001. Epub 2010 Mar 25.

Kim, K. E. *et al.* Department of Laboratory Medicine, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea. Cytogenetic characterizations of central nervous system tumors: the first comprehensive report from a single institution in Korea. *J Korean Med Sci.* 2009 Jun; 24 (3): 453-60. Epub 2009.

Knockdown of EphB1 receptor decreases medulloblastoma cell growth and migration and increases cellular radiosensitization Shilpa Bhatia, Oncotarget, Advance Publications 2015.

Korshunov A, Remke M, Werft W, et al. Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. *J Clin Oncol.* 2010; 28(18):3054–3060.

Lachlan, K. L. *et al.* Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers. (2007). *J Med Genet* 44: 579–585.

Liu, J. G. *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and PTEN in malignancy brain tumors. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006 Nov;37(6):868-71.

Liu, P. I. *et al.* Intraspinal clear-cell meningioma: case report and review of literature. *Surg Neurol.* 2005 Mar;63(3):285-8; discussion 288-9.

Lotter, O. *et al.* Prognostic significance of p53-expression in colorectal carcinoma as measured by a luminometric immunoassay. *Ger Med Sci.* 2010 Oct 8;8:Doc24. doi: 10.3205/000113.

Michael, E. *et al.* Molecular biology of familial and sporadic vestibular schwannomas: implications for novel therapeutics *Journal of Neurosurgery.* Feb 2011 / Vol. 114 / No. 2 / Pages 359-366.

Muller, P. A., Vousden, K. H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.* 2014 Mar 17;25(3):304-17. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.021.

Myung J. K. *et al.* Clinicopathological and genetic characteristics of extraventricular neurocytomas. *Neuropathology.* 2013 Apr;33(2):111-21. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01330.x. Epub 2012 Jun 4.

Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nature reviews Cancer.* 2012; 12:818–834.

Oermann, E. K. *et al.* Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:370–80.

Pećina-šlaus, N. *et al.* Frequency of loss of heterozygosity of the *NF2* gene in schwannomas from Croatian patients *Croat Med J.* 2012 August; 53(4): 321–327.

Pflaum, J., Schlosser, S., Müller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol.* 2014 Oct 21;4:285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285. e Collection 2014.



Rey, J.A. Pestaña, A., Bello, M.J. Cytogenetics and molecular genetics of nervous system tumors. *Oncol Res.* 1992;4(8-9):321-31.

Sakamoto, R. *et al.* Estimation of proliferative potentiality of central neurocytoma: correlational analysis of minimum ADC and maximum SUV with MIB-1 labeling index. *Acta Radiol.* 2014 Jan 29. pii: 0284185114521187.

Sharma, M. C., Deb, P., Sharma, S. Neurocytoma: A Comprehensive Review. *Neurosurg Rev* 2006;29:270-85; Discussion 285.

Soussi, T. *et al.* Advances in carcinogenesis: a historical perspective from observational studies to tumor genome sequencing and TP53 mutation spectrum analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Dec;1816(2):199-208. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.07.003. Epub 2011 Jul 23.

Spreafico F, Massimino M, Gandola L, et al. Survival of adults treated for medulloblastoma using paediatric protocols. *Eur J Cancer.* 2005; 41(9):1304–1310.

Subhasree, N. *et al.* The MDM2-p53 pathway revisited. *The Journal of Biomedical Research*, 2013, 27(4):254-271 Invited Review.

Suresh, T. N. *et al.* Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant occurring in the very young-clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Childs Nerv Syst.* 2004; 20(1):55–60.

Talmadge, J. E., Fidler, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

The TP53 Web Site. Disponível em ([http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_info.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_info.html)). Acesso em 02/01/2015.

Tomasetti, C. Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 2015 Jan 2;347(6217):78-81. doi: 10.1126/science.1260825.

Vasconcelos, D. S. *et al*. Numerical aberrations of chromosome 17 and TP53 in brain metastases derived from breast cancer. 2013. *Genet Mol Res*. 2013 Jan 4;12(3):2594-600.

Weber, E.D. *et al*. Aberrant regeneration of the oculomotor nerve: implications for neurosurgeons. *Neurosurg Focus*. 2007;23(5):E14.

Weber, R.G. *et al*. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14719-24.

Westphal, M., Stavrou, D., Nausch, H. Human neurocytoma cells in culture show characteristics of astroglial differentiation. *J Neurosci Res* 1994;38:698-704.

Wiencke, J.K. *et al*. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2007 Jul;9(3):271-9. Epub 2007 May 15.

World Health Organization (WHO). Disponível em: [HTTP://www.who.int](http://www.who.int) Acesso em 12/01/2015.

Wu, L. *et al*. Primary spinal neurocytoma involving the medulla oblongata: two case reports and a literature review. *Acta Radiol*. 2014 Jan 29. pii: 0284185114521187.

Xiao, W. Z. *et al*. Relationships between PTEN gene mutations and prognosis in glioma: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Jul;35(7):6687-93.

Yang, B. *et al*. Molecular mechanisms of “off-on switch” of activities of human IDH1 by tumor-associated mutation R132H. (2010) *Cell Res* 20(11):1188–1200.

Yang, H. *et al.* *IDH1* and *IDH2* mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res.* Oct 15, 2012; 18(20): 5562–5571.

Yen, K. E. *et al.* Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 29(49):6409–6417. (2010).

ZHANG, S., YU. D. PI(3)K Apart PTEN's Role in Cancer. *Clin Cancer Res* 2010, 1;16(17):4325-30.

Zou, P. *et al.* IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. 1 Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing Medical University, Nanjing, 2013. China. 2 School of Public Health.