UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS GENES *TP53, PTEN, IDH1* E *IDH2* EM AMOSTRAS DE GLIOMAS

IGOR ANDRADE PESSÔA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

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

Belém

Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS GENES *TP53, PTEN, IDH1* E *IDH2* EM AMOSTRAS DE GLIOMAS

IGOR ANDRADE PESSÔA

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
(ICB/UFPA – Orientador)

_____

Profª. Drª. Maria Lúcia Harada
(ICB/UFPA – Membro)

_____

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

_____

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
(ICB/UFPA – Membro)

Belém
Fevereiro – 2014

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

- Universidade Federal do Pará (UFPA)

a) Laboratório de Biologia Molecular da UFPA Francisco Mauro Salzano, ICB

- Instituto Evandro Chagas

a) Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM

- Hospital Ophir Loyola

FONTES DE FINANCIAMENTO:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

- Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre me deu forças e coragem para lutar por meus objetivos, sempre guiando meus passos no sentido de conquistar meus ideais.

Aos meus pais Ivanildo Pessôa e Maria Ledian, responsáveis diretos pela minha educação, ensinando-me quase tudo que sei, a quem devo meus valores e caráter, sempre fazendo o possível pelo meu bem estar. **Amo vocês.**

Aos amigos e demais familiares, que sempre estiveram presentes em momentos importantes na minha vida, dando todo tipo de apoio sempre que preciso. Agradeço em especial a minha namorada Michelle Abreu, pelo apoio, companhia e cumplicidade diária, por compartilhar dos momentos de alegria e tristeza, estando sempre presente.

Ao meu orientador, Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, que muito me ensinou através de sua integridade moral e profissional. Agradeço pela amizade, paciência, dedicação e credibilidade depositada em mim ao longo dos anos e a todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos professores Nilson Praia, Bárbara Borges e Claudia Regina pela amizade e diversos ensinamentos na rotina laboratorial que muito contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Francisco Mauro Salzano e Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, que contribuíram de maneira direta ou indireta para a elaboração e conclusão deste projeto.

A equipe de neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola, com a qual se formou uma parceria que permitiu que esse projeto fosse desenvolvido. Agradeço muito aos pacientes que fizeram parte desse estudo, que permitiram o desenvolvimento do mesmo e contribuem de maneira imensurável ao avanço da pesquisa.

Agradeço também às instituições que financiaram e apoiaram esse projeto: CNPq, CAPES, UFPA, IEC e HOL.

SUMÁRIO

SUMÁRIO 5
LISTA DE ABREVIATURAS 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 10
RESUMO 11
ABSTRACT 12

1. INTRODUÇÃO 13
1.1. CÂNCER – DEFINIÇÕES GERAIS 13
1.2. TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL 14
1.2.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA 17
1.3. GLIOMAS 19
1.3.1. TUMORES ASTROCÍTICOS 20
1.3.2. OLIGODENDROGLIOMAS 21
1.3.3. OLIGOASTROCITOMAS 21
1.3.4. EPENDIMOMAS 21
1.3.5. FATORES DE PROGNÓSTICO E TRATAMENTO EM GLIOMAS 22
1.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS GLIOMAS 23
1.4.1. ALTERAÇÕES NO GENE *TP53* 25
1.4.2. ALTERAÇÕES NO GENE *PTEN* 29
1.4.3. OS GENES *IDH1* e *IDH2* 33

2. OBJETIVO 37
2.1. OBJETIVO GERAL 37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

3. MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1. CASUÍSTICA 38
3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA 39

3.3. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) 39
3.4. POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP) 41
3.5. SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA 42
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 43

4. RESULTADOS 44
4.1. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA 44
4.2. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *TP53* 45
4.3. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *PTEN* 50
4.4. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *IDH1* E *IDH2* 51

5. DISCUSSÃO 56
5.1. *TP53* 56
5.2. *PTEN* 62
5.3. *IDH1/2* 64

6. CONCLUSÕES 72

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

ANEXOS 88

LISTA DE ABREVIATURAS

CBTRUS	Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos
CDKN2A	Ibibidor de Cinase Ciclina-Dependente 2ª
CDKN2B	Ibibidor de Cinase Ciclina-Dependente 2B
CDK4	Cinase Ciclina-Dependente 4
CDK6	Cinase Ciclina-Dependente 6
COSMIC	Catálogo de Mutações Somáticas no Câncer
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
FAK	Cinase de Adesão Focal
GBM	Glioblastoma Multiforme
Glut1	Transportador de Glicose 1
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
IDH3	Isocitrato desidrogenase 3
IEC	Instituto Evandro Chagas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KPS	Performance Status de Karnofsky
LOH	Perda de Heterozigose
MDM2	Murine Double Minute
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
NAD^+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
$NADP^+$	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NF-1	Neurofibromatose tipo 1
NF-2	Neurofibromatose tipo 2
NLS	Sinalização de Localização Nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBD	Domínio de Ligação a Fosfatidilinositol
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PGK1	Fosfoglicerato Cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-,4 ,5-Bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Cinase
PTEN	Fosfatase Homóloga a Tensina
RB1	Retinoblastoma 1
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
SHC	Proteína Adaptadora da Sinalização SHC
SNC	Sistema Nervoso Central
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples
TA	Temperatura de Anelamento
TP53	Proteína Tumoral p53
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
α –KG	α -Cetoglutarato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características do câncer 14

Figura 2: Resumo das alterações moleculares mais frequentes em gliomas astrocitários, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas 25

Figura 3: Localização cromossômica e organização estrutural do gene *TP53* e proteína p53 26

Figura 4: Ilustração esquemática das vias de ação da proteína p53 27

Figura 5: Localização cromossômica e organização estrutural do gene e proteína PTEN 30

Figura 6: Atuação da PTEN no controle do ciclo celular, metabolismo, apoptose, reparo do DNA e crescimento celular através da interação com a via PI3K/AKT 31

Figura 7: Via de sinalização das isocitrato desidrogenases 1 e 2 34

Figura 8: Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 4 a 11 do gene *TP53* 46

Figura 9: Alterações Nucleotídicas Identificadas no *TP53* 47

Figura 10: Frequência de mutação no *TP53* por subtipo tumoral 48

Figura 11: Frequência de mutação no *TP53* por estadiamento tumoral 49

Figura 12: Frequência de mutação no *TP53* por grupo tumoral 49

Figura 13: Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 5,6 e 7 do gene *PTEN* 50

Figura 14: Alterações nucleotídicas identificadas no *PTEN*. Mudança de T→G (heterozigoto) na posição 85344 da região de íntron 51

Figura 15: Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 4 dos genes *IDH1* e *IDH2* 52

Figura 16: Alterações nucleotídicas identificadas no *IDH1*. Mudança de G→A no codon 132 do éxon 4 (Arg/His) 53

Figura 17: Frequência da mutação R132H por subtipo tumoral 54

Figura 18: Frequência da mutação R132H por estadiamento 55

Figura 19: Frequência da mutação R132H por grupo tumoral 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos gliomas 20

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados para o *TP53* 40

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para o *PTEN* 41

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para os genes *IDH1* e *IDH2* 41

Tabela 5: Condições de execução do gel de SSCP para o gene *TP53* 42

Tabela 6: Condições de execução do gel de SSCP para o gene *PTEN* 42

Tabela 7: Condições de execução do gel de SSCP para os genes *IDH1* e *IDH2* 42

Tabela 8: Classificação da amostra de acordo com os subtipos histológicos, idade no diagnóstico e razão homens:mulheres 44

Tabela 9: Comparação entre as médias de idade de acordo com o grau de malignidade por ANOVA (um critério). Pós-teste: Teste de Tukey 45

Tabela 10: Amostras alteradas para o gene *TP53* após triagem pela técnica de PCR-SSCP 46

Tabela 11: Mutação do *TP53* de acordo com a idade 48

Tabela 12: Amostras alteradas para o gene *IDH1* após triagem pela técnica de PCR-SSCP 52

Tabela 13: Mutação R132H de acordo com a idade 54

RESUMO

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores derivados das células da glia. São divididos em subgrupos baseados na morfologia histológica e similaridade das suas células com células da glia diferenciadas. Desta forma, são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde, em: astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e ependimomas. Como a maioria dos cânceres, gliomas se desenvolvem como resultado de alterações genéticas que se acumulam com a progressão do tumor. Tendo em vista a importância das mutações nos gene *TP53, PTEN, IDH1* e *IDH2* nas diferentes propostas da gênese e progressão de gliomas, este trabalho teve como objetivo geral analisar a ocorrência de mutações nesses genes através de PCR/SSCP seguida de sequenciamento direto, comparando os resultados obtidos entre tumores de diferentes graus de malignidade e avaliando a presença de associações estatísticas entre as diferentes variáveis estudadas. O gene *TP53* apresentou mutação em 12,2% (6/49) das amostras, acometendo principalmente os éxons 5 e 7. Não houve associação estatística entre a presença de mutação nesses genes e as variáveis sexo, idade e gradação tumoral. No entanto, todas as mutações foram identificadas nos astrocitomas, sugerindo um papel na gênese e progressão desse subtipo tumoral. O gene *IDH1* se apresentou mutado em 17,6% (6/34) dos casos, enquanto que nenhuma mutação no gene *IDH2* foi identificada. Os testes estatísticos não mostraram relação significante entre as mutações identificadas em *IDH1* e as variáveis estudadas. Em relação ao *PTEN*, apenas uma mutação no íntron 4 foi identificada em 1 caso. Considerando-se o estadiamento dos casos que apresentaram mutações, sugere-se que mutações nos genes *TP53* e *IDH1* são eventos precoces na progressão dos gliomas, o que pode ser útil do ponto de vista clínico no que se diz respeito ao acompanhamento dos pacientes e desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas.

Palavras-chave: Glioma, Mutação, SSCP, Sequenciamento, *TP53*, *PTEN*, *IDH1*, *IDH2*.

ABSTRACT

Glioma is the term used to describe tumors derived from glial cells. They are divided into subgroups based on the histological morphology and similarity of their cells with differentiated glial cells. Thus, they are classified according to the World Health Organization, into: astrocytomas, oligodendrogliomas, ependymomas and oligoastrocitomas. Like most cancers, gliomas develop as a result of genetic changes that accumulate with tumor progression. Given the importance of mutations in *TP53*, *PTEN*, *IDH1* and *IDH2* genes in different proposals of the genesis and progression of gliomas, the aim of the present study was to analyze the occurrence of mutations in these genes by PCR/SSCP followed by sequencing, comparing the results obtained from tumors of different malignancy grades and evaluating the presence of statistical associations between different variables. The *TP53* mutation was found in 12.2% (6/49) of the samples, mostly in the exons 5 and 7. There was no statistical association between the presence of mutations in these genes and the sex, age or tumor grade variables. However, all mutations occurred in astrocytomas, suggesting a role in the genesis and progression of this tumor subtype. Mutations in *IDH1* gene were observed in 17.6 % (6 /34) of cases, whereas no mutations in *IDH2* gene were identified. Statistical tests showed no significant relationship between the identified mutations in *IDH1* and the variables. Regarding *PTEN*, only a mutation in exon 4 was identified. Considering the grading of tumor with mutations, it was concluded that mutations in *IDH1* and *TP53* genes are early events in the progression of gliomas, which can be useful in a clinical standpoint as regards the monitoring of patients and development of more specific therapeutic strategies.

Keywords: Glioma, Mutation, SSCP, sequencing, *TP53*, *PTEN*, *IDH1*, *IDH2*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER – DEFINIÇÕES GERAIS

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Uma vez que essas células se dividem rapidamente, tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2014). Surge como resultado de alterações genéticas e epigenéticas que alteram em vários aspectos, a fisiologia celular normal (Hanahan & Weinberg, 2011). Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas (deleções, duplicações, translocações, inversões), mutações com ganho ou perda de função e polimorfismos, ocorrendo comprometimento da manutenção da integridade genômica, promovendo assim a instabilidade da homeostase celular (Sugimura & Ushijima, 2000; Richardson, 2003; Jelonek *et al.,* 2010).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo no qual estão envolvidas anormalidades em muitos genes. A combinação de vários genes mutados pode revelar as relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, além de identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de tratamentos (Yeang *et al.,* 2008). Os genes mais frequentemente envolvidos na origem das neoplasias malignas pertencem aos seguintes grupos: oncogenes, genes supressores de tumor e genes envolvidos no reparo do DNA (Brennan, 2002).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), para que todo câncer se desenvolva, são necessárias ocorrências de alterações essenciais na fisiologia celular que, juntas, determinam o crescimento maligno (Figura 1). À medida que as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, adquirem uma sucessão dessas alterações, e o processo de múltiplas etapas na patogênese de tumores humanos poderia ser racionalizado pela necessidade de células cancerosas incipientes adquirirem os traços que permitem que elas se tornem tumorigênicas e, finalmente, malignas.

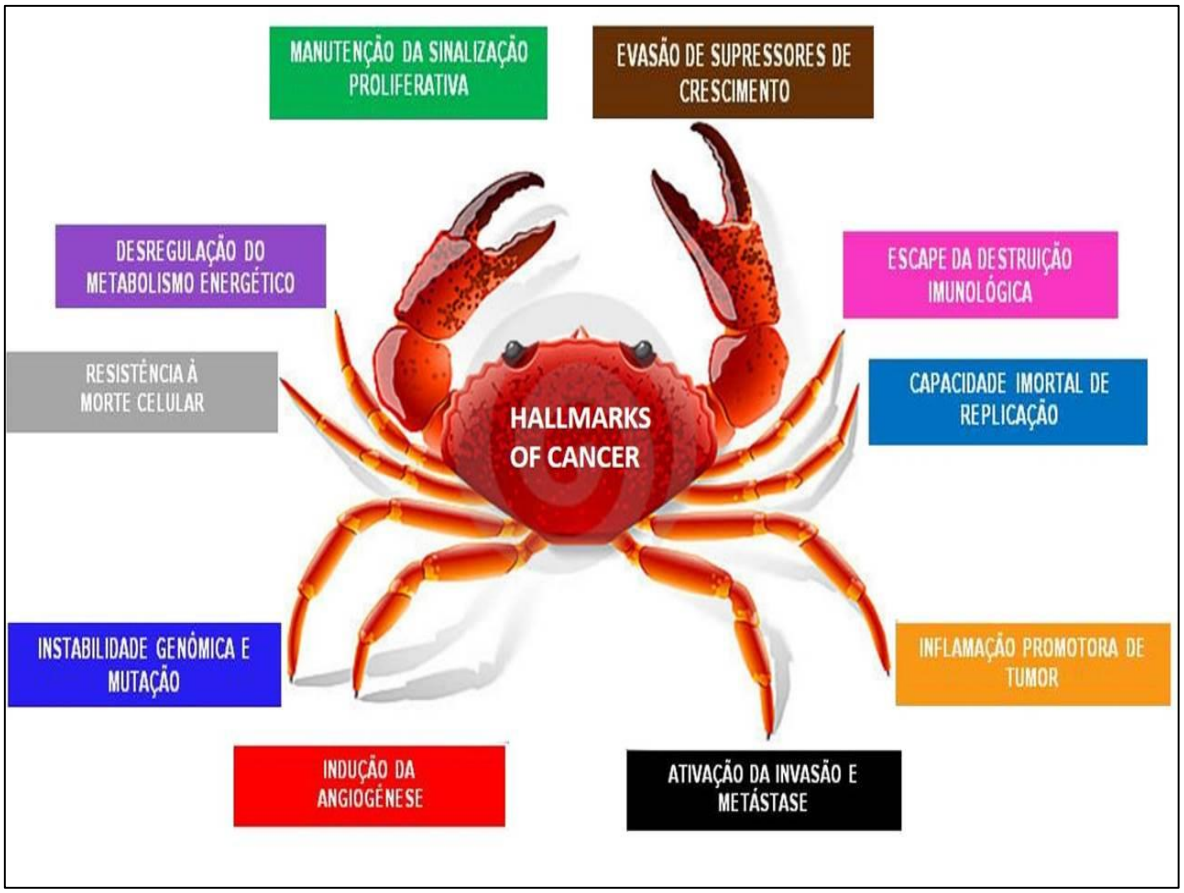

Figura 1. Características do câncer. Esta ilustração engloba as características presentes em células cancerosas. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

1.2. TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) constituem populações exclusivas e heterogêneas de neoplasias que incluem tumores benignos e malignos. Embora a incidência desses tumores seja baixa quando comparada a outras neoplasias, estão entre as mais sérias malignidades humanas, pelo fato de afetarem o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades vitais do ser humano (Ohgaki & Kleihues, 2005). Além disso, como cada região do cérebro tem uma função vital, algumas terapias empregadas em outras neoplasias não podem ser aplicadas na cura de tumores cerebrais, o que compromete muito a qualidade e a sobrevida do paciente (Louis *et al.,* 2002 ; Ohgaki & Kleihues, 2005; Riemenschneider *et al.,* 2010).

O câncer do SNC representa, na população mundial, aproximadamente, 2% de todas as neoplasias malignas (INCA, 2014). Dados do Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS, 2012) mostram um aumento significativo na incidência de tumores do SNC, primários ou não, nas três últimas décadas. Alguns fatores são apontados como prováveis causadores desse aumento, como, por exemplo, o crescimento do tabagismo entre as mulheres e adolescentes, a sobrevida maior da população mundial, com expectativa de vida ao redor dos 75 anos. Além disso, esse aumento pode ter ocorrido, na verdade, devido a uma melhor detecção, já que houve um grande avanço nas técnicas de diagnóstico de lesões do SNC, além do maior acesso da população aos recursos médicos de diagnóstico e tratamento (Clara, 2011; INCA 2014; CBTRUS, 2012).

A incidência anual é de aproximadamente 15 casos por 100.000 pessoas, apresentando relação direta com a idade. Do nascimento até os 4 anos de idade, a incidência é de 3,1 casos por 100.000 pessoas, apresentando uma queda na faixa etária de 15 a 24 anos. A partir dos 65 anos, a incidência aumenta progressivamente, com aproximadamente 18 casos por 100.000 pessoas ao ano (Riemenschneider & Reinferberger, 2009).

Dados mundiais da incidência de tumores do SNC revelaram que a incidência é mais elevada em homens do que em mulheres (aproximadamente, 3,7 e 2,6 em cada 100.000 pessoas por ano, respectivamente) (Ferlay *et al.,* 2004). Curiosamente, a incidência é mais elevada nos países mais desenvolvidos do que nos países menos desenvolvidos, mas estas diferenças podem ser consequência das diferentes práticas de diagnóstico e acesso a cuidados adequados de saúde (Suvi *et al.,* 2007). Alguns estudos indicam também que a população caucasiana tem uma maior incidência do que a africana ou a asiática (Ohgaki & Kleihues, 2009).

De acordo com dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), esperam-se 4.960 (taxa bruta de 5,07 por 100.000 indivíduos) casos novos de câncer do SNC em homens e 4.130 (taxa bruta de 4,05 por 100.000 indivíduos) em mulheres, para o Brasil, no ano de 2014. Esses valores

correspondem a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (Quadro 1) (INCA, 2014).

Ainda de acordo com os dados do INCA (2014), sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer do SNC em homens é o oitavo mais frequente na região Norte (2%). Nas regiões Nordeste (2,3%), Sul (1,8%) e Centro-Oeste (1,5%), ocupa a nona posição, enquanto na região Sudeste (1,4%) ocupa a 11º posição. Para as mulheres, ocupa a nona posição na região Centro-Oeste (1,7%) e é décimo mais frequente na região Norte (1,7%). Nas regiões Sul (1,7%) e Sudeste (1,4%) é o 11º mais frequente, enquanto que na região Nordeste (1,5%), é o 12º.

A maioria dos tumores do SNC se origina no cérebro, nervos cranianos e meninges. Mesmo não sendo muito frequente, esse câncer contribui significativamente para a morbidade global. As taxas de mortalidade por tumores do SNC variam de 3 a 7 óbitos por 100.000 pessoas por ano, sendo que a mortalidade, assim como a incidência é, em geral, maior em homens do que em mulheres (Ohgaki & Kleihues, 2005; Ohgaki, 2009).

Apesar do crescente número de estudos epidemiológicos em neuro-oncologia nos últimos anos, a etiologia específica e os agentes ou eventos responsáveis pelo surgimento e progressão dos tumores cerebrais permanecem indeterminados na maioria dos casos. Fatores de risco bem estabelecidos incluem: síndromes genéticas como neurofibromatose tipo 1 (NF-1), neurofibromatose tipo 2 (NF-2) (com maior risco para gliomas do nervo óptico e astrocitomas), Síndrome de Gorlin, Turcot, Von Hippel-Lindau, Li-Fraumeni, esclerose tuberosa; e a exposição à radiação ionizante. Outros fatores são controversos e incluem o uso do tabaco, álcool, telefone celular, trauma craniano e infecções (Chandana *et al.,* 2008).

Quadro 1. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária* no Brasil. Adaptado de INCA, 2014.

Localização Primária Neoplasia Maligna	**Estimativa dos Casos Novos**			
	Homens		**Mulheres**	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa bruta
Próstata	68.800	70,42	-	-
Mama Feminina	-	-	57.120	56,09
Colo do Útero	-	-	15.590	15,33
Corpo do Útero	-	-	5.900	5,79
Ovário	-	-	5.680	5,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	10.930	10,75
Cólon e Reto	15.070	15,44	17.530	17,24
Estômago	12.870	13,19	7.520	7,41
Cavidade Oral	11.280	11,54	4.010	3,92
Esôfago	8.010	8,18	2.770	2,70
Laringe	6.870	7,03	770	0,75
Bexiga	6.750	6,89	2.190	2,15
Leucemias	5.050	5,20	4.320	4,24
Sistema Nervoso Central	**4.960**	**5,07**	**4.130**	**4,05**
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	4.850	4,77
Pele Melanoma	2.960	3,03	2.930	2,85
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	880	0,83
Glândula Tireoide	1.150	1,15	8.050	7,91
Pele não Melanoma	203.930	-	190.520	-
Todas as Neoplasias	302.350	-	274.230	-

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

1.2.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os tumores primários do SNC exibem diversos tipos histológicos e origens citológicas, refletindo a complexidade tecidual e a variedade de tipos celulares característicos do sistema nervoso. À multiplicidade morfológica dessas

neoplasias acrescenta-se ainda a diversidade de manifestações radiológicas e de comportamentos biológicos. Todos esses fatores explicam as grandes dificuldades encontradas para o estabelecimento de uma classificação dos tumores do SNC com linguagem e aceitação universal (Kleihues & Cavenee, 2000).

Uma das classificações mais aceitas é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada na premissa de que cada tipo de tumor se origina de um tipo celular específico e os tumores são classificados em graus de malignidade com implicações terapêuticas e prognósticas (Louis *et al.,* 2007).

