

LUCIANA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**ANÁLISE EPIGENÉTICA E DE POLIMORFISMOS EM
TUMORES EXTRA-AXIAIS DO SISTEMA NERVOSO**

Tese apresentada à pós-graduação da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
da Universidade de São Paulo, como parte
dos pré-requisitos para a obtenção do título
de Doutor em Genética.

Profa. Dra. Cacilda Casartelli
Orientadora

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Luciana Oliveida de
Análise Epigenética e de Polimorfismos em Tumores Extra-
Axiais do Sistema Nervoso. Ribeirão Preto, 2009.
124 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética
Orientador: Casartelli, Cacilda.

1. Meningiomas. 2. Schwannomas. 3. Metástases. 4. Metilação.
5. Polimorfismos.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, porque o mundo
pertence a quem se atreve e a vida é “muito”
para ser insignificante.*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me agraciar com o dom da vida e sempre estar ao meu lado, me protegendo e guiando. Obrigada Senhor, pelos momentos de felicidade, verdade e também de dor, pois pude perceber a grandeza de sua misericórdia e me tornar um ser humano melhor.

Aos meus pais, maiores exemplos de vida, meu porto seguro, junto dos quais todas as dificuldades se tornam leves, muito obrigada pelo apoio e confiança em todos os momentos e em todas as escolhas. Fico feliz ao perceber o orgulho que sentem a cada conquista de suas filhas, saibam que todas elas são dedicadas a vocês.

À Profa. Dra. Cacilda Casartelli, por ter me permitido e confiado a realização deste trabalho em seu laboratório. Aos professores, funcionários e amigos do departamento de Genética, por todo ensinamento e ajuda que me deram. À CAPES, FAPESP e FAEPA, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À Cuca e Márcio, funcionários do laboratório de Oncogenética e grandes amigos, não só pela ajuda na realização do trabalho, mais também pelos conselhos, desabafos e momentos de descontração, sem os quais, a conclusão do trabalho teria sido muito mais difícil. À Dona Francisca, por sempre zelar pelo laboratório, e pelos quitutes deliciosos. À Aline, pelo companheirismo, amizade e toda ajuda na realização do trabalho.

Ao Mendelson, do laboratório do Genoma, por estar sempre disposto a ajudar com o seqüenciamento das amostras. Ao Hospital de Câncer de Barretos, pelas amostras cedidas e, em especial ao Dr. Marcelo José da Silva, por ter sido sempre muito solícito nos momentos em que precisei. À todas as pessoas que concordaram e fazer parte do grupo amostral do trabalho. Aos amigos Léo e Fábio, por todas as dicas que foram fundamentais para a conclusão do trabalho. À Cristiane e Josiane, estagiárias do laboratório, pelos inúmeros géis e PCRs e também pelas agradáveis conversas. À pessoas muito especiais, que passaram pela minha vida mas permanecerão em meu coração, Ciane, Renata, Juliana e Nacibe, vocês são pessoas incríveis.

Ao Márcio, meu namorado (noivo – ainda não me acostumei com o título), amigo, companheiro em todos os momentos, pela ajuda com as figuras, e

principalmente pelo apoio emocional em todos os momentos difíceis. À minha irmã Alessandra, pelas traduções dos artigos e resumos.

Sem a presença de cada uma das pessoas aqui citadas, com certeza, esse trabalho não teria sido concluído. A todos vocês o meu...

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

ALMEIDA, L.O. Análise Epigenética e de Polimorfismos em Tumores Extra-Axiais do Sistema Nervoso. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os tumores extra-axiais do sistema nervoso são de localização extra-cerebral e na maioria das vezes benignos; meningiomas, schwannomas e metástases fazem parte deste grupo. O aparecimento de um tumor ocorre a partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas nas células. Para entender o mecanismo molecular da progressão tumoral e a formação de metástases é indispensável identificar os genes que acumulam essas alterações. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de metilação dos genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1, NDRG2 e das DNA metiltransferases 3A, 3B e 3L e sua associação com os tumores extra-axiais e ainda, avaliar, através de um estudo caso-controle, a influência dos SNPs TP53 Pro47Ser e Arg72Pro, EGF + 61, GSTP-1 Ile105Val e WRN Cys1367Arg no desenvolvimento e prognóstico desses tumores. A técnica utilizada para a análise de hipermetilação foi a MSP, e através dela observamos que a atividade das DNMTs não está associada à metilação dos tumores extra-axiais e ainda, os perfis de metilação das DNMTs *de novo* não estão associados com alterações no padrão de metilação dos genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1 e NDRG2. Observamos que a metilação do gene TP53 está associada principalmente aos tumores de maior grau de malignidade, a uma deficiência na resposta a tratamentos e, conseqüentemente, a um maior número de óbitos. A metilação do gene TP16 está envolvida mais freqüentemente na formação de schwannomas e a de NDRG2 na progressão dos meningiomas. A análise de polimorfismos foi realizada através da técnica de PCR-RFLP e observamos diferenças nas distribuições genotípicas entre pacientes e controles nos SNPs TP53 Pro47Ser e Arg72Pro, EGF + 61 e GSTP-1 Ile105Val, onde as variantes Ser47, Pro72, EGF G61 e Val105 foram observadas com maior freqüência entre os portadores de tumores extra-axiais. Dessa forma, estas variantes podem ser fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento dos tumores.