A gradação histológica é um meio de prever o comportamento biológico de uma neoplasia. Em termos clínicos, é um fator que influencia a escolha do tratamento, particularmente o uso de protocolos de radioterapia ou de quimioterapia adjuvante. Além da gradação dos tumores, outros critérios são necessários para prever a resposta à terapia, como: achados clínicos, idade, localização do tumor; padrões radiológicos, extensão da cirurgia, índice de proliferação e alterações genéticas (Kleihues & Cavenee*,* 2000; Louis *et al.,* 2007).

A classificação da OMS dos tumores do SNC inclui um sistema de gradação que, em última análise, é uma escala de malignidade, variando do grau de malignidade I (os menos agressivos biologicamente) e IV (os mais agressivos) (Louis *et al.,* 2007), baseada nas características das células tumorais, tais como, índice mitótico, atipia nuclear, proliferação microvascular, características invasivas, capacidade de necrose e no comportamento clínico destes tumores (Ponten, 1998; Louis *et al.,* 2007).

Na última década observou-se um avanço no conhecimento sobre os eventos moleculares associados ao fenótipo destes tumores (Mladkova & Chakravarti, 2009). Dessa forma, existe uma esperança de que tais conhecimentos possam gerar no futuro uma melhora da sobrevida e da qualidade de vida dos portadores dessas neoplasias, o que ainda não foi observado na prática, sobretudo se considerarmos o glioblastoma multiforme (GBM), cuja sobrevida a partir do diagnóstico é de aproximadamente um ano no adulto (Ohgaki & Kleihues, 2007). Portanto, ainda é necessária a realização de

pesquisas tanto laboratoriais quanto estudos clínicos com o objetivo de se obter um maior controle de longo prazo dos tumores primários do SNC.

1.3. GLIOMAS

O tecido cerebral é composto por dois tipos celulares, os neurônios e a glia. A grande importância da glia para a função cerebral é evidenciada pelo seu aumento percentual durante a evolução, constituindo 25%, 65% e 90% do total de células do tecido cerebral em, respectivamente, drosófila, roedores e humanos (Pfrieger & Barres, 1995). A glia é composta por diversos tipos celulares (50% astrócitos, 40% oligodendrócitos, 5% ependimócitos e 5% microglia), desempenhando as funções de suporte (estrutural, sanguíneo e nutricional), regeneração (Gimenez & Ribotta *et al*., 2001), desenvolvimento neuronal no SNC e apresentando capacidade de comunicação através das redes gliais (Kast, 2001).

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores derivados das células da glia. 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 (Markman, 2007).

Os gliomas são divididos em subgrupos baseados na morfologia histológica e similaridade das suas células com células da glia diferenciadas. Desta forma, são classificados, segundo a OMS, em: astrocitomas (derivados de astrócitos ou dos seus precursores), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos ou dos seus precursores) e oligoastrocitomas (linhagem mista), sendo estes, os três maiores subgrupos. No entanto, existe outro subgrupo, os ependimomas, (derivados de ependimócitos ou dos seus precursores) que, ocorrem com menor frequência (Figarella-Branger & Bouvier, 2005; Louis *et al.,* 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos gliomas. A incidência e a faixa etária mais prevalente são descritas consoante o subtipo glial. Adaptado de Louis *et al.,* 2007.

Tipo de Glioma	Nomenclatura	Grau	Incidência (% de todos os tumores cerebrais)	Idade
Astrocitoma	Astrocitoma pilocítico	I	5-6%	<20
	Astrocitoma difuso	II	10-15%	30-40
	Astrocitoma anaplásico	III	10-15%	45-50
	Glioblastoma multiforme	IV	12-15%	45-75
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma	II	2.5%	40-45
	Oligodendroglioma anaplásico	III	1.2%	45-50
Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma	II	1.8%	35-45
	Oligoastrocitoma anaplásico	III	1%	40-45
Ependimoma	Subependimoma	I	0.7%	50-60
	Ependimoma	II	4.7%	<16,30-40
	Ependimoma anaplásico	III	1%	>16

1.3.1. TUMORES ASTROCÍTICOS

Gliomas astrocíticos são tumores de origem neuroepitelial e representam o grupo mais comum de tumores do SNC, correspondendo em até dois terços de todos os tumores de origem glial, e diferem quanto à localização, faixa etária, incidência quanto ao sexo, achados morfológicos, potencial de crescimento e invasão, curso clínico e prognóstico (Cavenee *et al.*, 1997; Louis *et al.,* 2007). A classificação da OMS dos tumores do SNC de 2007 reconhece um total de sete entidades histológicas distintas de neoplasias astrocitárias. Estes podem ser grosseiramente divididos em dois grandes grupos: (1) o grupo mais comum de tumores astrocíticos difusamente infiltrativos compreende o astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme (GBM); (2) o grupo menos comum de tumores astrocíticos exibe um crescimento mais limitado, e inclue o astrocitoma pilocítico, o xantoastrocitoma pleomórfico, e o astrocitoma subependimário de células gigantes. Nessa classificação, gliomatose cerebral foi adicionada ao grupo dos tumores astrocíticos porque não é mais considerado como uma entidade distinta, mas como uma variante dos glioma astrocitários de crescimento difuso (Louis *et al.,* 2007; von Deimling, 2009).

1.3.2. OLIGODENDROGLIOMAS

São tumores que aparecem como massas bem definidas de cor rosa-acinzentada. Casos com extensa degeneração mucóide podem aparecer de forma gelatinosa. Calcificações são frequentes e podem transmitir uma textura arenosa ao tumor. Zonas de degeneração cística, bem como hemorragia intratumoral, também podem ser vistas (Louis *et al.,* 2007). São gliomas difusamente infiltrativos de celularidade moderada, sendo compostos de células monomórficas. As características adicionais incluem microcalcificações, degeneração mucóide/cística e uma densa rede de ramificações capilares. Presença de atipia nuclear e mitoses ocasionais são compatíveis com a classificação de grau II dessa neoplasia (Louis *et al.,* 2007).

1.3.3. OLIGOASTROCITOMAS

São gliomas difusamente infiltrativos constituídos por uma mistura de dois grupos distintos de células neoplásicas morfologicamente semelhantes às células tumorais em oligodendrogliomas e astrocitoma difusos de grau II. A aparência macroscópica não costuma permitir sua distinção de outros gliomas de grau II. Ocasionalmente há diferenças regionais na cor e consistência refletindo áreas distintas de diferenciação celular (Louis *et al.,* 2007). São neoplasias moderadamente celulares sem ou com baixa atividade mitótica. Microcalcificações e degenerações microcísticas podem estar presentes, mas necrose e proliferação microvascular estão ausentes. Surgem preferencialmente nos hemisférios cerebrais e ocasionalmente são encontrados no tronco cerebral, mas a localização cerebelar é muito rara (Louis *et al.,* 2007).

1.3.4. EPENDIMOMAS

São tumores gliais provenientes das superfícies internas dos ventrículos e medula espinal e representam 4,7% dos tumores primários cerebrais. Apesar de

certas características histológicas em comum, os ependimomas representam um grupo heterogêneo de tumores cujo comportamento biológico é dependente de variáveis histológicas, moleculares e clínicas. Embora o desenvolvimento de ependimomas geralmente seja atribuído à transformação neoplásica de células ependimais, esses tumores exibem padrões de expressão gênica que se assemelham às das células da glia radial (Taylor *et al.,* 2005), que dão origem às células ependimais durante o desenvolvimento normal (Spassky *et al.,* 2005). De acordo com a classificação da OMS, ependimomas e suas variantes (ependimoma celular, ependimoma papilar, ependimoma de células claras e ependimoma tanicítico) correspondem ao grau II (Louis *et al.,* 2007).

1.3.5. FATORES DE PROGNÓSTICO E TRATAMENTO EM GLIOMAS

Os fatores de prognóstico desfavoráveis mais claramente definidos em doentes com gliomas são: idade avançada, parâmetros clínicos agressivos, caraterísticas histológicas associadas com o aumento da malignidade (grau do tumor), pobre *performance status de Karnofsky* (KPS) (sistema de escore que classifica os pacientes de acordo com o grau de suas inaptidões ou deficiências funcionais, em uma escala de 0 a 100), índice de proliferação elevado e volume tumoral (Ricard *et al.,* 2012). Normalmente, os melhores prognósticos estão associados a doentes mais jovens, cujos tumores podem ser removidos e que têm uma boa resposta a cirurgia (Nakamura *et al.,* 2007).

Apesar do grande avanço no conhecimento destes tumores, as opções terapêuticas disponíveis no tratamento de gliomas, (que incluem, em linhas gerais, cirurgia, radioterapia e quimioterapia), ainda não são suficientemente eficazes no controle da progressão da doença e assim, o prognóstico dos doentes com gliomas continua a ser muito reservado (Maher *et al.,* 2001). Devido à complexidade dos gliomas, há a necessidade de um estudo multidisciplinar para integrar todas as informações e compreender melhor os mecanismos celulares e genéticos que estão envolvidos na biologia deste tipo de tumores (Maher *et al.,* 2001).

Temos que ressaltar a importância de um estudo multidisciplinar contínuo, no sentido de identificar biomarcadores de diagnóstico, de prognóstico e com vista à criação de novas estratégias terapêuticas que sejam mais eficazes na redução da mortalidade e morbilidade observadas nesta doença. Para que tais avanços ocorram é fundamental um acompanhamento do conhecimento, cada vez mais profundo, da biologia e da fisiopatologia dos gliomas.

1.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS GLIOMAS

Como no câncer em geral, gliomas se desenvolvem como resultado de alterações genéticas que se acumulam com a progressão do tumor. O conhecimento de alterações genéticas em diferentes tipos e grau de malignidade dos gliomas aumentou bastante nos últimos anos. Informações citogenéticas e moleculares são fundamentais para a identificação de genes-chave na tumorigênese, concentrando-se em regiões cromossômicas específicas. Para avaliar a relevância dessas alterações genéticas em tumores do SNC, uma avaliação cuidadosa dessas características genéticas para cada tipo histopatológico desses tumores é necessária (Kim *et al.,* 2009; Gupta & Salunke, 2012).

Várias alterações moleculares foram documentadas e relacionadas ao processo de iniciação e progressão dos gliomas. Em resumo, mutações no gene *TP53* foram descritas em mais da metade dos astrocitomas difusos grau II. Além disso, ganhos no braço longo do cromossomo 7 também estavam presentes. Em contraste, os tumores oligodendrogliais frequentemente mostram perdas combinadas do braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do cromossomo 19 (Riemenschneider *et al.,* 2010; Bourne & Schiff, 2010, Gupta & Salunke, 2012).

Neoplasias oligoastrocitárias estão geneticamente relacionadas com tumores oligodendrogliais ou tumores astrocíticos. Apenas recentemente, mutações no gene que codifica a Isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*), ou menos frequentemente do gene *IDH2*, foram identificados na grande maioria dos gliomas astrocitários, oligodendrogliais e oligoastrocitários grau II e III (Balss et al., 2008;

Yan *et al.,* 2009), sugerindo um evento inicial comum nestes tipos de gliomas histologicamente e biologicamente diversos.

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) muitas vezes carregam alterações genéticas adicionais associadas à progressão, tais como perdas dos genes supressores de tumor *CDKN2A, CDKN2B* e $p14^{ARF}$ em 9p21 e deleções nos cromossomos 6, 11p, 22q, entre outros. Além disso, amplificação de *CDK4* ou *CDK6* e alterações que inativam *RB1* foram detectadas em um subconjunto de gliomas anaplásicos, principalmente astrocitomas anaplásicos (Riemenschneider *et al.,* 2010).

Já os GBMs mostram complexas alterações cromossômicas e genéticas que levam à inativação de genes supressores diferentes, bem como a ativação de proto-oncogenes (Bourne & Schiff, 2010). Em particular, os glioblastomas primários mostram amplificação frequente de *EGFR* e mutações no gene *PTEN*, mas ausência de mutação em *IDH1*, enquanto glioblastomas secundários são caracterizadas por frequentes mutações nos genes *TP53* e *IDH1*, mas ausência de amplificação do *EGFR* (Bourne & Schiff, 2010). As principais alterações moleculares encontradas em gliomas astrocitários, oligodendrogliais e oligoastrocíticos podem ser visualizadas na figura 2.

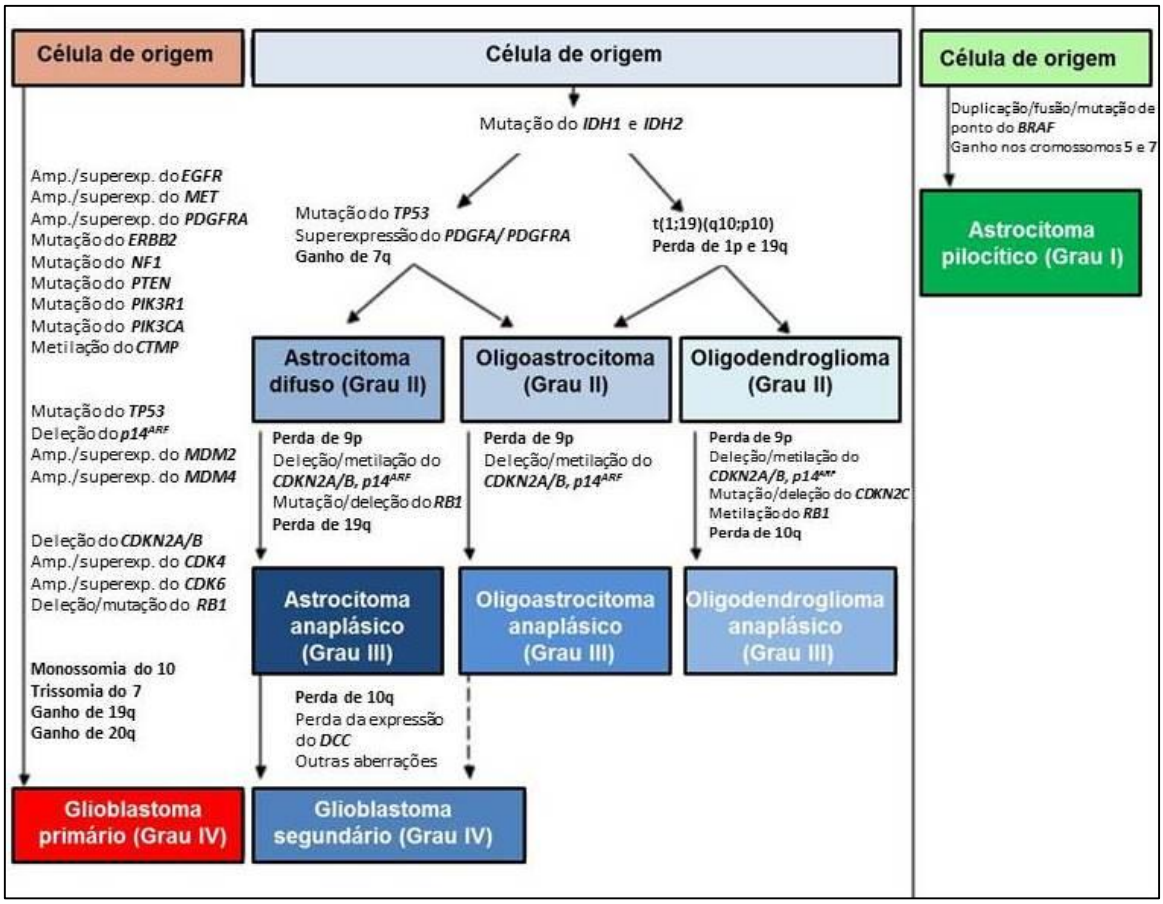

Figura 2. Resumo das alterações moleculares mais frequentes em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas. Adaptado de Bourne & Schiff, 2010.

1.4.1. ALTERAÇÕES NO GENE *TP53*

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (Figura 3a) e codifica uma fosfoproteína nuclear de massa molecular de 51 a 53 kDa. O tamanho aproximado é de 20 kb, sendo composto por onze éxons, onde o primeiro deles não é codificante (Figura 3b). A sequência codificante contém cinco domínios principais, cada um deles responsável por funções específicas (Figura 3c) (Belyi *et al.,* 2010; NCBI, 2014).

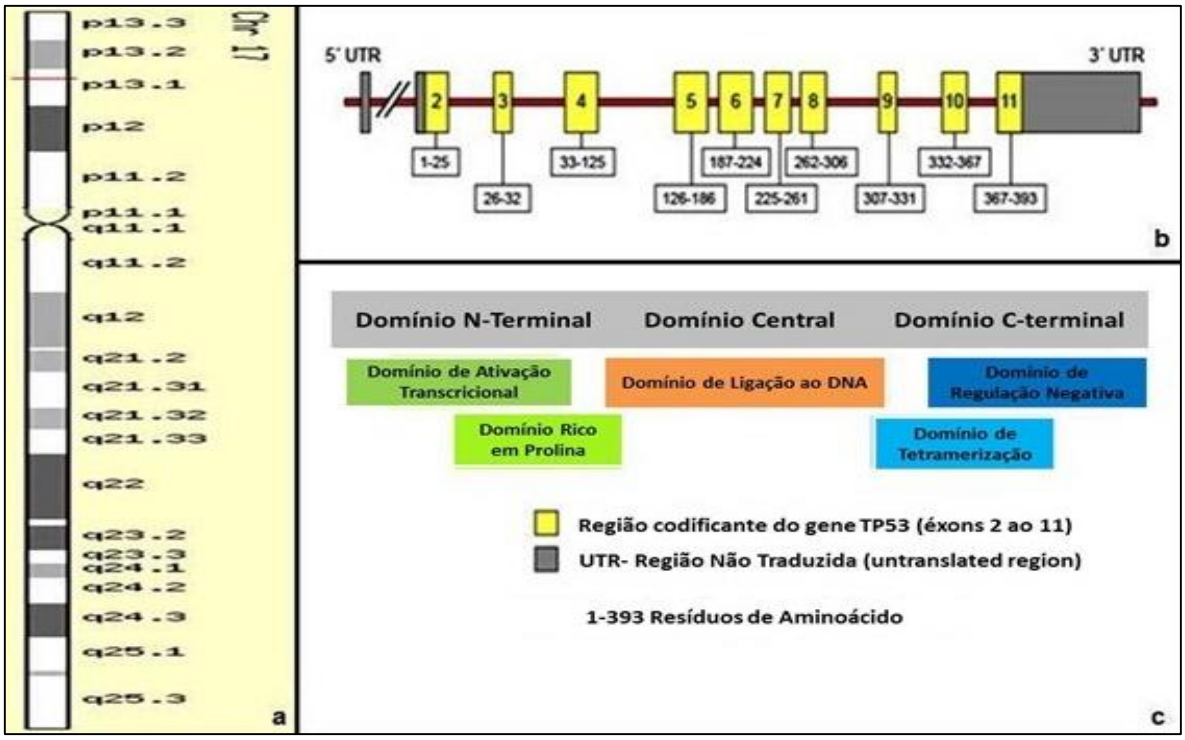

Figura 3. (a) Localização cromossômica do gene *TP53*. (b) Distribuição e tamanho dos éxons. (c) Representação dos principais domínios funcionais e estruturais da proteína. Fonte: (a) GeneCards (http://www.genecards.org); (b,c) Adaptado de St. Jude Children's Research Hospital (http://www.stjude.org).

A proteína p53 contém 393 aminoácidos (aa) em sua estrutura. O domínio inicial (aa 1 a 62), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína MDM2. É seguido por um domínio rico em resíduos de prolina (aa 63 a 97), outro sítio de transativação e pela região central da p53 (aminoácidos 102 a 292), que abriga o domínio de ligação ao DNA. O domínio de ligação ao DNA é alvo de mais de 90% das mutações somáticas encontradas nos tumores humanos esporádicos e das mutações germinativas. O domínio final ou C-terminal da p53 possui várias sequências de localização nuclear (NLS), o domínio de oligomerização (aa 323 a 356), que é fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros e o domínio de regulação (aa 363 a 393) (Scoumanne *et al.,* 2005; Belyi *et al.,* 2010).

A p53 é uma proteína nuclear conhecida como a "guardiã" do genoma. Uma de suas funções é impedir a proliferação de células que sofreram alguma alteração em seu material genético. Em condições fisiológicas esta proteína apresenta uma meia vida relativamente curta (aproximadamente 20 minutos).

Uma vez ativada, a p53 exerce seus efeitos a partir de dois mecanismos principais: (a) controle transcricional a partir da ativação ou repressão de genes específicos, e (b) pela sua interação no funcionamento de outra proteína a partir da formação de complexos. Mais de 50 genes foram descritos como envolvidos em elementos de resposta à p53. Eles incluem reguladores de pontos de checagem do ciclo celular em G1/S, G2 e durante a mitose. A ativação de p53 resulta na parada do ciclo celular em G1 e/ou G2/M, que vai possibilitar o reparo no ciclo celular, ou o encaminhamento da célula para apoptose (Figura 4) (Achatz, 2008).

A p53 inibe a proliferação celular por ativar o gene que codifica a proteína p21, um inibidor do complexo ciclina-proteína CDK. Quando a p21 é sintetizada em resposta ao estresse celular, os complexos ciclina-CDK são inativados, e a célula é parada, impedindo a progressão do estágio G1 para S da mitose (Snustad & Simmons, 2012) (Figura 4). Durante esta paralisação, o DNA danificado da célula pode ser reparado, garantindo assim, a integridade genética da célula. As células sem p53 funcional têm dificuldade em aplicar este mecanismo de inativação (Snustad & Simmons, 2012).

Figura 4. Ilustração esquemática das vias de ação da proteína p53 (Achatz, 2008).

Com base em estudos que examinaram toda a sequência codificante do gene, aproximadamente 86% das mutações ocorrem entre os códons 125 e 300, o que corresponde principalmente ao domínio de ligação de DNA. A maioria das mutações do gene *TP53* são de sentido trocado (73,21%), de acordo com dados obtidos da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) em 2013. Entre as substituições de base única, cerca de 25% são transições G: C>A: T em sítios CpG (IARC, 2013). Dinucleotídeos CpG mutam a uma taxa 10 vezes mais elevada do que outros nucleotídeos, gerando transições. Cerca de 3 – 5% das citosinas no genoma humano são metiladas na posição 5’ por um mecanismo pós-replicativo que é restrito a dinucleotídeos CpG e é catalisada pela DNA metiltransferases (Olivier *et al.,* 2009).

A 5’-metilcitosina (5mC) é menos estável do que a citosina e sofre desaminação espontânea em timina, a uma taxa cinco vezes mais elevada do que a base não metilada. Este processo é acentuado por radicais livres de oxigênio e nitrogênio, que geram um maior número de transições em CpG em tumores que surgem a partir de precursores inflamatórios, tais como esôfago de Barrett ou colite ulcerosa (Ambs *et al.,* 1999; Vaninetti *et al.,* 2008.) Entre os 22 sítios CpG do domínio de ligação ao DNA, três códons *hotspot* (175, 248 e 273) representam 60% das mutações CpG e outros cinco resíduos (196, 213, 245, 282, e 306) representam 26% destas mutações. A falta de mutações em outros locais de CpG reflete o fato de que a substituição destes resíduos não gera uma proteína disfuncional. Embora as mesmas mutações *hotspot* de CpG ocorram em muitos tipos de cânceres, outros tipos de mutações tendem a mostrar diferenças de um câncer para o outro. Algumas destas diferenças estão ligadas ao efeito de mutagênicos específicos. Diferenças geográficas também foram relatadas em relação com exposições ambientais (Olivier *et al.,* 2009).

As mutações no *TP53* descritas nos gliomas são principalmente mutações de sentido trocado e ocorrem em domínios evolutivamente conservados nos éxons 5, 7, e 8, que afeta os resíduos que são cruciais para a ligação da p53 ao DNA (Maher *et al.,* 2001; Faria *et al.,* 2012). Uma análise em um número maior de éxons desse gene poderia identificar mutaçãos que ainda não tenham sido descritas em gliomas.

Há evidências crescentes do papel de mutações nesse gene na iniciação, recorrência e progressão de gliomas de grau II - IV (principalmente dos tumores difusos), embora o seu papel nos gliomas de grau I permaneça controverso, uma vez que raramente é encontrado nestes tumores (Christensen *et al.,* 2010; Mellai *et al.,* 2012; Faria *et al.,* 2012). No entanto, apesar dos avanços, o papel do padrão diferencial de mutações específicas do *TP53* na carcinogênese cerebral é mal compreendida (Faria *et al.,* 2012).

1.4.2. ALTERAÇÕES NO GENE *PTEN*

O *PTEN* é um gene supressor que codifica uma proteína do tipo fosfatase lipoprotéica, identificada em 1997, com papel significante no ciclo celular e apoptose, além de aspectos relacionados à fisiologia da célula, incluindo regulação de adesão celular, migração e diferenciação (Di Cristofano & Pandolfi, 2000).

PTEN, também é conhecido como *MMAC1* ("*Mutated in Multiple Advanced Cancers*") está localizado no cromossomo 10 (10q23.3) (Figura 5a). Este gene consiste em 9 éxons, e codifica uma proteína composta por 403 aminoácidos de ~47kDa, que apresenta função de fosfatase de especificidade dupla (Figura 5b)(Christiane *et al.*, 2002). A estrutura dessa proteína apresenta dois principais domínios funcionais: um domínio fosfatase e um domínio C2, uma região de afinidade lipídica responsável pela união de PTEN à membrana plasmática através de um mecanismo cálcio-independente. Há também três regiões estruturais (um domínio de ligação a fosfatidilinositol-,4 ,5-bifosfato (PIP2) - Domínio PBD, uma cauda C-terminal contendo sequências PEST (Pro, Glu, Ser, Thr), seguida por um motivo de interação PDZ (Figura 5c) (Lee *et al.,* 1999; Song *et al.,* 2012).

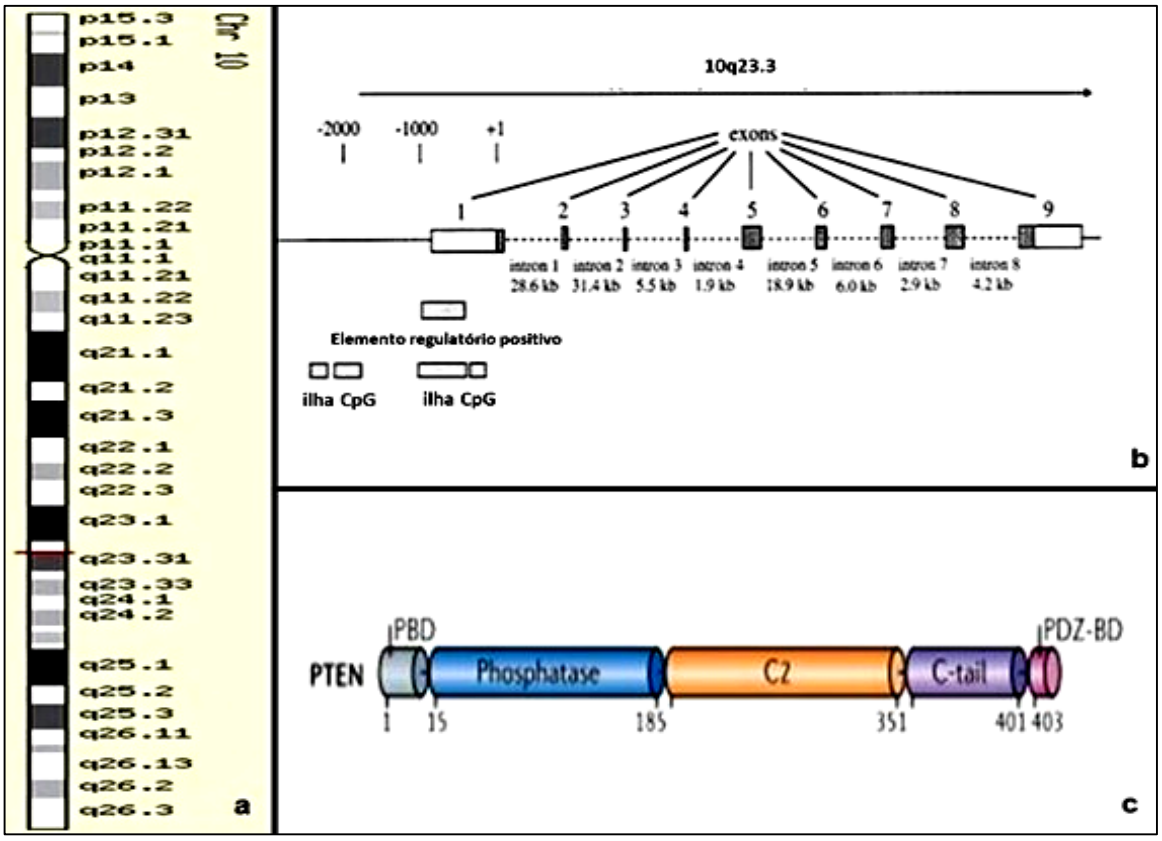

Figura 5. (a) Localização cromossômica do gene *PTEN*. (b) Distribuição e tamanho dos éxons e íntrons. (c) Representação dos principais domínios funcionais e estruturais da proteína *PTEN*. Fonte: (a) GeneCards (http://www.genecards.org); (b), adaptado de Christiane *et al.*, 2002; (c), Song *et al.,* 2012.

Estudos prévios mostraram que a PTEN é uma fosfatase de especificidade dupla que atua sobre substratos altamente ácidos. Ela desfosforila resíduos de serina, treonina e tirosina fosforilados em substratos peptídicos *in vitro* (Myers *et al.,* 1997), substratos protéicos, como FAK, e fatores de iniciação traducional eucarióticos 2 (Mounir *et al.,* 2009). Adicionalmente, a PTEN também se auto-desfosforila pela sua atividade fosfatase (Raftopoulou *et al.,* 2004). 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 fostato 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) (Zhang & Yu, 2010).

A PI3K-AKT é uma das principais vias de transdução de sinal que promovem o crescimento, sobrevivência e proliferação celular, além de contribuir para a evasão da apoptose, perda de controle do ciclo celular e instabilidade genômica durante a tumorigênese através de numerosos mecanismos (Manning & Cantley, 2007). A presença da PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização de PI3K/Akt, promovendo assim a progressão não coordenada do ciclo celular, migração celular e a viabilidade de metástase através da inibição de vários estímulos apoptóticos (Di Cristofano & Pandolfi, 2000).

Os Receptores de Tirosina Cinase (RTK) ativados recrutam e ativam PI3K, resultando em um aumento nos níveis de PIP3. Por sua vez, PIP3 recruta muitas proteínas para a membrana através da ligação a seus domínios de homologia da plecstrina (PH), incluindo a proteína AKT, fosfoinositídeo 3-cinase (PDK1) e a fosfatase PHLPPA. A AKT ligada à membrana é ativada através de sua fosforilação por PDK1 e por mTORC2, e é inativada quando desfosforilada por PHLPP. A AKT ativa pode fosforilar uma variedade de substratos, ativando ou inibindo seus alvos, resultando assim no crescimento celular, sobrevivência e proliferação por vários mecanismos (Figura 6) (Chalhoub & Suzanne, 2009).

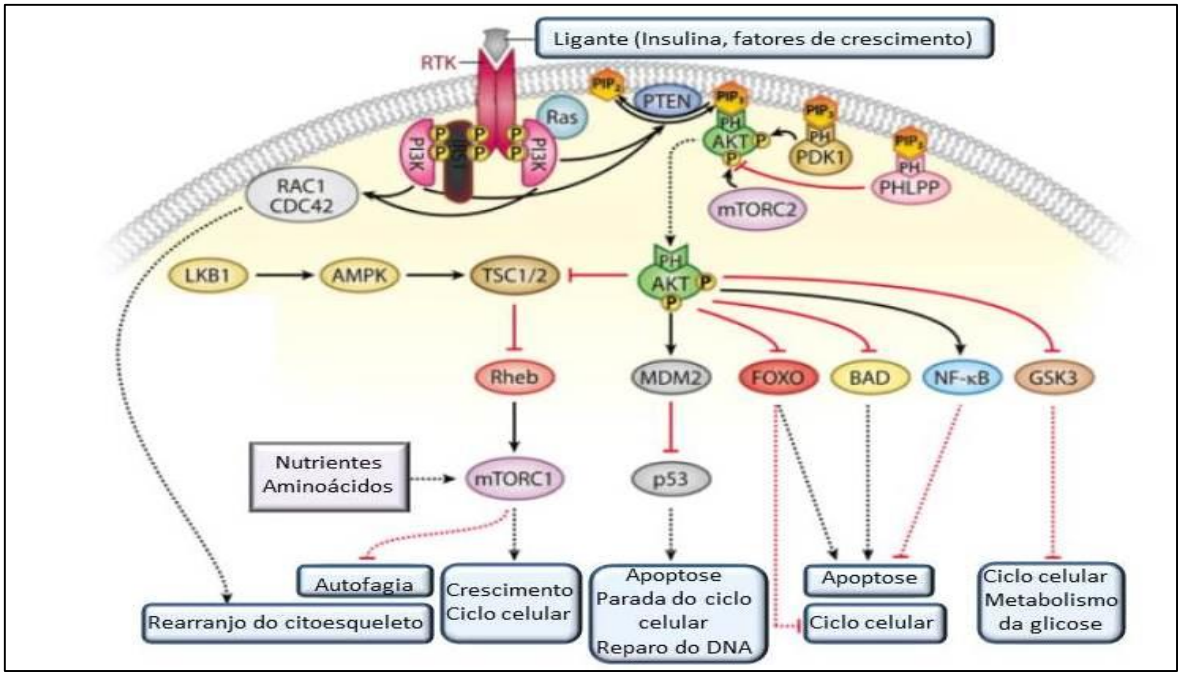

Figura 6. Atuação da PTEN no controle do ciclo celular, metabolismo, apoptose, reparo do DNA e crescimento celular através da interação com a via PI3K/AKT. Adaptado de Chalhoub & Suzanne, 2009.

Embora o domínio N-terminal seja responsável pela atividade fisiológica da PTEN, aproximadamente 40% de todas as mutações tumorigênicas descritas nesta proteína ocorrem no domínio C-terminal, sugerindo um importante papel dessa região na sua manutenção funcional (Georgescu *et al.,* 2000, Waite *et al.,* 2002).

Alguns estudos demonstraram que a região C-terminal engloba vários sítios de fosforilação (Ser-370, Ser380, Thr-382, Thr-383, e Ser-385) que são indispensáveis para a estabilidade dessa proteína (Miller *et al.,* 2002; Birle *et al.,* 2002). Na verdade, a deleção dessa região e mutantes resistentes a fosforilação são conhecidos por se tornar bastante instáveis e sofrem degradação rápida nas células (Miller *et al.,* 2002; Birle *et al.,* 2002). Além disso, acredita-se que o motivo de ligação PDZ é responsável pelo recrutamento de proteínas PTEN para a membrana plasmática, onde encontra o substrato PIP3, através da ligação de várias proteínas PDZ ancoradas a membrana (Takahashi *et al.,* 2006). Portanto produtos gênicos de PTEN em que falta o domínio C2 e o motivo de ligação PDZ, devido a mutações sem sentido e de mudança de matriz de leitura na junção de domínio C2 e cauda C, não são capazes de existir nas células como proteínas estáveis e funcionais (Takahashi *et al.,* 2006).

Estudos demonstraram que mutações no gene *PTEN* acompanham a progressão dos tumores cerebrais e, em conjunto com a LOH, são identificadas como o principal mecanismo de inativação do gene, principalmente em gliomas de alto grau e outras entidades tumorais, como câncer de mama, próstata, melanoma, entre outros (Wiencke *et al.,* 2007). Relatou-se que mutações do PTEN são mais freqüentemente observados em glioblastomas, menos comumente em astrocitomas anaplásicos, e raramente em gliomas de baixo grau (Abdullah *et al.,* 2006; Yang *et al.,* 2010). E de acordo com dados do Catálogo de Mutações Somáticas em Câncer (COSMIC, 2013), a maioria das mutações descritas neste gene são de sentido trocado (36,72%).

1.4.3. OS GENES *IDH1 e IDH2*

Pesquisadores descreveram que os genes isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) parecem estar envolvidos em processos metabólicos importantes, desempenhando papéis relevantes na biologia do câncer (Kang *et al.,* 2009). Assim, há uma crescente necessidade de se aprofundar os conhecimentos sobre a importância das mutações que afetam estes genes, no nível biológico e funcional, em pacientes que desenvolvem gliomas.

A Isocitrato desidrogenase é uma enzima que está incluída no ciclo do ácido cítrico, cuja função é catalisar a descarboxilação oxidativa do ácido isocítrico (isocitrato), tendo como produto alfa-cetoglutarato e dióxido de carbono, convertendo NAD^+ para sua forma reduzida: NADH (Hartmann *et al.,* 2009).

Cinco genes que codificam as isocitrato desidrogenases humanas foram identificados. O gene *IDH1* (2q33.3) codifica a isocitrato desidrogenase 1, uma enzima dependente de $NADP^+$ que pode ser encontrada no citoplasma, no reticulo endoplasmático e nos peroxissomas (Geisbrecht & Gould, 1999). Esta proteína forma um homodímero assimétrico (Xu *et al.,* 2004) e tem uma importante função no controle celular de danos oxidativos, pois cataliza a descarboxilação oxidativa de isocitrato a α-cetoglutarato (α-KG), o que resulta na produção de NADPH reduzido (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a partir de $NADP^+$ (Ciclo de Krebs) (Geisbrecht & Gould, 1999) (Figura 7). Assim no citoplasma, α-KG atua na degradação, dependente de oxigénio, da subunidade α do factor indutor de hipóxia (HIF-1α) (Pollard & Ratcliffe, 2009). O *IDH1* representa a maior fonte de produção de NADPH citosólico, o qual é necessário para a regeneração de glutationa reduzida, que funciona como principal antioxidante em células de mamífero (Lee *et al.,* 2002).

A enzima IDH2 (cujo gene se localiza em 15q26.1) é também dependente de $NADP^+$ e está localizada na mitocôndria, tendo uma função análoga à IDH1. Esta enzima funciona como um homodímero, semelhante a IDH1. Estudos recentes sugerem que a IDH2 pode ser a principal catalisadora para a oxidação de isocitrato a alfa-cetoglutarato do ciclo do ácido cítrico (Hartong *et al.,* 2008). A IDH3 por sua vez, é composta por três subunidades codificadas pelos genes

IDH3A (subunidade alfa) localizado em 15q25.1-q25.2, *IDH3B* (subunidade beta) em 20p13 e *IDH3G* (subunidade gama) em Xq28 (Hartmann *et al.,* 2009). Estão exclusivamente localizados na mitocôndria e a sua atividade enzimática depende de NAD+, desempenhando funções no ciclo de Krebs, como a produção de energia. Estas proteínas, porém, não têm sido associadas com o desenvolvimento de gliomas (Ying, 2008).

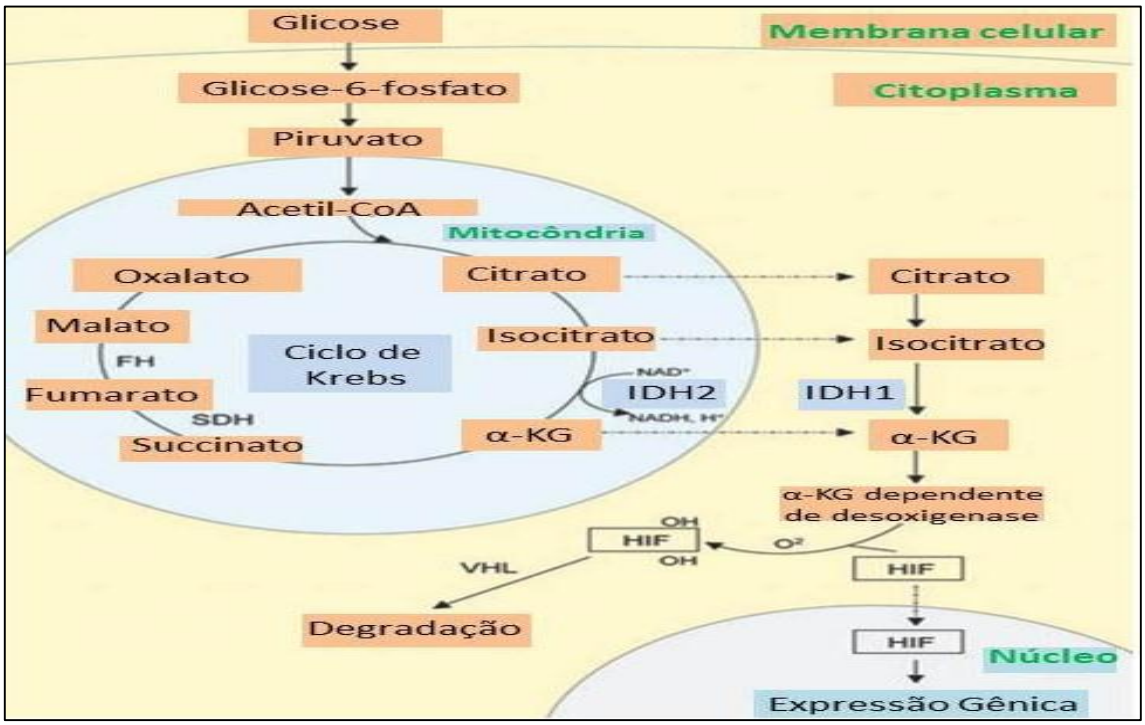

Figura 7 - Via de sinalização das isocitrato desidrogenases 1 e 2. (α-KG, α-cetoglutarato; NADP, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; HIF-1, fator0 indutor de hipóxia-1; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida). Adaptado de Ohgaki & Kleihues, 2009.

Mutações no *IDH1* foram inicialmente identificadas em 2008, em um pequeno número de glioblastomas que foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma (Parsons, 2008). Análises posteriores feitas em vários tipos de gliomas identificaram mutações no *IDH1,* como por exemplo em em astrocitomas grau II e III, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e glioblastomas secundários (Gupta *et al.,* 2011; Cohen *et al.,* 2013; Dunn *et al.,* 2013). Em contraste com os gliomas difusos, mutações nos genes *IDH* são muito raras ou ausentes em uma variedade de tumores grau I e II do SNC tais como astrocitoma

pilocítico, tumores de células gigantes subependimais, gangliogliomas típicos, ependimoma e xantoastrocitoma pleomórfico (Gupta *et al.,* 2011).

Mais de 90% das mutações descritas nos genes isocitrato desidrogenase afetam *IDH1* (Yan *et al.,* 2009) e quase todas são mutações de sentido trocado que resultam na substituição do aminoácido arginina no resíduo 132 (éxon 4), dentro do sítio de ligação ao substrato da enzima (Balss *et al.,* 2008; Parsons *et al.,* 2008). Aproximadamente 90% destas mutações resultam na substituição de arginina por histidina (R132H), que resulta na redução da atividade enzimática da proteína IDH1 mutante quando comparada à proteína *Wild-Type* (Yan *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2009*)*. Outras mutações de *IDH1* são muito menos comuns, e praticamente todas afetam o mesmo resíduo R132 (Gupta *et al.,* 2012).

A presença de uma mutação no gene *IDH1* inibe a formação do homodímero WT-WT (*Wild-Type–Wild-Type*) e conduz à formação do heterodímero WT-R132H (*Wild-Type*-Arg132His, por exemplo) que reduz a atividade enzimática e, como consequência, os níveis citoplasmáticos de α-KG são diminuídos (Zhao *et al.,* 2009). Esta diminuição conduz ao aumento dos níveis do fator de transcrição HIF-1 existente no citoplasma e o heterodímero, constituído por HIF-1α e HIF-1β, é transportado para o núcleo para exercer a sua função (Pollard & Ratcliffe, 2009). Este é um importante fator para a adaptação celular a baixos níveis de oxigénio e induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose, angiogênese, motilidade celular e invasão, assim como, genes envolvidos em vias de sinalização, que são críticos para o crescimento tumoral, tais como: o transportador de glicose 1 (Glut1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fosfoglicerato cinase (PGK1) (Zhao *et al.,* 2009).

As mutações no *IDH2* são muito menos comuns em gliomas (Dunn *et al.,* 2013). Porém quando acontecem, também ocorrem principalmente no éxon 4 do gene e afetam o resíduo de arginina no sítio de ligação do substrato IDH2, R172. Essas mutações pontuais resultam na substituição de arginina por lisina (R172K), metionina (R172M), glicina (R172G) e triptofano (R172W). Quando presente, as mutações *IDH2* estão frequentemente associadas com o fenótipo oligodendroglial (Gupta *et al.,* 2012; Dunn *et al.,* 2013). Mutações em IDH3 não têm sido relacionadas a processos neoplásicos (Reitman & Yan, 2010).

Vários métodos foram utilizados para a detecção de mutações em *IDH1* e/ou *IDH2* em espécimes clínicas de gliomas, incluindo a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), sequenciamento direto (Kang *et al.,* 2009; Labussiere *et al.,* 2010; Paugh *et al.,* 2010), pirosequenciamento e PCR em tempo real (Hartmann *et al.,* 2009; Horbinski *et al.,* 2010). Anticorpos monoclonais específicos recém-estabelecidos podem ser utilizados para análise, por imuno-histoquímica, de gliomas que apresentam a mutação R132H (Kato *et al.,* 2009; Capper *et al.,* 2010). Testes para detectar mutações em *IDH1* ou *IDH2*, como sequenciamento e imunohistoquímica, podem potencialmente ser incluídos em um ambiente clínico e, assim melhorar a precisão do diagnóstico, em especial, nos casos em que métodos tradicionais são insuficientes para obtenção de um diagnóstico efetivo (Capper *et al.,* 2010; Horbinski *et al.,* 2010).

As mutações do *IDH* aparentemente têm um papel importante em muitos aspectos dos gliomas, incluindo gliomagênese, prognóstico do paciente, e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. No entanto, a informação sobre as mutações desse gene em gliomas, tais como a sua prevalência, relação a outras alterações genéticas, e valor prognóstico, ainda é limitado em muitas populações (Mukasa *et al.,* 2012), e mais estudos devem ser realizados no intuito de se obter uma melhor compreensão do papel dessas alterações na iniciação, progressão e outros aspectos dos diversos tipos histopatológicos de gliomas.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência de mutações nos genes *TP53*, *PTEN, IDH1* e *IDH2* por meio de análises de PCR/SSCP seguidas de sequenciamento, comparando os resultados obtidos entre tumores de diferentes graus de malignidade, coletados em um hospital de referência em Belém – PA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar uma triagem de alterações nos éxons 4 - 11 do gene *TP53*, éxons 5 - 7 do gene *PTEN* e éxon 4 dos genes *IDH1* e *IDH2* utilizando como ferramenta a técnica de PCR-SSCP;

2. Determinar a sequencia daquelas amostras que apresentarem padrão de migração alterado no SSCP;

3. Identificar as mutações raras e/ou novas encontradas nessa amostragem;

4. Determinar a frequência das mutações identificadas na população de estudo;

5. Avaliar a prevalência de alterações genéticas em diferentes variáveis, como idade, tipo histológico e gradação tumoral;

6. Correlacionar os resultados encontrados com possíveis vias de progressão tumoral;

7. Comparar os dados obtidos com outros disponíveis na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Este trabalho vincula-se a um projeto intitulado “Caracterização Citogenética e Molecular de tumores do sistema nervoso humano na população paraense”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde – UFPA (025/06 CEP-CCS/UFPA) (Anexo I). Os pacientes ou seus parentes mais próximos foram informados sobre o estudo a ser realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitou-se a assinatura de um termo de livre consentimento (Anexo II), conforme rege a resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa em seres humanos, autorizando suas participações e possibilitando a coleta de material biológico para pesquisa. Os pacientes doadores da amostra não foram previamente submetidos a tratamentos de radioterapia e/ou quimioterapia.

Foram obtidas 49 amostras de tecido tumoral (37 astrocitomas, 6 ependimomas, 4 oligoastrocitomas e 2 oligodendrogliomas) de pacientes submetidos à cirurgia, no Serviço de Neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola (HOL) em Belém-PA entre os anos de 2006 a 2009. Após a remoção, os fragmentos tumorais foram imediatamente colocados em meio de cultura RPMI, contendo antibióticos e fungicidas, e transportados para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua, onde essas amostras foram processadas e armazenadas no freezer -86ºC. O diagnóstico histológico e a classificação dos tumores, incluídos neste estudo, foram efetuados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (Louis *et al., 2007*).

3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Primeiramente as amostras de tecidos tumorais estocadas no freezer -86ºC foram maceradas e posteriormente homogeneizadas em tampão de extração e digeridas 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).

Após a extração de DNA, procedeu-se à respectiva quantificação, sendo que a razão das absorvâncias aos 260 nm e 280 nm, assim como a razão das absorvâncias aos 260 nm e 230 nm foram sempre analisadas para permitir avaliar a quantidade e qualidade do DNA extraído. A quantificação do DNA foi efetuada no aparelho Nanodrop ND-2000 Spectrophotometer, versão 1.4.1, utilizando o *software* associado.

3.3. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Na pesquisa foram estudados os seguintes genes: éxons 4 - 11 do *TP53*; éxons 5-7 do *PTEN*; éxon 4 dos genes *IDH1* e *IDH2*. Os *primers* de cada região investigada foram desenhados por meio de programas especializados: Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/); Blat (http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html); Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/); e AutoDimer v1. As sequências dos pares de *primers* e o tamanho dos segmentos a serem amplificados estão descritos nas tabelas 2, 3 e 4.

As reações de PCR foram padronizadas realizando-se uma desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguidos por três ciclos repetidos em torno de 35 vezes; desnaturação a 95ºC por 1 minuto, anelamento dos primers com temperatura variável (TA) e a extensão a 72ºC por 50 segundos; após o término dos ciclos foi feita uma extensão final a 72ºC por cerca de 8 minutos. O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para se avaliar a qualidade da reação.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para o *TP53.*

Região	*Primer*	Tamanho do primer (pb)	Tamanho do éxon (pb)	TA
Éxon 4	**F**- 5' TTTCACCCATCTACAGTCCC 3'	20	279	54
	R- 5' CATTGAAGTCTCATGGAAGC 3'	20		
Éxon 5	**F**- 5' TTCACTTGTGCCCTGACTT 3'	19	184	57
	R- 5' AACCAGCCCTGTCCGTCTC 3'	19		
Éxon 6	**F** – 5' CAGGGCTGGTTGCCCAGGGTCCCCC 3'	25	113	59
	R – 5' ACTGACAACCACCCTTAACCCCTCC 3'	25		
Éxon 7	**F**- 5' TGCTTGCCACAGGTCT 3'	16	110	54
	R- 5' ACAGCAGGCAGTGT 3'	14		
Éxon 8	**F**- 5' CCACCGCTTCTTGTCCTGC 3'	19	137	58
	R- 5' CCTACTGCCTCTTTGCTTC 3'	19		
Éxon 9	**F**- 5' AGGGTGCAGTTATGCCTCAG 3'	20	74	52
	R- 5' ACTTGATAAGAGGTCC 3'	16		
Éxon 10	**F**- 5' CTGAGGCACAAGAATCAC 3'	18	107	59
	R- 5' TCCTATGGCTTTCCAACC 3'	18		
Éxon 11	**F** – 5' GGAAGGGTCAACATCTTTTACA 3'	22	1289	59
	R – 5' TAAAAAGGGAGAAGGAGGGG 3'	20		

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para o *PTEN.*

Região	*Primer*	Tamanho do primer (pb)	Tamanho do éxon (pb)	TA
Éxon 5	**F** - 5' ACCTGTTAAGTTTGTATGCAAC 3'	22	239	51
	R - 5' TCTGTTTTCCAATAAATTCTC 3'	21		
Éxon 6	**F** - 5' CTACGACCCAGTTACCATAGCA 3'	22	142	59
	R - 5' GGCTTCTTTAGCCCAATGAGTTG 3'	23		
Éxon 7	**F** - 5' TGACAGTTTGACAGTTAAAGG 3'	21	167	53
	R - 5' CTCCCAATGAAAGTAAAGTACA 3'	22		

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados para os genes *IDH1* e *IDH2.*

Região	*Primer*	Tamanho do primer (pb)	Tamanho do éxon (pb)	TA
IDH1	**F** - 5' CGGTCTTCAGAGAAGCCATT 3'	20	292	59
	R - 5' CACATACAAGTTGGAAATTTCTGG 3'	24		
IDH2	**F** - 5' AGCCCATCATCTGCAAAAAC 3'	20	161	60
	R - 5' TGTGGCCTTGTACTGCAGAG 3'	20		

3.4. POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)

Depois de amplificados por PCR, os fragmentos de interesse foram imersos em solução desnaturante e incubados a 95ºC por 5 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA. Em seguida, foi induzido o choque térmico por imersão em gelo nas amostras com intuito de estabilizar as bandas simples e posterior aplicação em gel de poliacrilamida, com a finalidade de executar a

técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) (Hayashi, 1991; Hayashi & Yandell, 1993). Para controle do padrão de migração no gel de SSCP, foram utilizadas amostras de indivíduos clinicamente saudáveis e sem histórico de câncer. As condições utilizadas para cada região de interesse estão descritas nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5: Condições de execução do gel de SSCP para o gene *TP53*.

Éxon	Concentração do Gel	Voltagem	Tempo
4	8%	240V	4h
5	8%	240V	4h30m
6	10%	200V	6h30m
7	8%	240V	5h30m
8	10%	100V	18h
9	8%	240V	4h30m
10	8%	240V	3h30m
11	8%	200V	2h30m

Tabela 6: Condições de execução do gel de SSCP para o gene *PTEN*.

Éxon	Concentração do Gel	Voltagem	Tempo
5	10%	230V	10h
6	10%	230V	10h
7	12%	220V	15h

Tabela 7: Condições de execução do gel de SSCP para os genes *IDH1* e *IDH2*.

Gene	Concentração do Gel	Voltagem	Tempo
IDH1	10%	220V	8h
IDH2	10%	220V	7h

3.5. SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA

Após ser realizada a SSCP, as amostras que apresentaram alteração foram encaminhadas para realização da técnica de sequenciamento direto,

utilizando o princípio da terminalização de cadeia descrito por Sanger *et al.* (1977).

Todos os sequenciamentos foram baseados no ensaio laboratorial com o kit *Big Dye™ Terminator (v.3.1)*, que utiliza como enzima a *AmpliTaq® DNA* (*Applied Biosystems*, CA, USA). Os *primers* foram os mesmos empregados na etapa da PCR. As amostras sequenciadas foram submetidas à eletroforese no *ABI 3500 Genetic Analyzer*, (*Applied Biosystems*, CA, USA) do Instituto de Estudos Costeiros (Bragança-PA), usando como polímero para migração dos fragmentos o Pop 7 (*Applied Biosystems*, CA, USA). As sequências geradas foram analisadas com o auxílio dos programas *BioEdit* (7.2.5) e *Chromas Lite* (2.1.1).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa *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 testes estatísticos paramétricos (ANOVA um critério) e não-paramétricos (Exato de Fisher, Análise de Variância Q de Cochran), para comparação entre as médias e frequências respectivamente, dos escores de cada grupo, observando possíveis diferenças estatísticas significantes. Adicionalmente, também foram realizadas análises de Correlação de Spearman, para os dados quantitativos, e Coeficiente de Contigência C, para os qualitativos, verificando uma possível existência de associações entre as variáveis estudadas nas amostras. Em todos os testes, foi utilizado o software estatístico *Bioestat 5.3*, com nível de significância 5% e poder do Teste de 80%, com a finalidade de garantir a detecção das diferenças estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

Foram analisadas 49 amostras de gliomas de diversos graus histopatológicos e diferentes idades, sendo 29 de pacientes do sexo masculino (59,2%) e 20 do sexo feminino (40,8%). A média de idade no diagnóstico foi de 37,7 anos, com desvio padrão de 23,6 e mediana de 42 anos, sendo que a idade variou entre 1 e 79 anos (Tabela 8).

Tabela 8 – Classificação da amostra de acordo com os subtipos histológicos, idade no diagnóstico e razão homens:mulheres.

Classificação (OMS)	Número de amostras	Idade média no diagnóstico (anos) Média ± Desvio padrão	Razão homens/mulheres
Total	49	37,7 ± 23,6	29:20
Astrocitoma (I-IV)			
Astrocitoma pilocítico (I)	6	10,5 ± 10,1	3:3
Astrocitoma subependimário de células gigantes (I)	2	21,5 ± 2,1	2:0
Astrocitoma Pilomixóide (II)	1	3	1:0
Astrocitoma difuso (II)	8	34,1 ± 17,7	4:4
Astrocitoma Anaplásico (III)	3	52 ± 18,4	1:2
Glioblastoma (IV)	15	53,1 ± 19,2	10:5
Gliosarcoma (IV)	2	64 ± 0	1:1
Oligodendroglioma (II-III)			
Oligodendroglioma (II)	2	31 ± 17	1:1
Oligoastrocitoma (II-III)			
Oligoastrocitoma (II)	1	2	1:0
Oligoastrocitoma anaplásico (III)	3	48,3 ± 12,7	2:1
Ependimoma (II-III)			
Ependimoma (II)	3	5,7 ± 4	1:2
Ependimoma anaplásico (III)	3	53,7 ± 8,5	2:1

Ao compararmos a distribuição de idade entre os diferentes graus de malignidade, através da Análise de Variância (ANOVA: um critério) verificou-se

diferenças relevantes aproximando os pacientes mais jovens dos tumores menos agressivos, ao passo que se aumenta o grau de agressividade do tumor, a média de idade acompanha esse aumento (Tabela 9). O aumento da incidência de gliomas de alto grau conforme o aumento da idade, juntamente com a diminuição da incidência de gliomas de baixo grau sugere que a transformação maligna de células gliais é um processo de várias etapas com aquisição sequencial de alterações genéticas conforme o aumento da idade (Louis *et al.,* 2007).

Tabela 9: Comparação entre as médias de idade de acordo com o grau de malignidade por ANOVA (um critério); Pós-teste: Teste de Tukey.

Gradação tumoral	Idade Média	*p*-valor
I	13,3	Médias I e II = $p > 0.05$ Médias I e III= $p < 0.01$ Médias I e IV =$p < 0.01$
II	23,8	Médias II e III = $p < 0.01$ Médias II e IV = $p < 0.01$
III	51,3	Médias III e IV = $p > 0.05$
IV	54,4	-

4.2. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *TP53*

Foram analisadas 49 amostras de gliomas quanto à presença de alterações no *TP53* por meio da técnica de SSCP, sendo que 6 (12,2%) apresentaram padrão diferenciado de migração no gel de poliacrilamida, conforme descrito na tabela 10. O éxon mais alterado foi o 5, presente em 3 (6,1%) amostras das 49 analisadas. Os experimentos em cada éxon estão expostos na figura 8.

Tabela 10. Amostras alteradas para o gene *TP53* após triagem pela técnica de PCR-SSCP.

Amostra	Histopatológico	Grau	Sexo	Idade (anos)	Éxon
CSN 1	Astrocitoma subependimário de células gigantes	I	M	23	11
CSN 14	Glioblastoma	IV	F	68	5,10
CSN 31	Astrocitoma Anaplásico	III	F	65	4, 5
CSN 98	Astrocitoma difuso	II	M	26	7
CSN 101	Glioblastoma	IV	M	79	5
CSN 167	Astrocitoma difuso	II	M	14	7

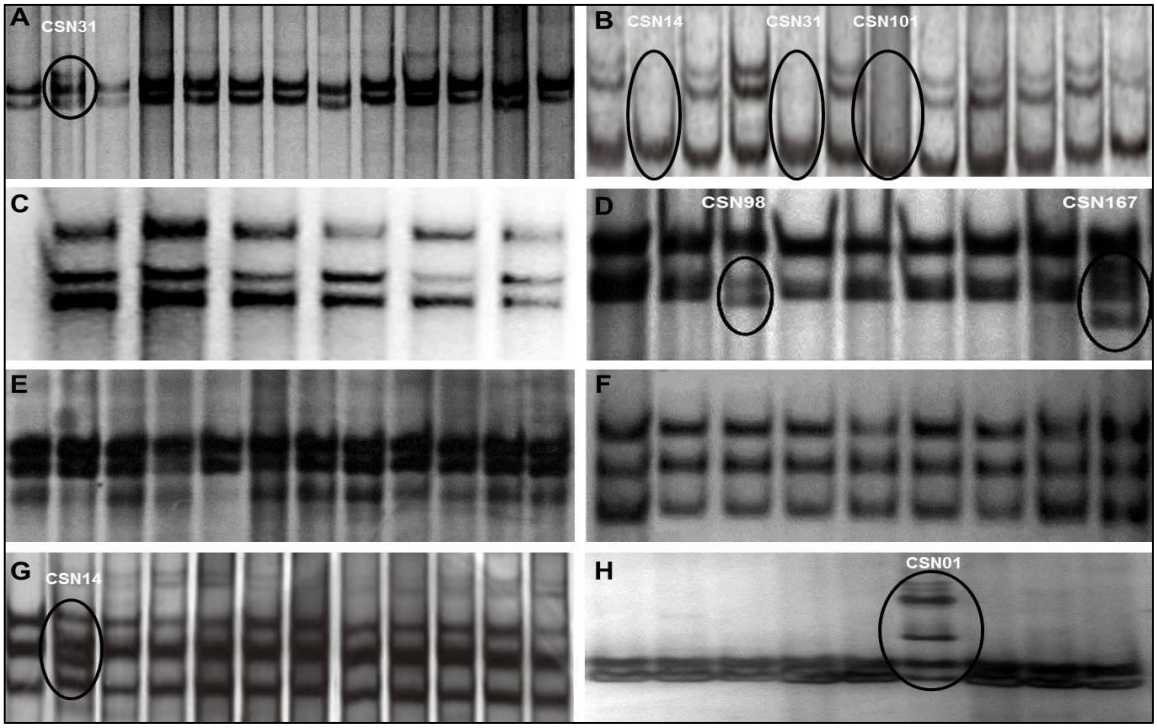

Figura 8. Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 4 a 11 do gene *TP53*. Observamos nas imagens A, B, D, G e H que algumas amostras apresentaram um padrão diferenciado de migração na SSCP, representando os éxons 4, 5, 7, 10 e 11 respectivamente, indicando assim a presença de alterações nessas regiões, enquanto que a análise das amostras para os demais éxons revelou um padrão monomórfico de migração, como podemos ver nas imagens C, E e F, que representam os éxons 6, 8 e 9 respectivamente.

Apenas o caso CSN31 (Astrocitoma anaplásico) foi sequenciado para os éxons 4 e 5, devido a insuficiência de DNA e tecido das demais amostras que apresentaram alteração no SSCP. Foram identificados o polimorfismo de G → C no códon 72 (posição 215 da região codificante – éxon 4) que altera o aminoácido Arginina para Prolina e uma mutação de C → T no códon 153 (posição 458 da

região codificante – éxon 5) que altera o aminoácido Prolina para Leucina. As amostras apresentaram o genótipo em heterozigose, Arg/Pro (G/C) e Pro/Leu (C/T) respectivamente (Figura 9).

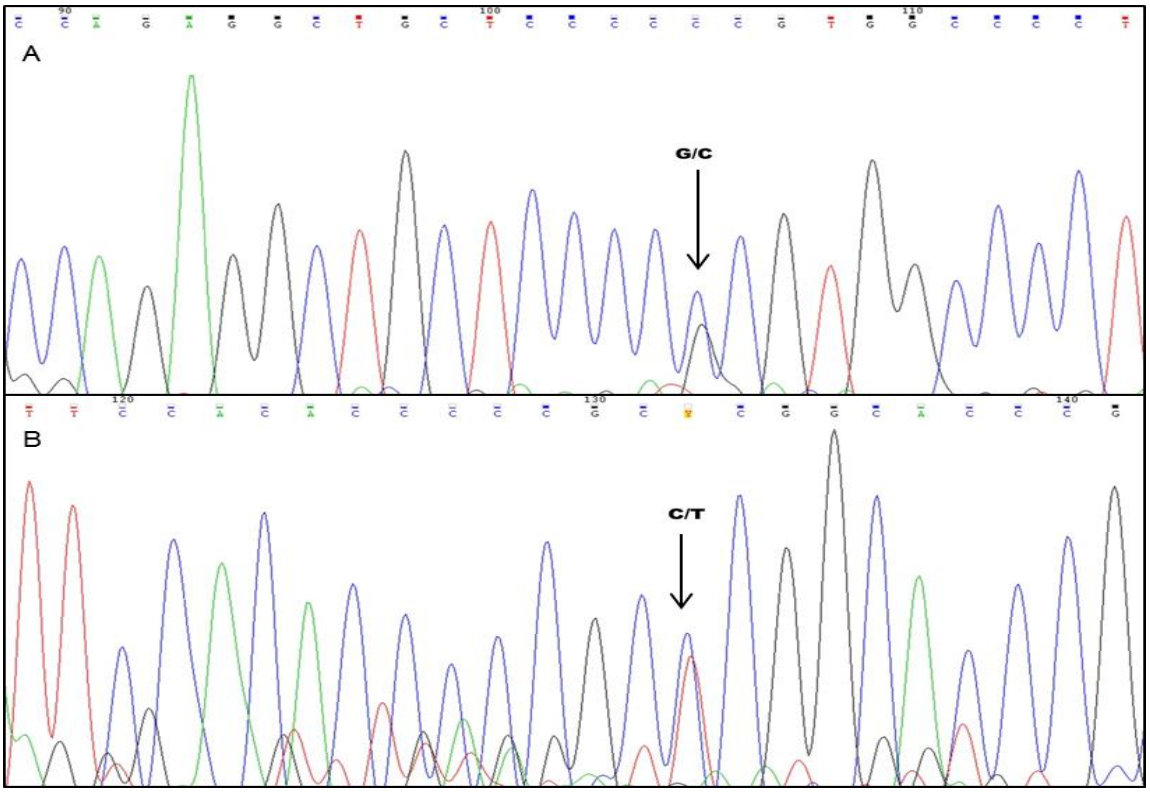

Figura 9. Alterações Nucleotídicas Identificadas no *TP53*. (A) Mudança de G→C no códon 72 do éxon 4 (Arg/Pro) (B) Mudança de C→T no códon 153 do éxon 5(Leu/Pro).

Também foram avaliadas as associações entre a presença de mutação no *TP53* e a idade dos pacientes. Para tanto se utilizou a Correlação de Spearman. A idade média dos pacientes que apresentaram mutação foi superior a dos pacientes que não apresentaram mutação. No entanto, os resultados obtidos apresentaram *p*=0,1043, ou seja, não houve correlação entre presença de mutação e idade (Tabela 11).

Tabela 11. Mutação do *TP53* de acordo com a idade.

Mutação	Total	Média de idade	Desvio-Padrão	Mediana	*p*-valor
Presente	6	45,83	27,88	45,50	
Ausente	43	36,61	23,06	42.00	0,1043
Total	49	37,74	23,57	42,00	

A figura 10 apresenta a prevalência da presença de mutações no gene *TP53* por subtipo histológico dos gliomas. Foi realizada a Análise de Variância Q de Cochran, e se observaram diferenças estatísticamente significativas entre os subtipos tumorais, uma vez que apenas o subgrupo dos astrocitomas apresentou mutações (p=0,0016).

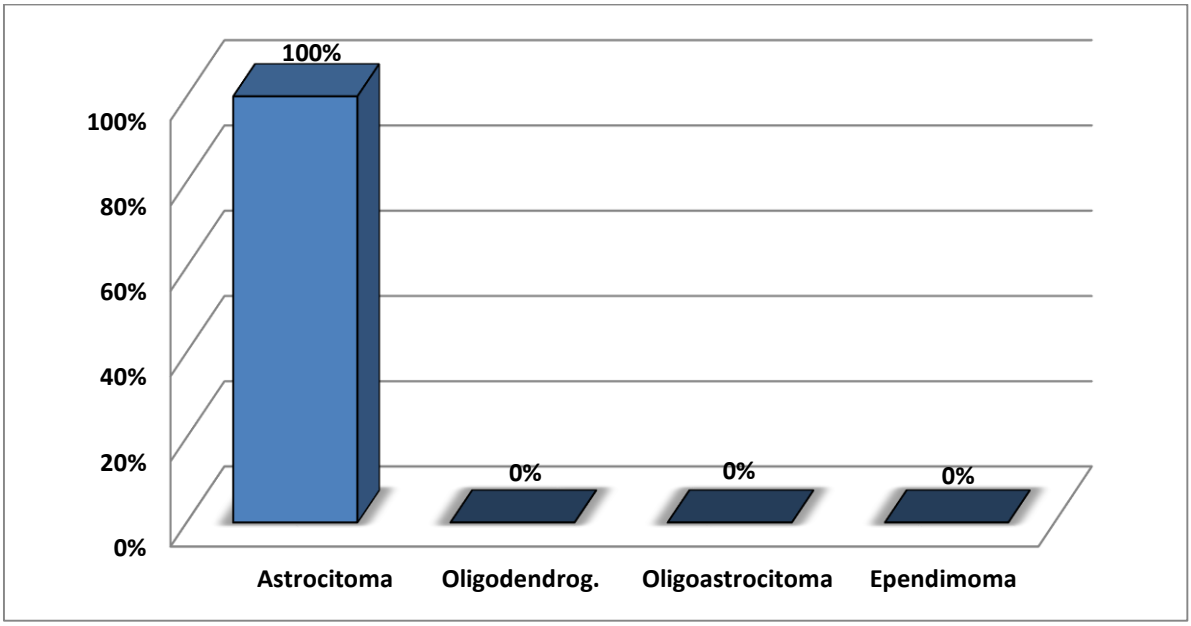

Figura 10. Frequência de mutação no *TP53* por subtipo tumoral.

Os graus II e IV apresentaram a maior frequência de mutações do *TP53* no estudo, uma vez que 33,3% (2/6) das alterações foram identificadas em cada um deles, como mostra a figura 11. Uma possível associação entre a presença de mutação e o grau de estadiamento tumoral foi avaliada através do teste Coeficiente de Contigência C. Observou-se que não há associação entre essas

duas variáveis (*p*=0,9985). Uma vez que a comparação entre a presença de mutação e estádio não demonstrou diferença estatisticamente significante, não foi possível construir um modelo para regressão logística.

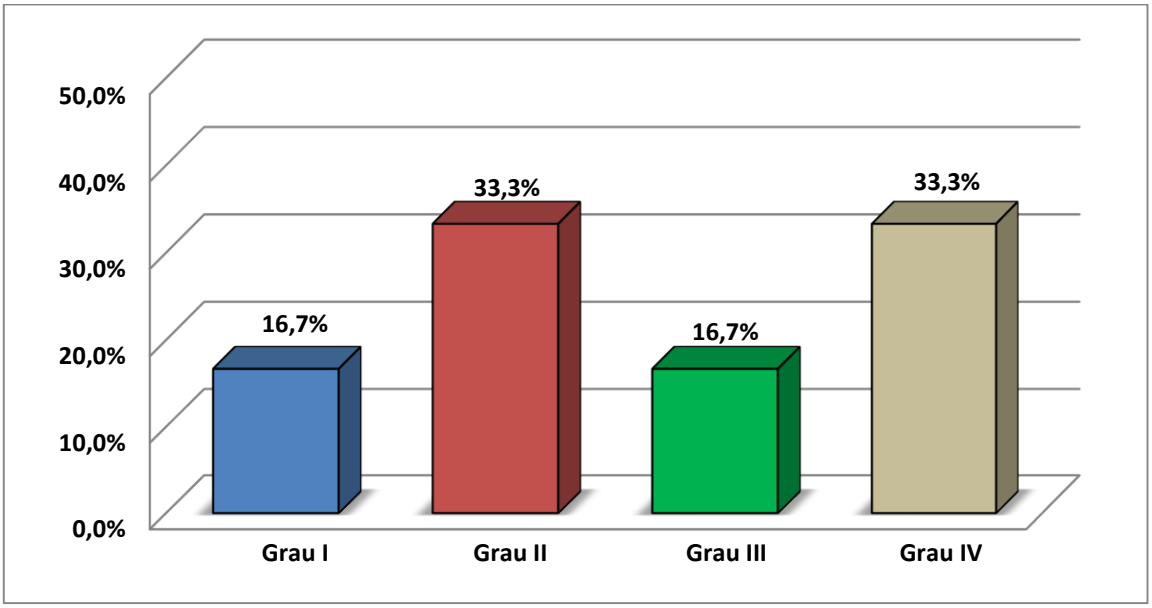

Figura 11. Frequência de mutação no *TP53* por estadiamento tumoral.

Na análise posterior, os tumores de baixo grau (graus I e II) e os de alto grau (graus III e IV) foram agrupados e comparados entre si em relação a presença de mutação (Figura 12). Para tal análise foi empregado o Teste Exato de Fisher, que não demonstrou diferença estatística significante (*p*=0,6049) entre as frequências de mutação no *TP53* nos dois grupos.

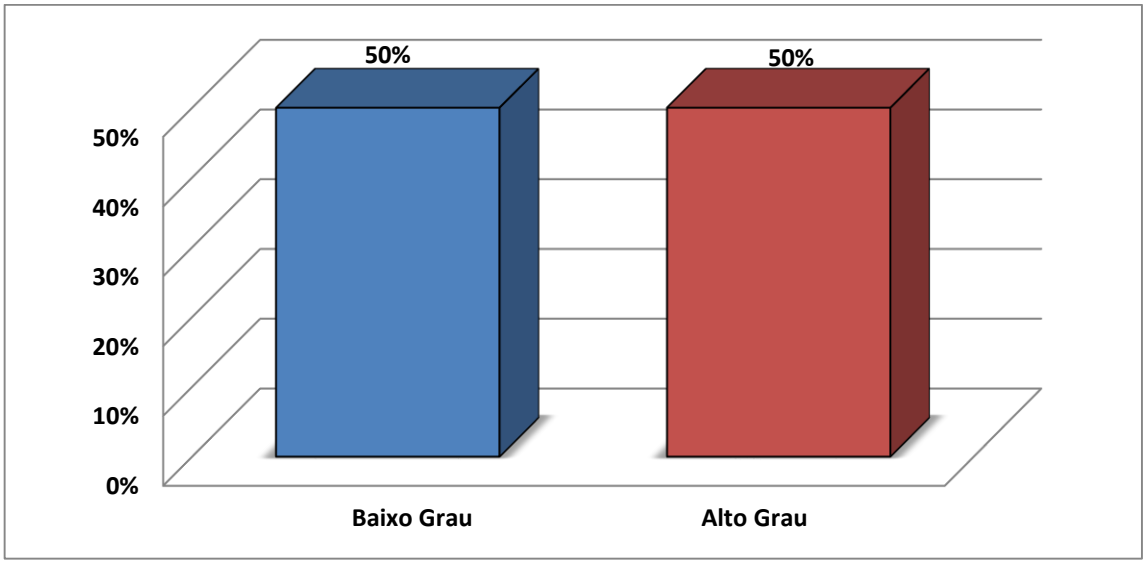

Figura 12. Frequência de mutação no *TP53* por grupo tumoral.

3.3. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *PTEN*

Para a realização da triagem de alterações genéticas no gene *PTEN* foram analisadas 35 amostras de gliomas, sendo que apenas a amostra CSN11 (Astrocitoma pilocítico) apresentou padrão diferenciado de migração no gel de poliacrilamida (Figura 13). Essa amostra foi então sequenciada, identificando uma mutação de T→ G no íntron 4, na posição 85344 do gene, ainda não descrita na literatura (Figura 14).

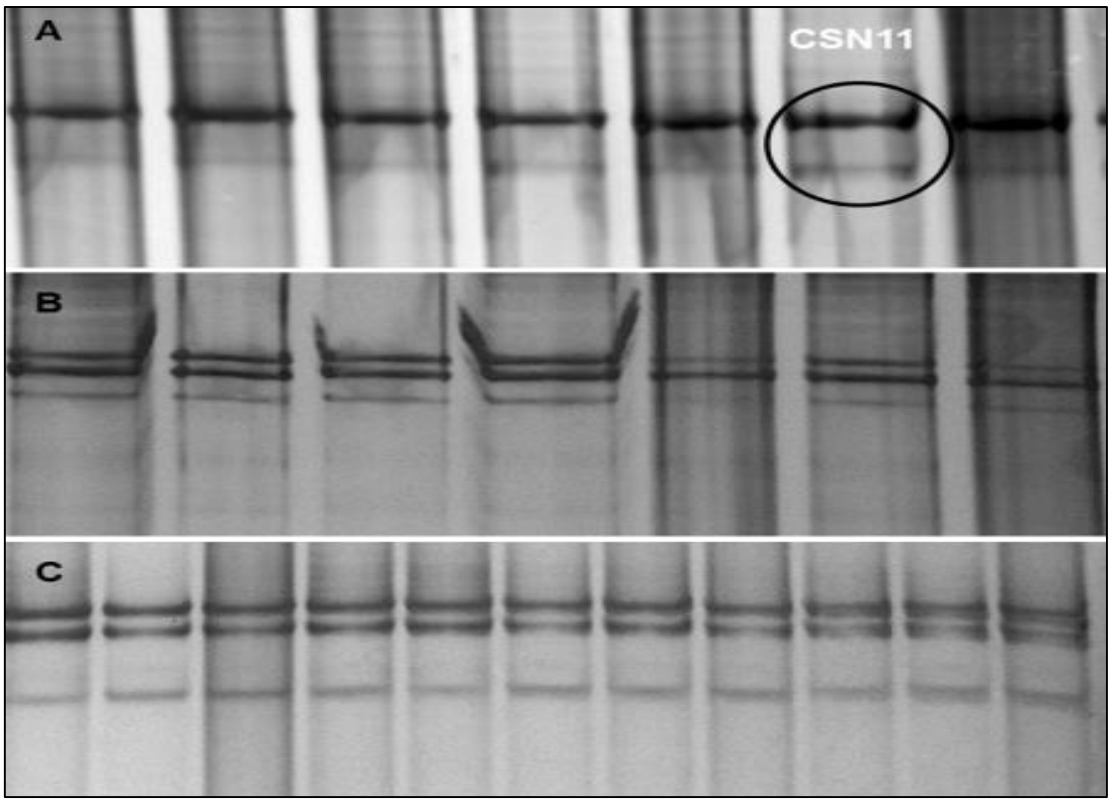

Figura 13. Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 5, 6 e 7 do gene *PTEN*. Observamos na imagem A que a amostra CSN11 apresentou um padrão diferenciado de migração na SSCP, enquando que a análise das amostras para os éxons 6 e 7 revelou um padrão monomórfico de migração, como podemos ver nas imagens B e C.

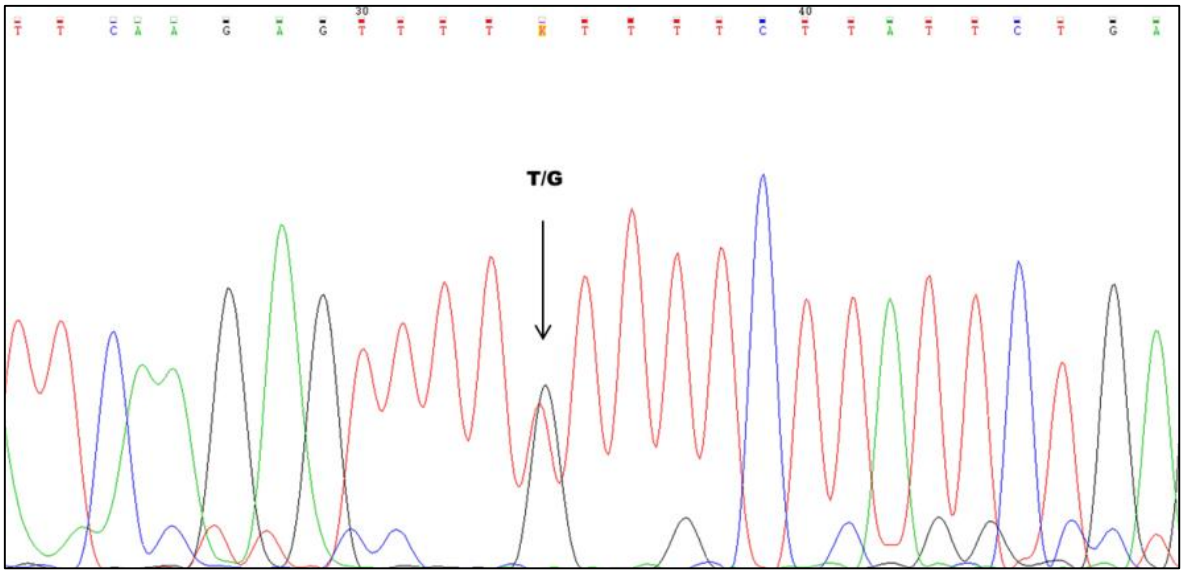

Figura 14. Alterações nucleotídicas identificadas no *PTEN*. Mudança de T→G (heterozigoto) na posição 85344 da região de íntron.

Nas 35 amostras de gliomas, a frequência observada dos genótipos TT, TG e GG foi de 0,971 (34/35), 0,029 (1/35) e 0,000 (0/35), respectivamente. A frequência alélica observada de T foi 0,986, enquanto que de G foi 0,014. Portanto, as frequências genotípicas e alélicas na análise do *PTEN* na população de estudo, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p=0,9883). Não foi possível avaliar a presença de associações entre as variáveis do estudo e a presença de mutações devido à baixa prevalência de alterações genéticas em *PTEN* nessa população.

4.4. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *IDH1* E *IDH2*

Foram analisadas 34 amostras de gliomas quanto à presença de alterações nos genes *IDH1* e *IDH2* através da técnica de SSCP. Observou-se que 6 (17,6%) amostras apresentaram padrão diferenciado de migração no gel de poliacrilamida, conforme descreve a tabela 12. Todas as amostras se apresentaram monomórficas na análise do *IDH2*. Os experimentos em cada gene estão expostos na figura 15.

Tabela 12. Amostras alteradas para o gene *IDH1* após triagem pela técnica de PCR-SSCP.

Amostra	Histopatológico	Grau	Sexo	Idade (anos)	Éxon
CSN 21	Oligoastrocitoma Anaplásico	III	M	42	Éxon 4
CSN 31	Astrocitoma Anaplásico	III	F	65	Éxon 4
CSN 44	Astrocitoma Anaplásico	III	M	60	Éxon 4
CSN 88	Oligoastrocitoma Anaplásco	III	F	63	Éxon 4
CSN 96	Oligodendroglioma	II	F	43	Éxon 4
CSN 126	Astrocitoma difuso	II	F	34	Éxon 4

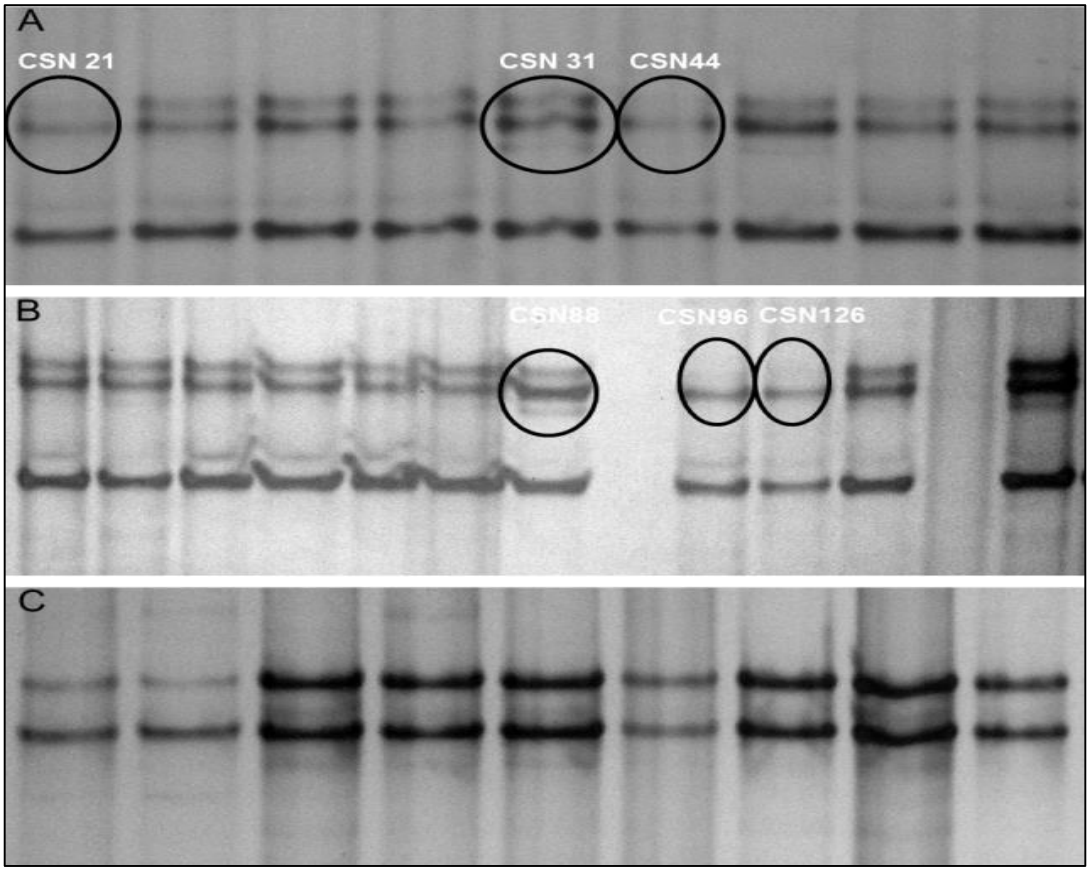

Figura 15. Imagem de gel de poliacrilamida representando os éxons 4 dos genes *IDH1* e *IDH2* . As imagens A, B representam análises do éxon 4 do gene *IDH1*. Observa-se que algumas amostras apresentaram um padrão diferenciado de migração na SSCP, indicando assim a presença de alterações nessa região, enquanto que a análise das amostras para éxon 4 do gene *IDH2* revelou um padrão monomórfico de migração, como podemos ver na imagem C.

Todas as amostras que apresentaram um padrão diferenciado de migração no SSCP foram sequenciadas. Observou-se nas 6 amostras (100%) uma mutação de G → A no códon 132 (éxon 4) que altera o aminoácido Arginina

para Histidina, descrita na literatura como R132H. Todas essas amostras apresentaram o genótipo em heterozigose, Arg/His (G/A) (Figura 16).

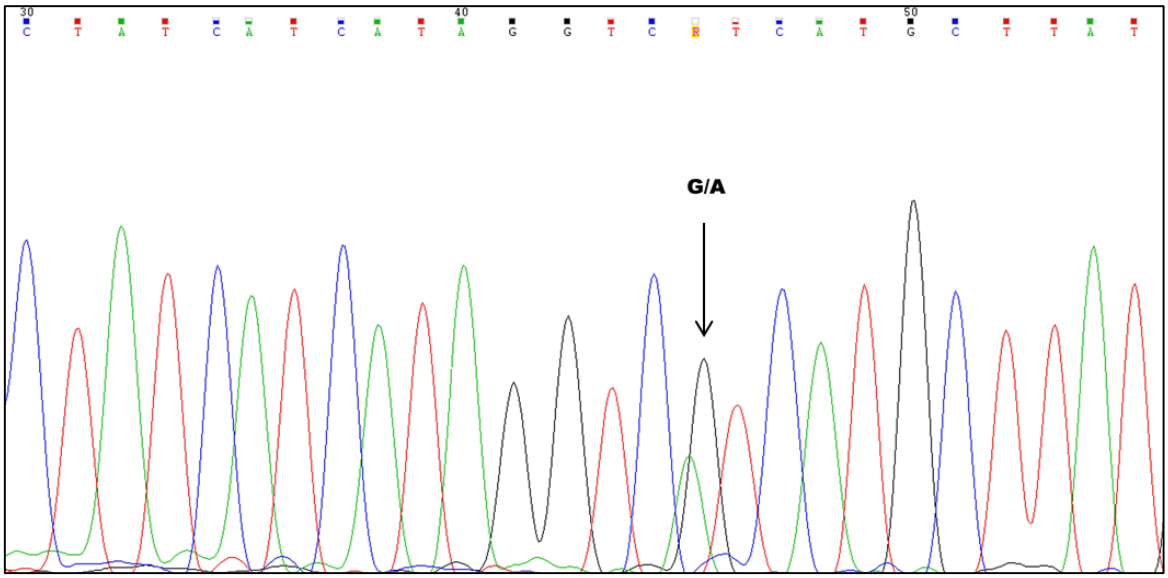

Figura 16. Alterações nucleotídicas identificadas no *IDH1*. Mudança de G→A no codon 132 do éxon 4 (Arg/His).

Nas 34 amostras de gliomas, a frequência observada dos genótipos GG (Arg/Arg), GA (Arg/His) e AA (His/His) foi de 0,824 (28/34), 0,176 (6/34) e 0,000 (0/34), respectivamente. A frequência alélica observada de G foi 0,912, enquanto que de C foi 0,088. Portanto, as frequências genotípicas e alélicas na análise do IDH1 na população de estudo, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p=0,9231).

Também foram avaliadas as associações entre a presença da mutação R132H e a idade dos pacientes. Para tanto se utilizou a Correlação de Spearman. A idade média dos pacientes que apresentaram mutação foi superior a dos pacientes que não apresentaram mutação. No entanto, os resultados obtidos apresentaram p=0,1316, ou seja, não houve correlação entre presença de mutação e idade (Tabela 13).

Tabela 13. Mutação R132H de acordo com a idade.

Mutação R132H	Total	Idade Média	Desvio-Padrão	Mediana	*p*-valor
Presente	6	51,17	13,08	51,50	
Ausente	28	34,04	23,68	37,00	0,1316
Total	34	37,06	22,99	42,50	

A figura 17 apresenta a prevalência da mutação R132H por subtipo histológico dos gliomas. A Análise de Variância Q de Cochran revelou que a diferença de prevalência da mutação analisada entre os subtipos tumorais não foi estatisticamente significante (*p*=0,1116).

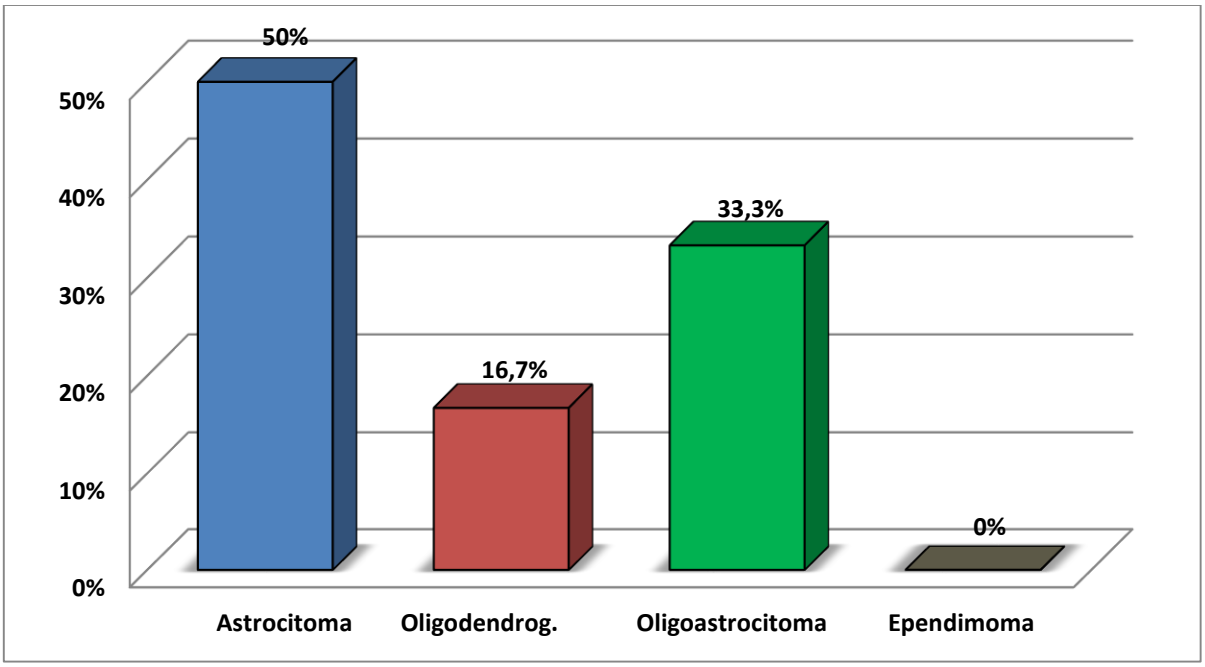

Figura 17. Frequência da mutação R132H por subtipo tumoral.

O grau III apresentou a maior frequência da mutação R132H no estudo, correspondendo a 66,7% (4/6) dos casos que apresentaram mutação cada, como mostra a figura 18. Uma possível associação entre a presença de mutação e o grau de estadiamento tumoral foi avaliada através do teste Coeficiente de Contigência C. No entanto, se observou que não há associação entre presença de mutações e o grau de estadiamento (*p*=0,0748). Como a comparação entre a

presença de mutação e estádio resultou em diferença estatisticamente não significante, não foi possível construir um modelo para regressão logística.

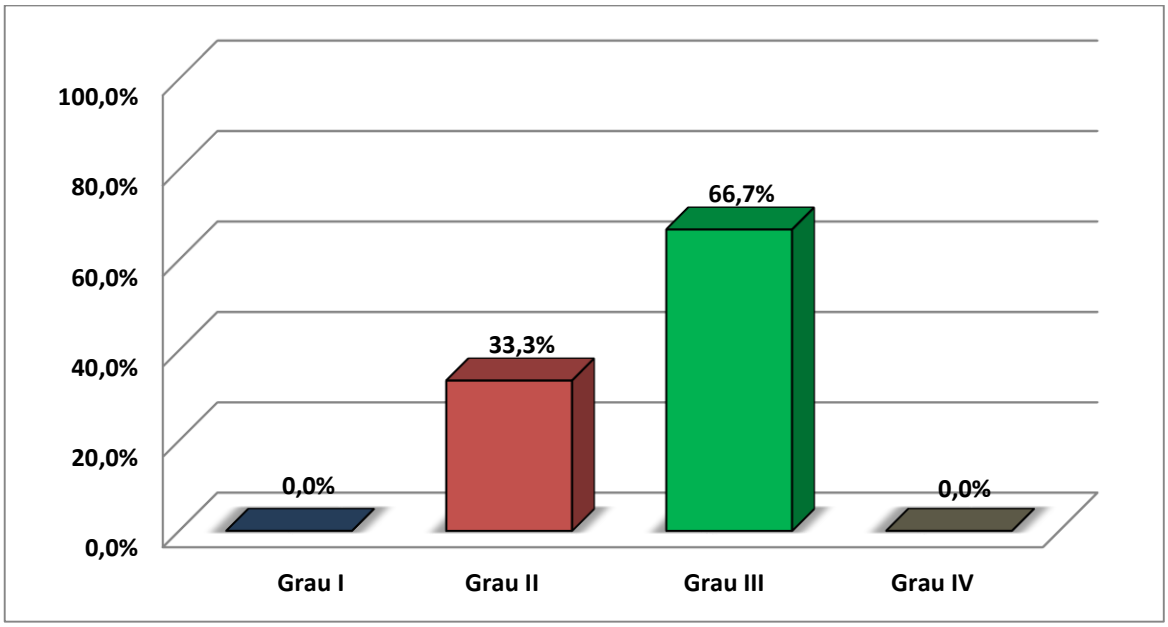

Figura 18. Frequência da mutação R132H por estadiamento.

Na análise posterior, os tumores de baixo grau (graus I e II) e os de alto grau (graus III e IV) foram agrupados e comparados entre si em relação à presença de mutação (Figura 19). Para tal análise foi realizado o Teste Exato de Fisher e não foi observada diferença estatística significante (p=0,5180) entre as frequências da mutação R132H nos dois grupos.

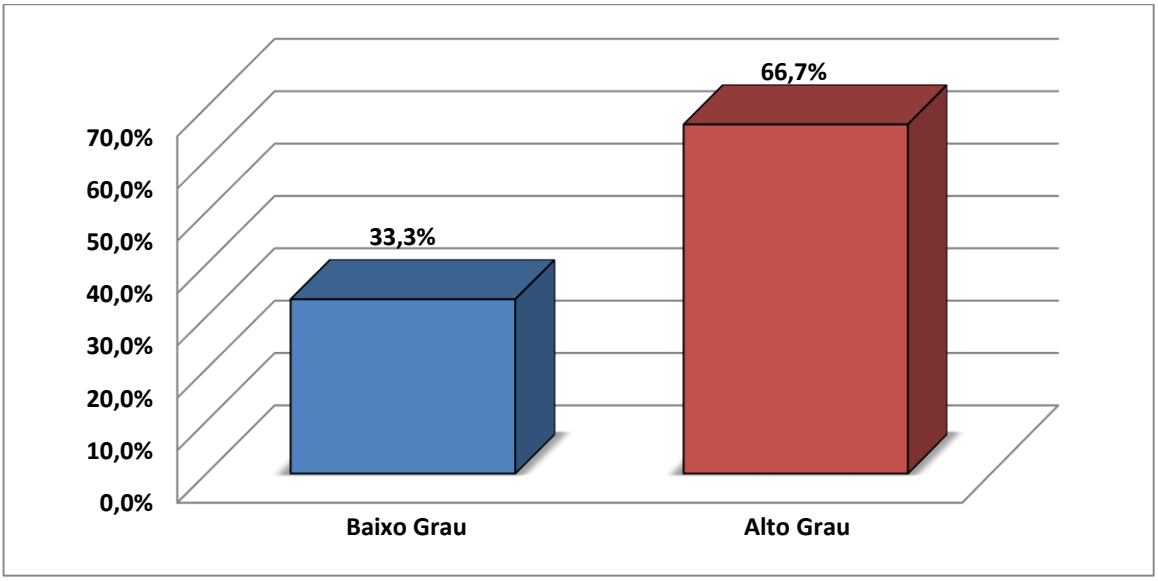

Figura 19. Frequência da mutação R132H por grupo tumoral.

5. DISCUSSÃO

5.1. *TP53*

Os biomarcadores são importantes ferramentas oncológicas utilizadas no diagnóstico, monitoramento de progressão da doença, determinação do prognóstico e na predição da resposta terapêutica (Schmitt *et al.,* 2004; Ludwig & Weinstein, 2005), que variam desde proteínas e antígenos específicos até perfis genéticos, epigenéticos ou citogenéticos únicos. Um ponto em comum entre todos os biomarcadores é que eles devem prover informações específicas sobre a progressão da doença. Sua função é de complementar e raramente substituir os exames histopatológicos de tecidos que ainda são a base da patologia oncológica tradicional (Yip *et al.,* 2008).

O *TP53* é o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos. Mutações nesse gene são encontradas em quase todos os tipos de cânceres, com prevalência variando de 14 a 43%, dependendo do tipo tumoral (IARC, 2013). Estas mutações resultam, na maioria dos casos, em perda funcional da p53, o que resulta no crescimento celular em condições que suprimem a proliferação de células normais e prejudicam as atividades antiproliferativas de drogas que danificam o DNA (Olivier & Taniere, 2010).

Algumas mutações no *TP*53 foram relacionadas com a gliomagênese há quase 20 anos devido ao aumento na incidência de gliomas (mais comumente astrocitomas) observado em pacientes com a Síndroma de Li-Fraumeni, a qual é causada por mutações nesse gene (Malkin *et al.,* 1990; Srivastava *et al.,* 1990).

A relação entre a presença de mutação no *TP53* e a carcinogênese cerebral tem sido demonstrada em muitos estudos, uma vez que alterações genéticas nesse gene podem inibir a capacidade da p53 de induzir uma parada no ciclo celular, os mecanismos de reparo do DNA e a apoptose (Nozaki *et al.,* 1999; Nayak *et al.,* 2004; Reifenberger & Collins). No entanto, em gliomas as análises disponíveis sobre um padrão específico de mutação associado com os graus histológicos da WHO ainda são escassas (Langerød *et al.,* 2002 Nayak *et al.,* 2004, Riemenschneider *et al,* 2010).

Mutações no *TP53* são mais comuns em jovens pacientes com glioma (média de idade de 45 anos no diagnóstico) (Ohgaki & Kleihues, 2009). Os

resultados obtidos no presente estudo confirmam essa afirmação, uma vez que entre os pacientes que apresentaram mutações no *TP53*, a média de idade apresentada foi de 45,8 anos. Além disso, a idade média dos indivíduos que apresentaram mutação foi superior a dos que não apresentaram mutação (36,6 anos), no entanto, não houve associação entre as variáveis mutação e idade (p= 0,1043).

A maioria das alterações do gene *TP53* são mutações de sentido trocado (73,21%), (IARC, 2013). Já entre as substituições de base única, cerca de 25% são transições G: C>A: T em sítios CpG (IARC, 2013). Como a maioria das mutações do *TP53* identificadas em tumores estão presente na área que abrange os éxons 5-8 (90%), correspondendo principalmente ao domínio de ligação de DNA, os estudos têm limitado a sua análise mutacional para esta porção do gene. Isto tem causado algum viés na literatura, pois pode ser que existam mutações fora dessa região que alterem a atividade funcional da p53 e contribuam de maneira significativa para a gênese tumoral e ainda não tenham sido identificadas (Robles & Harris, 2009).

Na tentativa de se evitar esse viés, em nossa análise aumentamos a região analisada, por isto, realizamos uma triagem de mutações em uma região que englobou os éxons 4 ao 11 do *TP53* em 49 amostras de gliomas. O éxon 5 foi o que apresentou maior taxa de mutação [6,1% (3/49)], seguido pelo éxon 7 [4,1% (2/49)]. Os éxons 4, 10 e 11 apresentaram mutação em apenas 1 caso [2% (1/49)]. Embora os resultados tenham mostrado baixa frequência de mutações nos éxons estudados, notou-se uma maior prevalência de alterações nos éxons 5 e 7, que correspondem ao domínio de ligação de DNA da p53. Outros estudos realizados em gliomas também demonstraram uma maior prevalência de mutações entre os éxons 5-8, como Faria *et al.* (2012) que estudou uma série de 96 amostras de tumores astrocíticos e identificou uma maior prevalência de mutações no éxon 7 e 8 do gene, em 46,9% e 45.8% dos casos respectivamente.

Em gliomas esporádicos a via da p53 está quase invariavelmente alterada, seja por mutações de ponto ou perda cromossômica, evento frequentemente associado à progressão da doença (Furnari *et al.,* 2009). Há evidências crescentes do papel de mutações desse gene na iniciação, recorrência

e progressão de gliomas de grau II - IV (principalmente dos tumores difusos), embora o seu papel nos gliomas de grau I permaneça controverso, uma vez que raramente é encontrado nestes tumores (Christensen *et al.,* 2010; Mellai *et al.,* 2012; Faria *et al.,* 2012). Anormalidades moleculares em outros genes na via, como *p14arf*, *MDM2* ou *MDM4* também já foram descritas (Bourne & Schiff, 2010).

O teste estatístico Análise de Variância Q de Cochran foi realizado no presente estudo com o objetivo de se comparar a prevalência de mutação no gene *TP53* nos diversos tipos histológicos analisados. Assim, verificou-se uma prevalência estatisticamente significativa pelos astrocitomas (p= 0,0016).

A incidência de mutações no *TP53* em astrocitomas pilocítico é controversa, sendo que muitos autores reportam baixa frequência de mutações nesses tumores (Ishii *et al.,* 1998; Cheng *et al.,* 2000; Tada *et al.,* 2003). Foram analisadas 6 amostras de astrocitomas pilocíticos nesse projeto, sendo que não foi identifica nenhuma mutação. Mellai *et al.* (2012) publicou dados semelhantes, onde identificou mutação do *TP53* em apenas 1 amostra de astrocitoma pilocítico de 20 analisadas (5%). No entanto, Hayes *et al.* (1999), foram os primeiros a identificar uma maior taxa de mutações no gene *TP53* em uma análise de 20 astrocitomas pilocítico em crianças, onde 7 (35%) apresentaram mutação na região codificante do gene. Estes resultados sugerem que as mutações no *TP53* também podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento destes tumores. Futuros estudos deverão esclarecer de modo definitivo o impacto de mutações no gene *TP53* em astrocitomas pilocítico grau I através de grandes séries tumorais examinadas.

As mutações no *TP53* são uma marca genética de astrocitomas difusos de baixo grau, onde > 60% desses tumores carregam mutações nesse gene (Kleihues *et al.,* 2000; Mellai *et al.,* 2012), principalmente astrocitomas gemistocíticos que apresentam mutações em até 80% dos casos (Watanabe *et al.,* 1998; Okamoto *et al.,* 2004). Na maioria dos casos, a mutação no gene *TP53* é acompanhada por LOH em 17p, resultando na ausência completa do gene *TP53* “selvagem”. Observou-se através da SSCP, que 2 dos 8 casos (25%)

analisados de astrocitomas difuso apresentaram mutações no *TP53*, uma taxa de mutação inferior quando comparada a literatura.

O gene *TP53* é o mais frequentemente mutado na via da p53 em gliomas difusos de baixo grau; no entando, anormalidades moleculares envolvendo outros genes nesta via, como $p14^{ARF}$ e *MDM2* ou *MDM4* também foram relatadas (Bourne & Schiff, 2010). Nakamura *et al.* (2001) detectaram hipermetilação do promotor de $p14^{ARF}$ em 33% dos casos de astrocitomas difusos de baixo grau analisados em seu estudo, e adicionalmente, sugeriram que metilação do promotor de $p14^{ARF}$ é um evendo inicial no desenvolvimento desses tumores.

Os astrocitomas anaplásicos, do ponto de vista clínico, morfológico e genético, representam um estágio intermediário na rota de progressão para GBM. Eles apresentam alta taxa de mutação no *TP53* (40-70% dos casos), semelhante aos astrocitomas difusos, e alta frequência de LOH 17p (Ichimura *et al.,* 2004; Faria *et al.,* 2012). Em um estudo com quase 200 astrocitomas de graus II-IV, 72% dos astrocitomas anaplásico apresentaram alterações na via da p53 (Ichimura *et al.,* 2000). Dos 3 casos de astrocitomas anaplásico analisados nesse estudo, apenas 1 (33,3%) se mostrou alterado para o *TP53*, no entanto, essa taxa inferior as documentadas na literatura pode ser justificada pelo baixo número amostral desse tipo histológico.

As mutações no *TP53* também são consideradas como marcadores genéticos de glioblastomas secundários (observadas em mais de 65% dos casos descritos), e em quase todos os casos, já estão presentes em lesões precursoras de baixo grau ou nos astrocitomas anaplásicos. Essas mutações são significativamente menos frequentes (~25%) em glioblastomas primários (Louis *et al.,* 2007). A distribuição e tipo de mutação também diferem entre glioblastomas primários e secundários: neste último caso, 57% das mutações estão localizadas nos dois códons *hotspot* 248 e 273; no primeiro, as mutações são mais igualmente distribuídas entre os éxons, com apenas 17% ocorrendo nos códons 248 e 273. Transições G: C > A:T em sítios CpG são significativamente mais frequente no glioblastoma secundário do que no glioblastoma primário, o que sugere diferentes mecanismos moleculares subjacentes à aquisição de mutações do *TP53* nestes subtipos (Louis et

al., 2007). Os resultados obtidos em nossa análise discordam dos apresentados na literatura, uma vez que identificamos uma baixa taxa de mutação no *TP53,* pois apenas 13,3% (2/15) dos GMB estudados apresentaram algum tipo de alteração. No entanto, nossas amostras não foram classificadas dentro dos subtipos de glioblastomas primário e secundário, o que poderia modificar esses valores em cada subtipo.

Em contraste com os astrocitomas, mutações em *TP53* são raras em tumores oligodendrogliais (~10%) e mutuamente exclusivas para a deleção 1p/19q, uma alteração característica de oligodendrogliomas (~70%), enquanto que oligoastrocitomas apresentam mutações no *TP53* (~40%) ou perda de 1p/19q (~45%), indicando que oligoastrocitomas são geneticamente monoclonais, e possuem alterações genéticas semelhantes a astrocitomas ou oligodendrogliomas (Okamoto *et al.,* 2004; Jeuken *et al.,* 2004; Kim *et al.,* 2010). Mutações no gene *TP53* raramente são documentadas em tumores ependimais por análise molecular (Gaspar *et al.,* 2006; Biernat *et al.,* 2007). Assim, os resultados obtidos em nossa análise corroboram os dados da literatura, uma vez que nenhuma alteração foi identificada nos oligodendrogliomas e tumores ependimais aqui estudados.

Em nosso estudo os tumores de grau II e IV apresentaram uma maior frequência de mutações do *TP53*, os mesmos apresentando 33,3% (2/6) das alterações identificadas. Porém, observou-se que não há associação significativa entre presença de mutações e o grau de estadiamento tumoral (p=0,9985), mesmo quando os tumores foram agrupados em tumores de baixo grau e alto grau (p= 0,6049). Assim, esses dados sugerem que a mutação do gene *TP53* possa ser um evento precoce na progressão dos astrocitomas, como afirmam alguns autores (Louis *et al.,* 2007; Furnari *et al.,* 2009).

Apenas um caso de Astrocitoma anaplásico (CSN31) foi sequenciado para os éxons 4 e 5, devido a insuficiência de DNA e tecido das demais amostras que apresentaram alteração no SSCP. O sequenciamento revelou um polimorfismo que resultou na mudança de G → C na segunda base do códon 72 (éxon 4), resultando em uma substituição do aminoácido Arginina para Prolina e uma mutação do tipo transição que resultou na troca de C → T na segunda

base do códon 153 (éxon 5) a qual altera o aminoácido Prolina para uma Leucina. A amostra apresentou o genótipo em heterozigose, Arg/Pro (G/C) e Pro/Leu (C/T) nos éxons 4 e 5 respectivamente. Este é o primeiro estudo que identifica a mutação de C→T em amostras de gliomas (IARC, 2013; COSMIC, 2013).

O polimorfismo do códon 72 resulta na presença de arginina (Arg) ou prolina (Pro) na sequência de aminoácidos da p53. Esta alteração envolve o domínio de ligação ao DNA da p53 e afeta a estrutura primária da proteína, que resulta em diferenças funcionais entre os diferentes alelos (Parhar *et al.,* 2005). O alelo Arg tem maior capacidade de induzir apoptose do que a o alelo Pro devido sua maior capacidade de translocar para as mitocôndrias e libertar o citocromo C no interior do citosol (Idbaih *et al.,* 2007).

O alelo Pro está associado com o aumento da atividade de transcrição em comparação com o alelo Arg porque se liga mais fortemente aos fatores de transcrição TAFII32 e TAFII70 (Parhar *et al.,* 2005). Assim este polimorfismo tem sido associado com a susceptibilidade a vários tipos de câncer (Koushik *et al.,* 2004; Hu *et al.,* 2005; Damin *et al.,* 2006), mau prognóstico (Wegman *et al.,* 2006; Sousa *et al.,* 2006) e início precoce (Jones *et al.,* 2004). Além disso, há evidências de que este polimorfismo pode ser correlacionado com mutações específicas de *TP53*, dependendo do tecido (Koushik *et al.,* 2004; Wegman *et al.,* 2006). No entanto, estas associações tem sido pouco avaliadas em gliomas.

Faria *et al.* (2012) identificaram frequências semelhantes para os genótipos homozigotos (Pro / Pro 43/96, 44,8%; Arg / Arg 42/96, 43,8%) em uma análise de 96 tumores astrocíticos derivados de pacientes do nordeste do Brasil. Genótipos heterozigotos (Arg/Pro) foram encontrados em apenas 11,4% (11/96) dos pacientes. Além disso, encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre o genótipo Pro/Pro e a mutação *TP53* P98T (éxon 4). Um estudo realizado na Noruega (Langerød *et al.,* 2002), envolvendo câncer de mama e câncer colorretal identificou diferenças na relação entre os alelos polimórficos do códon 72 e o estado mutacional de *TP53*, observando que o alelo Arg estava relacionado com a ocorrência de mutação somática do *TP53* no câncer de mama.

A amostra CSN31 apresentou o genótipo Arg/Pro no códon 72. Curiosamente, essa foi a única amostra que apresentou alteração em mais de um éxon (éxon 4 e 5). No entanto, não foi possível realizar análise da correlação entre a frequência dos alelos polimórficos do códon 72 e o estado mutacional de *TP53* porque apenas o caso CSN31 foi sequenciado para essa região, uma vez que foi o único que se apresentou heteromórfico no gel de poliacrilamida.

Recentemente, El Hallani *et al.* (2012) demonstraram que o genótipo Pro/Pro é significativamente representado em pacientes jovens com GBM (< 45 anos) (7 de 43 casos, 16,3%) em comparação com pacientes mais velhos (> 45 anos) (14 de 217, 6,5%) (p = 0,05), enquanto que não houve diferenças significantes das frequências Arg/Arg e Arg/Pro entre os dois grupos . Estes dados sugerem um efeito recessivo do alelo Pro na oncogênese do glioblastoma em pacientes jovens. Este resultado corrobora relatórios anteriores que mostram associações consistentes entre o polimorfismo do códon 72 com idade de início no câncer oral, carcinomas de cabeça e pescoço, câncer colorretal hereditário sem polipose e câncer de próstata (Murphy 2006; Rogler *et al,* 2011).

Em um estudo em 2008, Zawlik *et al.* revelaram que o alelo Pro foi significativamente associado com menor sobrevida em pacientes com glioblastoma portadores de mutação em *TP53* (Arg/Pro ou Pro/Pro) e entre aqueles tratados com cirurgia mais radioterapia (Arg/Pro).

5.2. *PTEN*

Mutações no *PTEN* são associadas a progressão maligna de gliomas astrocíticos. Um estudo publicado em 1999 identificou mutações de *PTEN* em 28% de glioblastomas, 7% de astrocitomas anaplásicos e 0% de gliomas de baixo grau através do uso de eletroforese desnaturante em gel seguido do sequenciamento (Zou, 1999). Estudos posteriores relataram que vários métodos de detecção de mutação, incluindo análise de LOH e sequenciamento direto, confirmaram a presença de mutações de *PTEN* em menos que 10% em astrocitomas anaplásicos (Reifenberger & Collins, 2004; Yang *et al.,* 2010), 15–

40% em glioblastomas (sendo detectados quase que exclusivamente em glioblastomas primários e raramente em glioblastomas secundários) (Tohma *et al.,* 1998; Dahia, 2000; Knobbe *et al.,* 2002; Ohgaki *et al.,* 2004; Yang *et al.,* 2010) e quase ausência de mutações em gliomas de baixo grau (Rasheed *et al.,* 2002; Ohgaki *et al.,* 2004; Abdullah *et al.,* 2006).

De acordo com Ohgaki e colaboradores (2004), das 78 mutações detectadas no *PTEN* em casos de glioblastomas, mutações sem sentido (13%) e deleções ou inserções que originam códons de parada (32%) foram distribuídas igualmente ao longo dos éxons, ao passo que 33% das mutações foram de sentido trocado levando a mudanças de aminoácidos, preferencialmente localizados nos éxons 1-6, isto é, na região homóloga à tensina/auxilina e fosfatase de especificidade dupla. Isso sugere que as células com PTEN truncadas em qualquer local ou mutações de sentido errado em *PTEN* na região homóloga à tensina / auxilina e fosfatase de especificidade dupla adquirem um fenótipo transformado (Louis *et al.,* 2007).

Análises de expressão da proteína PTEN realizada por *western blot*, ensaios *immunoblot* e imunohistoquímica demonstraram uma relação inversa entre a gradação tumoral e expressão de PTEN em gliomas adultos (Fults & Pedone, 2000; Ermorian RP *et al.,* 2002). Estas observações levaram a maioria dos investigadores a concluir que mutações genéticas em *PTEN* são eventos tardios que ocorrem em um subconjunto de gliomas durante a evolução de tumores de baixo grau para tumores de alto grau (Bourne & Schiff, 2010).

No presente estudo, apenas um caso de astrocitoma pilocítico (CSN11) em um total de 15 amostras (6,7%) de gliomas de baixo grau analisadas apresentou uma mutação, do tipo transversão T→ G na posição 85344 do íntron 4 do gene *PTEN*, sendo que essa alteração ainda não tinha sido descrita em banco de dados. Nossos dados confirmam a baixa frequência de mutações nesses tumores observada por vários autores (Rasheed *et al.,* 2002; Ohgaki *et al.,* 2004; Abdullah *et al.,* 2006).

Em contrapartida, não identificamos nenhuma alteração genética no *PTEN* nas 20 amostras de gliomas de alto grau analisadas, contrastando com dados da literatura que apontam sempre uma alta taxa de mutação desde gene

nestes tipos tumorais (Reifenberger & Collins, 2004; Ohgaki *et al.,* 2004; Yang *et al.,* 2010). Uma explicação para essa baixa prevalência mutacional observada nesses tumores é que estudamos apenas os éxons 5, 6 e 7 desse gene, enquanto que outros pesquisadores estudaram toda região codificante do gene, o que permitiu a identificação de mutações em regiões que não fizeram parte desse trabalho. A heterogeneidade dos subtipos tumorais e o tamanho amostral também podem ter influenciado nesses resultados.

Além disso, outros eventos genéticos podem estar associados a inativação da proteína PTEN e consequente participação no processo de progressão maligna dos gliomas. Judith *et al.* (2010) identificaram deleção heterozigota em 45,9% (152/331) casos de gliomas difusos enquanto que deleção homozigota foi encontrada em 3,9% (13/331) dos casos estudados.

Embora mutações do *PTEN* sejam raras em gliomas de baixo grau e relativamente comum em glioblastomas, a metilação do promotor desse gene é comum em gliomas de grau II e bastante frequente em glioblastomas secundários. Mueller *el al.* (2012) observaram uma associação inversa entre a presença de metilação do promotor do *PTEN* e a gradação tumoral. Metilação estava presente em 35,29% dos astrocitomas pilocíticos (6/17) e 86,7% dos tumores de grau II (6/7). Também foi observada em 33,3% dos tumores de alto grau (Grau III 2/6; Grau IV, 3/9). Essas observações sugerem que metilação representa um mecanismo epigenético que resulta na inativação do *PTEN* e desenvolvimento tumoral em gliomas que frequentemente não apresentam mutação nesse gene, como os de baixo grau (Bourne & Schiff, 2010).

5.3. *IDH1/2*

A desregulação energético-celular é uma das características do câncer descritas por Hanahan e Weinberg (2011). Células tumorais malignas apresentam o metabolismo energético-celular alterado, como por exemplo, um aumento da glicólise aeróbica, que contribui para a tumorigênese e malignidade (Prensner & Chinnaiyan, 2011). A inclusão da desregulação energético-celular como uma

característica do câncer reflete o crescente reconhecimento da importância deste processo celular para a transformação maligna (Israel, 2011).

Nos últimos anos, pesquisadores descobriram que mutações genéticas frequentemente ocorrem em enzimas-chave que regulam vias metabólicas importantes. Eles também têm demonstrado que a expressão aberrante de oncogenes e genes supressores de tumor altera a expressão e atividade de transportadores de nutrientes e enzimas metabólicas (Dang *et al.,* 2009; Vander *et al.,* 2009). Os primeiros exemplos conhecidos de mutações em genes que codificam enzimas mitocondriais envolvidas no metabolismo incluem alterações no fumarato hidratase e succinato desidrogenase em leiomiomatose hereditária, carcinoma de células renais e paragangliomas (Frezza *et al.,* 2011; Gill, 2012). As primeiras mutações descobertas nos genes que codificam isocitrato desidrogenases (incluindo IDH1 e IDH2) foram identificados no câncer de cólon (Sjoblom *et al.,* 2006).

Em 2008, foi observado que os genes *IDH1*, e em menor grau *IDH2*, encontram-se mutados em gliomas de baixo grau e em um subconjunto de glioblastomas secundários (Parsons *et al.,* 2008). Mutações nesses genes também foram identificadas em outros tumores malignos, incluindo leucemia mielóide aguda, carcinoma de células escamosas oral, câncer de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas, encondroma e leucemia mielóide crônica (Tang *et al.,* 2011; Sequist *et al.,* 2011; Amary *et al.,* 2011; Ghiam *et al.,* 2012; Borger *et al.,* 2012). No entanto, as maiores frequências de mutações *IDH* são encontradas em gliomas e leucemia mielóide aguda (Yan *et al.,* 2009; Shen *et al.,* 2011).

Observou-se que pacientes com gliomas que apresentam *IDH1* mutado são, em média, vários anos mais jovem do que aqueles com gliomas que não apresentam mutação nesse gene (Paugh *et al.,* 2010; Pollack *et al.,* 2011). Parsons *et al.,* (2008) observaram que a idade média dos pacientes que apresentaram *IDH1* mutante foi de 33 anos, enquanto que no grupo de pacientes com tumores *IDH1* "selvagem" a idade média foi de 53 anos. Watanabe *et al.* (2009) verificaram que os pacientes com astrocitomas difuso de baixo grau portadores de mutações em *IDH1* eram significativamente mais jovens (36,2 ± 9,4

anos) do que aqueles sem mutações (51,6 ± 19,6 anos, p = 0,0004), enquanto que as médias de idade dos pacientes com oligodendroglioma que apresentara *IDH1* mutado e os que não apresentaram alteração não foram significativamente diferentes (42,6 ± 12,3 anos vs 37,1 ± 13,1 anos, p = 0,307).

Os dados obtidos no presente estudo contrastam com esses autores, uma vez que se observou que nos 6 pacientes que apresentaram o *IDH1* mutado a média de idade foi de 51,2 anos, superior a média observada entre os pacientes que não apresentaram mutação (34 anos), embora não tenha sido encontrada associação significativa entre as variáveis mutação e idade (p= 0, 1316). Uma explicação para essa divergência pode ser o fato de que 3 entre os 6 pacientes que apresentaram mutação tinham idade superior a 60 anos, o que elevou a média da faixa etária nesse grupo. Por outro lado, entre os pacientes que não apresentaram mutação, a amostragem foi composta por um número substancial de tumores que tipicamente ocorre em indivíduos jovens, como astrocitomas pilocítico, difuso e ependimomas grau II, o que reduziu a média de idade nesse grupo.

Todas as mutações *IDH1/2* descritas em bancos de dados são heterozigotas de sentido trocado (Yan *et al.,* 2009; Ichimura *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2009). Quase todas as mutações de *IDH1* em gliomas ocorrem no éxon 4 do gene, mais especificamente no códon 132 que codifica arginina (R132H), com uma rara exceção na qual a arginina do códon 100 é substituída por glutamina (R100Q) (Pusch *et al.,* 2011). Aproximadamente 90 % de todas as mutações de *IDH1* são transição de G → A no segundo nucleotídeo do códon 132 (c.395G>A) , resultando na substituição de arginina por histidina (R132H) . Outros tipos raros de mutação em IDH1 incluem a substituição de arginina por cisteína (R132C), serina (R132S), glicina (R132G), ou leucina (R132L) (Yan *et al.*, 2009; Ichimura *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2010).

Observou-se que 17,6% (6/34) das amostras apresentaram mutação no gene *IDH1*, e a análise por sequenciamento revelou que em 100% dos casos a mutação G → A no códon 132 (éxon 4) estava presente, sendo que todas essas alterações se apresentaram em heterozigose, confirmando assim os dados discutidos acima.

As mutações de *IDH2* em gliomas são muito menos comuns do que as de *IDH1* e invariavelmente afetam arginina no códon 172 do éxon 4 desse gene (R172) no sítio de ligação ao substrato da enzima IDH2. Mutações pontuais resultam na substituição de arginina por lisina (R172K), metionina (R172M), glicina (R172G), ou triptofano (R172W)(Yen *et al.,* 2010; Capper *et al.,* 2010). Estes dados estão em contraste com o que se observa em pacientes com leucemia mielóide aguda, em que as mutações *IDH2*, incluindo aquelas presentes no códon 140 que codifica arginina (por exemplo, R140Q), são mais comuns do que as mutações de *IDH1* (Yen *et al.,* 2010).

Mutações *IDH1* e *IDH2* são mutuamente exclusivas em gliomas, sugerindo que as consequências das mutações nesses dois genes podem ser equivalentes (Ichimura, 2012). Isto sugere que as taxas de mutações de *IDH1* e *IDH2* podem variar com o tipo de tumor. Além disso, aparentemente funcionam em diferentes compartimentos celulares (Krell *et al.,* 2011). Portanto, a mutação destes dois genes podem afetar diferentes caminhos celulares e exercer função tumorigênica diferentes. Mais estudos são necessários para uma compreensão mais aprofundada nesse aspecto.

O teste estatístico Análise de Variância Q de Cochran foi realizado com o objetivo de se comparar a prevalência da mutação R132H nos diversos tipos histológicos estudados, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tipos histológicos (p=0,1116).

Em nossa amostragem, verificou-se que: 33,3% (1/3) dos astrocitomas difuso grau II; 66,6% (2/3) dos astrocitomas anaplásico grau III; 50% (1/2) oligodendrogliomas grau II; e 66,6% (2/3) dos oligoastrocitomas anaplásicos grau III apresentaram IDH1 mutado. Portanto, os tumores de grau III apresentaram a maior frequência da mutação R132H, uma vez que 66,7% (4/6) das alterações foram identificadas nesse grupo. Porém, observou-se que não há associação significativa entre presença de mutações e o grau de estadiamento (0, 0748), sugerindo que mutações no gene *IDH1*, assim como no *TP53*, representam um evento precoce na progressão dos gliomas. Possivelmente, estes tumores podem acumular mutações e progredir para tumores de grau mais elevado e por isso, a identificação de alterações moleculares em um estágio precoce da doença pode

ser útil do ponto de vista clínico para o acompanhamento destes indivíduos e desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes, o que reflete na melhora do prognóstico desses pacientes.

Dados resumidos de uma série de estudos mostram que apenas cerca de 5,6% de glioblastomas primários apresentam mutações em *IDH1* enquanto que aproximadamente 76% dos glioblastomas secundários são portadores de mutações nesse gene (Dunn *et al.,* 2013). Em contraste com o glioblastoma primário, tumores de baixo grau têm uma alta incidência de mutações no *IDH1*; este gene é encontrado mutado em 76% dos astrocitomas difusos grau II e 62% dos astrocitomas anaplásicos grau III, aproximadamente 80% dos oligodendrogliomas grau II e 70% dos oligodendrogliomas grau III, e aproximadamente 80% dos casos de oligoastrocitoma grau II e quase 70% dos oligoastrocitomas grau III (Dunn *et al.,* 2013).

Pode-se observar assim que resultados obtidos se assemelham com os relatados na literatura, com exceção da frequência de mutações encontrada nos astrocitomas difusos, GBM e oligodendrogliomas grau II. No entanto essa discrepância pode ser justificada pelo baixo número amostral desses subtipos tumorais utilizados nesse estudo e pelo fato de que não foi possível diferenciar as amostras de GBM entre os subtipos primário e secundário, o que pode justificar a ausência de mutação, uma vez que a frequência de mutação no *IDH1* varia significativamente entre esses 2 subtipos.

Em contraste com os gliomas difusos, outros tumores, como astrocitoma pilocítico, astrocitoma subependimal de células gigantes, xantoastrocitoma pleomórfico e ependimoma apresentam poucos ou nenhuma mutação em *IDH1* (Takano *et al.,* 2011; Horbinski *et al.,* 2011; Solis *et al.,* 2011; Byeon *et al.,* 2012), como pode ser confirmado no presente trabalho, visto que não se identificou mutação de *IDH1* nos casos de astrocitomas pilocítico e ependimomas analisados.

Testes para avaliar o estado mutacional de *IDH1* podem ser usados como uma importante ferramenta diagnóstica. É útil na diferenciação de astrocitoma difuso e astrocitoma pilocítico (Korshunov *et al.,* 2009; Capper *et al.,* 2010), astrocitoma anaplásico e GBM (Capper *et al.,* 2010), GBM primário e secundário,

(Nobusawa *et al.,* 2009; Capper *et al.,* 2010) e astrocitomas de ependimomas (Capper *et al.,* 2010).

Somadas a alta incidência de mutações no gene *IDH1* em gliomas de baixo grau e glioblastoma secundário, e a baixa incidência dessas mutações no glioblastoma primário, parece plausível que glioblastomas primários com mutação nesse gene possam de fato representar tumores secundários diagnosticados erroneamente, decorrentes de gliomas de baixo grau anteriormente não diagnosticados, portanto, sugerindo que glioblastoma primário deve ser considerado separadamente como uma doença que apresenta *IDH1* "selvagem" (Dunn *et al.,* 2013).

Recentemente, foram realizados estudos em larga escala para identificar as principais alterações genéticas e epigenéticas e definir importantes subtipos moleculares nos GBM (Phillips *et al.,* 2006; Verhaak *et al.,* 2010). Publicações do *Cancer Genome Atlas* identificaram quatro subgrupos de GBM com base em padrões dominantes de expressão gênica, que foram definidos como proneural, neural, mesenquimal e clássico (Verhaak *et al.,* 2010). Aberrações e expressão gênica de *EGFR, NF1*, e *PDGFRA/IDH1* definem os subtipos clássicos, mesenquimais e proneural, respectivamente. GBMs secundários são praticamente sempre do subtipo proneural, enquanto GBMs primários podem ser qualquer um dos subtipos. Mutações no gene *IDH1* estão intimamente ligadas com o fenótipo proneural. Curiosamente, 11 de 12 mutações no gene *IDH1* foram encontradas nesta classe ($p < 0,01$, teste exato de Fisher) (Verhaak *et al.,* 2010).

Considerando que, tumores com ausência de mutação no códon 132 do éxon 4, do gene *IDH1*, poderiam conter mutações no códon 172 do éxon 4, do gene *IDH2* , analisamos as 34 amostras de gliomas também para o *IDH2* por SSCP, mas nenhuma mutação foi identificada. Nossos resultados corroboram os dados obtidos por outros pesquisadores (Yan *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2010; Yao *et al.,* 2013).

Por exemplo, em uma série de estudos onde foram analisados 360 glioblastomas primários em busca de alterações no gene *IDH2*, apenas 1 caso apresentou mutação e de 13 glioblastomas secundários nenhum apresentou mutação (Yan *et al.,* 2009; Hartmann *et al.,* 2010). Observou-se também que

menos de 2% dos astrocitomas de grau II e III apresentam mutações em *IDH2*, e não mais do que 6% dos oligodendrogliomas e oligoastrocitomas apresentam mutações em *IDH2* (Balss *et al.,* 2008; Yan *et al.,* 2009). Assim, os resultados obtidos neste estudo, associados com os dados descritos na literatura nos permitem comprovar que mutações no códon 172, do gene *IDH2* são, de fato, muito raras em relação às que ocorrem no códon 132, do gene *IDH1* em gliomas.

Mutações nos genes *IDH1/2* estão associadas a outras alterações genéticas que ocorrem com frequência em gliomas (Gorovets *et al.,* 2012). Dados da literatura mostram que mutações no *TP53* e *IDH1/2* ocorrem frequentemente juntas em tumores de origem astrocitária, enquanto que as mutações nos genes *IDH1/2* e deleções 1p/19q frequentemente ocorrem simultaneamente em tumores de origem oligodendroglial (Watanabe *et al.,* 2009; Yip *et al.,* 2012; Jiao *et al.,* 2012; Figarella-Branger *et al.,* 2012). Estas co-ocorrências específicas para tipos histológicos indicam que mutações nos genes *IDH*, principalmente *IDH1*, são alterações genéticas frequentes e precoces no desenvolvimento dos astrocitomas e oligodendrogliomas (Lass *et al.,* 2012).

Watanabe *et al.* (2009) analisaram múltiplas biópsias do mesmo paciente (51 casos) e relatou que a maioria das amostras apresentou mutação de *IDH1* juntamente com *TP53* mutante (63% dos astrocitomas difusos de baixo grau analisados) ou perda de heterozigose de 1p/19q (64% dos oligodendrogliomas analisados), observando também que mutações no gene *IDH1* sempre precediam a aquisição de mutações no *TP5*3 ou deleção de 1p/19q. Figarella-Branger *et al* (2012) analisaram mutações em *IDH1, TP53* e deleção de 1p/19q em 88 amostras de gliomas de baixo grau e observou que a presença de *TP53* mutado e deleção de 1p/19q foram sempre associadas a mutação em *IDH1*. Essas constatações levaram à hipótese de que mutações em *IDH* ocorrem antes de outros eventos genéticos na gliomagênese.

Embora comumente vista com alterações associadas com gliomas de baixo grau, mutações em *IDH* raramente são observadas com alterações genéticas presentes em alta frequência em GBMs primários, como anormalidades genéticas nos genes *PTEN* e *EGFR*, apoiando a ideia de que mutações no gene

IDH não são essenciais para a iniciação do tumor nestes subtipos de GBMs (Watanabe *et al.,* 2009).

Assim, parece haver três vias nas quais essas alterações discutidas acima levam ao desenvolvimento de gliomas. Uma via tem início através de mutação no gene *IDH* seguida por mutação no *TP53*, o que resulta nos tumores de linhagem astrocitária (Cohen *et al.,* 2013). Esses gliomas inicialmente são astrocitomas de grau 2 e, presumivelmente, em seguida, adquirem outras alterações genéticas que resultam na progressão para tumores de alto grau. Entre os 3 casos de astrocitomas desse estudo que apresentaram mutação no *IDH1*, 1 paciente com astrocitoma anaplásico grau III (CSN31) também apresentou alteração no gene *TP53*, sugerindo assim que essas mutações concomitantes podem ser comuns nos tumores de linhagem astrocitária.

Outra via começa com mutação em *IDH* seguida pela perda de 1p/19q. Estas alterações resultam no desenvolvimento de oligodendrogliomas de grau II, que podem adquirir outras alterações genéticas para se tornar oligodendrogliomas anaplásicos. Oligoastrocitomas apresentam tanto as alterações *IDH-TP53* como *IDH*-1p/19q (Ichimura, 2012; Cohen *et al.,* 2013).

A terceira via inclui os gliomas que não apresentam mutação nos genes *IDH*. Estes gliomas parecem adquirir rapidamente múltiplas alterações genéticas complexas, incluindo amplificação ou mutação do EGFR e deleção do gene *PTEN* , levando a formação dos GBM primários (Cohen *et al.,* 2013).

Embora nossa compreensão sobre as mutações presentes no gene *IDH* e sua biologia tenha aumentado significativamente nos últimos anos, fica evidente a necessidade de uma maior investigação para que se possa determinar estratégias terapêuticas ideais para subgrupos de pacientes com gliomas que apresentam *IDH* mutado.

6. CONCLUSÕES

- Os gliomas menos agressivos acometem os pacientes mais jovens, ao passo que se aumenta o grau de agressividade do tumor, a média de idade acompanha esse aumento.

- A quase total ausência de mutações no gene *PTEN* nas amostras de gliomas estudadas sugere que mutações nesse gene não foram fundamentais na gênese e/ou progressão dos tumores analisados no presente estudo.

- Maior ocorrência de mutações no domínio de ligação ao DNA da p53, principalmente na região dos éxons 5 e 7 do *TP53*.

- Observou-se que 100% das alterações encontradas no *IDH1* foram transições G → A no códon 132 do éxon 4 desse gene, ocasionando uma mutação de sentido trocado (R132H). Todas estas mutações se apresentaram em heterozigose. No entanto, nenhuma amostra apresentou mutação no gene *IDH2*, confirmando assim que mutações nesse gene são menos frequente em gliomas quando comparado a mutações no *IDH1*.

- Não houve associação estatística entre a presença de mutações *TP53* e *IDH1* e as variáveis idade e gradação tumoral. No entanto, identificou-se uma prevalência significativa de alterações do *TP53* no subtipo tumoral dos astrocitomas.

- A detecção de mutações simultâneas nos genes *TP53* e *IDH1* sugere a ocorrência concomitante de alterações desses genes na via de desenvolvimento dos tumores astrocíticos.

- Não houve diferença estatisticamente significante na prevalência de mutações nos genes *TP53* e *IDH1* entre os tumores de baixo e alto grau, sugerindo-se assim que essas mutações são eventos precoces na progressão dos gliomas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, J.M. *et al*. Association of Loss of Heterozygosity and PTEN Gene Abnormalities with Paraclinical, Clinical Modalities and Survival Time of Glioma Patients in Malaysia. Asian J Surg. 2006, 29(4):274-82.

AMARY, M.F. *et al*. IDH1 andIDH2 mutations arefrequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. J Pathol 2011, 224:334–343.

AMBS, S. *et al.* Cancer-prone oxyradical overload disease. IARC Sci Publ 1999, 150:295–302.

BALSS, J. *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. Acta Neuropathol 2008,116:597–602.

BELYI, V.A. *et al.* The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010, 2(6):a001198.

BIERNAT, W., ZAWROCKI, A. Molecular alterations in ependymomas. Folia Neuropathol 2007, 45(4):155-63.

BIRLE, D. *et al.* Negative feedback regulation of the tumor suppressor PTEN by phosphoinositide-induced serine phosphorylation. J. Immunol 2002, 169: 286291.

BORGER, D.R. *et al*. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. Oncologist 2012, 17:72–79.

BOURNE, T.D., SCHIFF, D. Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. Nat Rev Neurol, 2010, 6(12):695-701.

BRENNAN, P. Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? Carcinogenesis 2002, 23(3): 381-7.

BROCK, C. *et al.* DNA Methylation, Isocitrate Dehydrogenase Mutation, and Survival in Glioma. J Natl Cancer Inst 2011, 103(2):143-53.

BYEON, S.J. *et al*. Distinct genetic alterations in pediatric glioblastomas. Childs Nerv Syst 2012, 28:1025–1032.

CAMELO-PIRAGUA, S. *et al*. Mutant IDH1-specific immunohistochemistry distinguishes diffuse astrocytoma from astrocytosis. Acta Neuropathol 2010,119:509–511.

CAPPER, D. *et al.* Application of mutant IDH1 antibody to differentiate diffuse glioma from nonneoplastic central nervous system lesions and therapy-induced changes. Am J Surg Pathol. 2010, 34:1199–1204.

Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC). Disponível em: http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Acessado em Janeiro de 2014.

CAVENEE, W.K. *et al*. Astrocytic tumors. In: KLEIHUES, P; CAVENEE, W.P (ed). Pathology and genetics. Tumors of the nervous system. 1st ed., International Agency for Research on Cancer Press, Lyon, 1997, p. 9-29.

Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008. University of Illinois at Chicago (March 23, 2012 Revision).

CHALHOUB, N., BAKER, S.J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. Annu Rev Pathol 2009, 4:127-50.

CHANDANA, S.R. *et al.* Primary brain tumors in adults. Am Fam Physician 2008, 77(10):1423-430.

CHENG, Y. *et al*. Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuseastrocytomas. Histopathology 2000, 37(5):437-44.

CHRISTENSEN, B.C. *et al.* DNA Methylation, Isocitrate Dehydrogenase Mutation, and Survival in Glioma. J Natl Cancer Inst 2011,103(2):143-53.

CLARA, C.A. Estudo das expressões imunoistoquímicas dos marcadores HIF-1α, VEGF e PDGF-C correlacionados com a angiogênese e o prognóstico em glioblastomas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

COHEN, A.L., HOLMEN, S.L., COLMAN, H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. Curr Neurol Neurosci Rep 2013, 13(5):345.

DAHIA, P.L. PTEN, a unique tumor suppressor gene. Endocr Relat Cancer 2000, 7: 115–129.

DAMIN, A.P. *et al.* Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. Cancer Detect Prev 2006, 30:523–529.

DANG, L. *et al*. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 2009, 462:739–744.

DI CRISTOFANO, A., PANDOLFI, P.P. The multiple roles of PTEN in tumor supression. Cell 2000, 100:387-90.

DUNN, G.P., ANDRONESI, O.C., CAHILL, D.P. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. Neurosurg Focus, 2013, 34 (2):E2.

EL HALLANI, S., ROSSETTO, M., SANSON, M. The Pro/Pro genotype at TP53 codon 72 polymorphism is associated with early onset glioblastoma. Cancer Genet 2012, 205(12):677.

ERMORIAN, R.P. *et al.* Dysregulation of PTEN and protein Kinase with glioma histology and patient survival. Clin Cancer Res 2002, 8(5):1100-6.

FARIA, M.H. *et al.* TP53 mutations in astrocytic gliomas: an association with histological grade, TP53 codon 72 polymorphism and p53 expression. APMIS 2012, 120(11):882-9.

FERLAY, J., PISANI, P., PARKIN, D.M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Cancer Incidence and Mortality Worldwide (CR-rom) ed. 2004, Lyon.

FIGARELLA-BRANGER, D. *et al.* Molecular genetics of adult grade II gliomas: towards a comprehensive tumor classification system. J Neurooncol 2012, 110:205–213.

FREZZA, C. *et al*. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. Nature 2011, 477: 225–228.

FULTS, D., PEDONE, C. Immunocytochemical mapping of the phosphatase and tensin homolog (PTEN/MMAC1) tumor suppressor protein in human gliomas. Neuro Oncol 2000, 2(2):71-9.

FURNARI, F.B., FENTON, T., BACHOO, R.M. Malignant Astrocytic Glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes & Development 2009, 21: 2683-2710.

GASPAR, N. *et al*. p53 Pathway dysfunction in primary childhood ependymomas. Pediatric Blood and Cancer 2006, 46(5):604-13.

GEISBRECHT, B.V., GOULD, S.J. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem 1999, 274(43): 30527-33.

GEORGESCU, M.M. *et al*. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. Cancer Res 2000, 60:7033 – 8.

GHIAM, A.F. *et al*. IDH mutation status in prostate cancer. Oncogene 2012, 31:3826.

GILL, A.J. Succinate dehydrogenase (SDH) and mitochondrial driven neoplasia. Pathology 2012, 44:285–292.

GIMENEZ Y RIBOTTA, M., MENET, V., PRIVAT, A.The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. Prog Brain Res 2001, 132, 587-610.

GOROVETS, D. *et al*. IDH mutation and neuroglial developmental features define clinically distinct subclasses of lower grade diffuse astrocytic glioma. Clin Cancer Res 2012, 18:2490–2501.

GUPTA, R*. et al.* Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications. J Clin Pathol 2011, 64(10):835-44.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 2011, 144(5):646-74.

HARTMANN, C*. et al*. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. Acta Neuropathol 2009, 118:469–474.

HARTMANN, C. *et al.* Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. Acta Neuropathol 2010, 120(6):707-18.

HARTONG, D.T. *et al.* Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. Nat Genet 2008, 40:1230–1234

HAYASHI, K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. PCR Methods Application 1991, 1: 34-38.

HAYASHI, K., YANDELL, D.W. How sensitive is PCR-SSCP? Human Mutation 1993, 2: 338-346.

HAYES, V.M. *et al*. High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas indicates role of TP53 in the development of these tumors. Brain Pathology 1999, 9(3): 463-7.

HORBINSKI, C. *et al*. Diagnostic use of IDH1/2 mutation analysis in routine clinical testing of formalin-fixed, paraffin-embedded glioma tissues. J Neuropathol Exp Neurol 2009, 68:1319–1325.

HORBINSKI, C. *et al*. Detection of IDH1 and IDH2 mutations by fluorescence melting curve analysis as a diagnostic tool for brain biopsies. J Mol Diagn 2010,12:487–492.

HORBINSKI, C. *et al*. Isocitrate dehydrogenase 1 analysis differentiates gangliogliomas from infiltrative gliomas. Brain Pathol 2011, 21:564–574.

HU, Y., MCDERMOTT, M.P., AHRENDT, S.A. The p53 codon 72 proline allele is associated with p53 gene mutations in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2005,11:2502–2509.

ICHIMURA, K. *et al.* Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. Cancer Research 2000, 60(2):417-24.

ICHIMURA, K. *et al.* IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but are rare in primary glioblastomas. Neuro Oncol 2009, 11:341–347.

ICHIMURA, K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. Brain Tumor Pathol 2012, 29(3):131-9.

IDBAIH, A. *et al*. Tumor genomic profiling and TP53 germline mutation analysis of first degree relative familial gliomas. Cancer Genet Cytogenet 2007,176:121–126.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2014.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC TP53 Database. Disponível em: http://p53.iarc.fr/. Acessado em Janeiro de 2014.

ISHII, N. et al. Absence of p53 gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. International Journal of Cancer 1998, 76(6):797-800.

ISRAEL, M., SCHWARTZ, L.The metabolic advantage of tumor cells.Mol Cancer 2011,10:70.

JELONEK, K. *et al.* Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. Journal Applied Genetics 2010, 51(3):343–352.

JEUKEN, J.W., VON DEIMLING, A., WESSELING, P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. Journal of Neuro-oncology 2004, 70(2):161-81.

JIAO, Y. *et al*. Frequent ATRX, CIC, and FUBP1 mutations refine the classification of malignant gliomas. Oncotarget. 2012, 3:709–722.

JONES, J.S. *et al.* p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. Clin Cancer Res 2004, 10:5845–5849.

JUDITH, W.M. *et al*. The Nature and Timing of Specific Copy Number Changes in the Course of Molecular Progression in Diffuse Gliomas: Further Elucidation of Their Genetic “Life Story”. Brain Pathol 2011, 21(3):308-20.

KANG, M.R., *et al.,* Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. Int J Cancer 2009, 125(2): 353-5.

KAST, B.The best supporting actors. Nature 2001, 412, 674-6.

KATO, Y. *et al.* A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation. Biochem Biophys Res Commun 2009, 390:547–551.

KIM, K.E. *et al*. Cytogenetic Characterizations of Central Nervous System Tumors: The First Comprehensive Report from a Single Institution in Korea. J Korean Med Sci 2009, 24(3):453-60.

KIM, Y.H. *et al*. Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. The American Journal of Pathology 2010; 177(6):2708-14.

KLEIHUES, P. *et al*. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds) Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: IARC; 2000.

KLEIHUES, P., CAVENEE, W.K. (Eds.) World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

KNOBBE, C.B., MERLO, A., REIFENBERGER, G. Pten signaling in gliomas. Neuro-Oncol 2002, 4: 196–211.

KORSHUNOV, A. *et al*. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. Acta Neuropathol 2009, 118:401–405.

KOUSHIK, A., PLATT, R.W., FRANCO, E.L. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004,13:11–22.

KRELL, D. *et al*. Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. PLoS One 2011, 6:e19868.

LABUSSIERE, M. *et al.* All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. Neurology 2010, 74:1886–1890.

LANGERØD, A. *et al.* The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002,11:1684 – 8.

LARJAVAARA, S. *et al*. Incidence of gliomas by anatomic location. Neuro Oncol 2007, 9(3):319-25.

LASS, U. *et al*. Clonal analysis in recurrent astrocytic, oligoastrocytic and oligodendroglial tumors implicates IDH1-mutation as common tumor-initiating event. PLoS One 2012, 7:e41298.

LEE, J.O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. Cell 1999,99:323 – 34.

LEE, S.M. *et al*. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. Free Radic Biol Med 2002, 32(11): p. 1185-96.

LOUIS, D.N. *et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 2007,114(2):97-109.

LOUIS, D.N., POMEROY, S.L., CAIRNCROSS, J.G. Focus on central nervous system neoplasia. Cancer Cell 2002, 1(2):125-128.

LUDWIG, J.A., WEINSTEIN, J.N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer 2005,5:845Y56.

MAHER, E.A. *et al*. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001, 15(11): 1311-33.

MALKIN, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990, 250: 1233–1238.

MANNING, B.D., CANTLEY, L.C.: AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 2007,129: 1261-1274.

MARIO, H. G. *et al.* TP53 mutations in astrocytic gliomas: an association with histological grade, TP53 codon 72 polymorphism and p53 expression. [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2005.

MARKMAN, M. High-Grade Gliomas – Diagnosis and treatment. Totowa: GENE H. BARNETT , MD. 2007

MELLAI, M. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. J Neurooncol 2012, 107(3):617-31.

MIASW, A. *et al.* Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

MILLER, S.J. *et al.* Direct identification of PTEN phosphorylation sites. Lett 2002, 528, 145-153.

MLADKOVA, N., CHAKRAVARTI, A. Molecular profiling in glioblastoma: prelude to personalized treatment. Curr Oncol Rep 2009, 11(1):53-61.

MOUNIR, Z. *et al.* Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2 α phosphorylation pathway. Sci Signal 2009, 2:ra85.

MUELLER, S. *et al*. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. Neuro Oncol 2012, 14(9):1146-52.

MUKASA, A. *et al.* Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. Cancer Sci 2012, 103(3):587-92.

MURPHY, M.E. Polymorphic variants in the p53 pathway. Cell Death Differ 2006,13:916 e 920.

MYERS, M.P. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 1997,94:9052 -7.

NAKAMURA, M. *et al.* Genetic analysis to complement histopathological diagnosis of brain tumors. Histol Histopathol 2007, 22(3): 327-35.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em : www.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em Janeiro de 2014.

NAYAK, A. *et al.* p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. Neurol India 2004, 52:228 –32.

NOBUSAWA, S. et al. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res 2009, 15:6002–6007.

NOZAKI, M. *et al*. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. Neuro Oncol 1999,1:124 – 37.

OHGAKI, H. *et al.* Pathways to glioblastoma: a population based study on incidence, survival rates, and genetic alterations. Cancer Res 2004, 64: 6892–6899.

OHGAKI, H., KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathology 2005, 109(1):93-108.

OHGAKI, H., KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am. J. Pathol 2007,170(5):1445-1453.

OHGAKI, H. Epidemiology of brian tumors. Methods Molecular Biolgy 2009, 472:323-42.

OHGAKI, H., KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci 2009, 100(12): 2235-41.

OKAMOTO, Y. *et al*. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. Acta Neuropathologica 2004, 108(1):49-56.

OLIVIER, M., HOLLSTEIN, M., HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009, 2(1):a001008.

OLIVIER, M., TANIERE, P. Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. Curr Opin Oncol 2011, 23(1):88-92.

PARHAR, P. *et al*. Possible association of p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to adult and pediatric high-grade astrocytomas. Brain Res Mol Brain Res 2005,2:98 – 103.

PARSONS, D.W. *et al*. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science. 2008, 321:1807–1812.

PAUGH, B.S. *et al*.Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. J Clin Oncol 2010, 28:3061–3068

PETITJEAN, A. *et al*. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 2007, 26:2157–2165.

PFRIEGER, F.W., BARRES, B.A. What the fly's glia tell the fly's brain. Cell 1995, 83: 671-4.

PHILLIPS, H.S. *et al*. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell 2006, 9(3):157 – 73.

POLLACK, I.F. *et al*. IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group. Childs Nerv Syst 2011,27:87.

POLLARD, P.J., RATCLIFFE, P.J. Cancer. Puzzling patterns of predisposition. Science 2009, 324(5924): 192-4.

PONTEN, J. Precancer biology: importance and possible prevention. Introduction. Cancer Surv 1998, 32: 1-3.

PRENSNER, J.R., CHINNAIYAN, A.M. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. Nat Med 2011,17:291–293.

PUSCH, S. *et al.* Glioma IDH1 mutation patterns off the beaten track. Neuropathol Appl Neurobiol 2011, 37:428–430.

RAFTOPOULOU, M. *et al*. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. Science 2004, 303:1179 –81.

RASHEED, A. *et al.* Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. Cancer 2002, 94:2688-2697.

REIFENBERGER, G., COLLINS, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. J Mol Med (Berl) 2004, 82(10):656-70.

REITMAN, Z.J., YAN, H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. J Natl Cancer Inst 2010,102:932 e 41.

RICARD, D. *et al.* Primary brain tumours in adults. Lancet 2012, 26;379(9830):1984-96.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation. Ageing Research Review 2003, 2(3):245-261.

RIEMENSCHNEIDER, M.J., REIFENBERGER, G. Molecular neuropathology of gliomas. International Journal Molecular Science 2009, 10:184-212.

RIEMENSCHNEIDER, M.J. *et al.* Molecular diagnostics of gliomas: starte of the art. Acta Neuropathol 2010, 120(5):567-84.

ROBLES, A.L., HARRIS, C.C. Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010,2(3):a001016.

ROGLER, A. *et al.* P53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism and prostate cancer risk: association between disease onset and proline genotype. Pathobiology 2011,78:193 e 200.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor 1989, 9.38−9.40.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977, 74(12): 5463-5467.

SCHMITT, M. *et al.* Identification, validation, and clinical implementation of tumor-associated biomarkers to improve therapy concepts, survival, and quality of life of cancer patients: Tasks of the Receptor and Biomarker Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Int J Oncol 2004, 25:1397Y406.

SCOUMANNE, A., HARMS, K.L., CHEN, X. Structural Basis for Gene Activation by p53 Family Members. Cancer Biol Ther 2005, 4(11):1178-85.

SEQUIST, L.V. *et al*. Implementing multiplexed genotyping of non-small-celllung cancers into routineclinicalpractice. Ann Oncol. 2011, 22:2616–2624.

SHEN, Y. *et al*. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. Blood 2011, 118:5593–5603.

SJOBLOM, T. *et al*. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 2006, 314:268–274.

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. Fundamentos de genética 6º edição. Minessota: Wiley. 2012

SOLIS, O.E. *et al*. Rosette-forming glioneuronal tumor: a pineal region case with IDH1 and IDH2 mutation analyses and literature review of 43 cases. J Neurooncol 2011,102:477–484.

SONG, M.S., SALMENA, L., PANDOLFI, P.P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat Rev Mol Cell Biol 2012, 13(5):283-96.

SOUSA, H. *et al.* Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. Eur J Cancer Prev 2006,15:362–366.

SPASSKY, N. *et al*. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 2005, 25:10–18.

SRIVASTAVA, S. *et al*. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature 1990, 348: 747–749.

STEPHEN, Y.I.P. *et al.* Molecular Diagnostic Testing in Malignant Gliomas: A Practical. Update on Predictive Markers. J Neuropathol Exp Neurol 2008, 67(1):1-15.

SUGIMURA, T. USHIJIMA, T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. Mutant Research 2000, 462(2-3):235-246.

TADA, K. *et al.* Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. Neuro-Oncoly. 2003, 5(4):228-34.

TAKAHASHI, Y. *et al*. PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. EMBO J 2006, 25: 910-920.

TAKANO, S. *et al*. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. Brain Tumor Pathol 2011, 28:115–123.

TAKANO, S *et al.* Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. J Neurooncol 2012, 108(3):361-73.

TANG, J.Y. *et al*. Isocitrate dehydrogenase mutation hot spots in acute lymphoblastic leukemia and oral cancer. Kaohsiung J Med Sci 2012, 28:138–144.

TAYLOR, M.D. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. Cancer Cell 2005, 8:323–335.

TOHMA, Y. *et al.* PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 1998, 57: 684–689.

VANDER HEIDEN, M.G., CANTLEY, L.C., THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 2009, 324:1029–1033.

VANINETTI, N.M. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Mol Carcinog 2008, 47: 275–285.

VERHAAK, R.G. *et al*. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. 2010, 17(1):98 – 110.

VON DEIMLING, A. Gliomas. Recent Results in Cancer Research. Heidelberg: Springer, 2009.

WAITE, K.A., ENG, C. Protean PTEN: form and function. Am J Hum Genet 2002, 70:829 – 44.

WATANABE, K. *et al*. p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. Acta Neuropathologica 1998, 95(6):559-64.

WATANABE, T. *et al*. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. Am J Pathol 2009, 174: 1149–1153.

WEGMAN, P. *et al.* p53 polymorphic variants at codon 72 and the outcome of therapy in randomized breast cancer patients. Pharmacogenet Genomics 2006,16:347–351.

WIENCKE, J.K. *et al*. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. Neuro Oncol 2007, 9:271–279.

XU, X. *et al*. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. J Biol Chem 2004. 279(32): p. 33946-57.

YAN, H. *et al*. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 2009, 360:765–773.

YANG, Y. *et al.* Mutations of PTEN Gene in Gliomas Correlate to Tumor Differentiation and Short-term Survival Rate. Anticancer Res 2010, (3):981-5.

YAO, Y. *et al*. Mutation Analysis of IDH1 in Paired Gliomas Revealed IDH1 Mutation Was Not Associated with Malignant Progression but Predicted Longer Survival. PLoS One 2013, 28;8(6):e67421.

YEANG, C., McCORMICK, F., LEVINE, A. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. The FASEB Journal 2008, 22: 2605-2622.

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

YING, W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxid Redox Signal 2008, 10(2):179-206.

YIP, S. *et al*. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. J Pathol 2012, 226:7–16.

ZAWLIK, I. *et al.* Common Polymorphisms in the MDM2 and TP53 Genes and the Relationship between TP53 Mutations and Patient Outcomes in Glioblastomas. Brain Pathol 2009, 19(2):188-94.

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

ZHAO, S. *et al.* Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. Science 2009, 324(5924): 261-5.

ZOU, X.P. *et al.* Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. Int. J. Cancer 1999, 84: 150-154.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

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

A: Profª. 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-referedum*, em 30 de março de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até o dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA situado no Campus universitário do Guamá no Complexo de sala de aula do CCS – sala 13 (Altos), (em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia).

Atenciosamente,

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

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

ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR FRANCISCO MAURO SALZANO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos - Resolução nº 466 de 12.12.2012 - CNS)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL
NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....NASCIMENTO: / /
ENDEREÇO:.....Nº.....
COMPLEMENTO.....CEP.....
CIDADE.....UF..... TEL.....

II. DADOS SOBRE O ESTUDO
TÍTULO: "ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GÊNICAS E CROMOSSÔMICAS EM TUMORES DE SISTEMA NERVOSO HUMANO**".**

PESQUISADORES PRINCIPAIS: Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo (coordenador); Prof. Dr. Edivaldo Herculano C. de Oliveira

II. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO (À) PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

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. 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 O Instituto Evandro Chagas está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam o desenvolvimento de tumores de sistema nervoso central, através da identificação das alterações genéticas (cromossomos e genes) associadas ao quadro clínico do paciente e exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de

tecido removido por punção/cirurgia e oferecem novas possibilidades de diagnóstico. A obtenção do fragmento de tecidos tumorais 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. Todos os resultados serão encaminhados aos responsáveis pelos participantes do estudo, assim como será assegurado o sigilo de todas as informações coletadas. É importante informar que as amostras poderão permanecer na Instituição para realização de estudos futuros que possam beneficiar a comunidade em geral. Este projeto tem como coordenador o pesquisador **Nilson Praia Anselmo, Doutor em Genética, fones: 3201-7585.**

IV. AFIRMAÇÕES DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

6. Fui esclarecida sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos? **SIM** **NÃO**

7. Fui esclarecida sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto a continuidade do meu tratamento?

SIM **NÃO**

8. Fui esclarecida que não haverá remuneração financeira, além do previsto para as despesas do estudo? **SIM** **NÃO**

9. Fui esclarecida de não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

SIM **NÃO**

10. Fui esclarecida sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?

SIM **NÃO**

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecida dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definido nos itens 1 a 7, do inciso III, e 1 a 5 do inciso IV, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Local:....., ...de.....de.....

---------- ----------

Assinatura e carimbo do responsável técnico **Assinatura da paciente ou Resp. Legal**

Como tenho dificuldade de escrever meu nome, confirmo minha participação no estudo com a minha digital.

Testemunhas: _____

_____