Palavras-chave: Metilação, Polimorfismos, Meningiomas, Schwannomas, Metástases

ABSTRACT

ALMEIDA, L.O. Epigenetic and Polymorphism Analysis in Extra-Axial Brain Tumors. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The extra-axial brain tumors have extra-brain localization and in most of the time they are benign, meningiomas, schwannomas and metastasis are included in this group. The appearance of a tumor occurs because of the accumulation of genetic and epigenetic alterations in the cells. In order to understand the molecular mechanism of the tumor progression and the metastasis formation it is important to identify the genes that accumulate the alterations. Thereby, the objective of this study was to analyze the methylation profile of the genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1, NDRG2 and the DNA methyltransferases 3A, 3B and 3L and their association with the extra-axial brain tumors. Another purpose was to determine, in a case-control study, the roles of the TP53 Pro47Ser and Arg72Pro, EGF + 61, GSTP-1 Ile105Val and WRN Cys1367Arg SNPs in the development and prognosis of these tumors. We used the MSP to screen the hypermethylation profile and we observed no association between the DNMTs activity and the hypermethylation of the tumors. We also did not find association between the methylation of the DNMTs *de novo* and alterations in the methylation profile of the genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1 and NDRG2. We observed that TP53 hypermethylation was associated with the high grade tumors, a poor response to the treatments and, consequently, the high number of obits. The TP16 methylation was involved with the shwannomas formation and the NDRG2 gene was involved in the meningiomas progression. For the polymorphism analysis, we used the PCR-RFLP technique and we observed differences in the genotype distributions between cases and controls of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro, EGF + 61 and GSTP-1 Ile105Val SNPs, where the variants Ser47, Pro72, EGF G61 and Val105 were more frequent in patients than in controls. Thus, these variants can be important factors of susceptibility to the tumor development.

Keywords: methylation, polymorphism, meningioma, schwannoma, metastasis.

SUMÁRIO

Capítulo I	Introdução geral.....	1
1	Tumores do Sistema Nervoso.....	3
2	Meningiomas.....	5
3	Schwanomas.....	8
4	Metástases.....	10
Capítulo II	Hipermetilação do DNA em Tumores Extra-Axiais do Sistema Nervoso.	
1	Introdução.....	12
1.1	Epigenética.....	13
1.2	Metilação do DNA.....	15
1.3	DNA metiltransferases.....	19
1.4	Estrutura da Cromatina.....	22
1.5	Metilação do DNA e Câncer.....	25
1.6	Metilação do DNA: Aplicações Clínicas e Terapêuticas.....	29
1.7	Objetivos.....	31
2	Materiais e Métodos.....	32
3	Resultados.....	38
4	Discussão.....	45
5	Conclusões.....	53
Capítulo III	Influência de SNPs em Tumores Extra-Axiais do Sistema Nervoso	
1	Introdução.....	55
1.1	Polimorfismos de Base Única.....	56
1.2	Gene EGF.....	57
1.3	Gene GSTP-1.....	59
1.4	Gene TP53.....	61
1.5	Gene WRN.....	63
1.6	Objetivos.....	65
2	Materiais e Métodos.....	66
3	Resultados.....	75
4	Discussão.....	95
5	Conclusões.....	105
Capítulo IV	Referências Bibliográficas.....	106

I. INTRODUÇÃO GERAL

Desde a descoberta do câncer até os dias atuais, ele tem sido definido por muitos caminhos. Com a observação do processo de angiogênese, o “mundo do câncer” se restringia à espessura do vaso sanguíneo responsável pela nutrição do tumor. Posteriormente, patologistas observaram que as células do câncer adquiriam propriedades diferentes em cada estágio de seu desenvolvimento. No século passado, o modelo genético do câncer era baseado em anormalidades cromossômicas. Na era moderna, diversas alterações moleculares que ocorrem entre os tipos de cânceres levaram à idéia de que estes envolvem muitas doenças. Tumores sólidos progridem de tumores benignos, relativamente bem diferenciados e não invasivos, provavelmente envolvendo uma ou poucas mutações, para cânceres *in situ* com instabilidade genética, mas baixo potencial invasivo e metastático. Por fim, progridem para tumores invasivos e metastáticos, através do aumento de mudanças genéticas que proporcionam adaptação a essas células em diversos outros ambientes do corpo (Feinberg et al, 2006).

Atualmente, com o conhecimento de que o DNA é o material genético e com as poderosas tecnologias desenvolvidas, têm-se a oportunidade de aprofundar o conceito de câncer para níveis cada vez mais específicos, como para uma única molécula, e determinar quantas e quais alterações são requeridas no processo de tumorigênese. Podem ser determinados os passos que representam a aquisição de novos mutantes que compõem a base do fenótipo de células cancerosas e se essas mutações são clonais, sendo selecionadas de milhares de mutações ao acaso que estão presentes em cada célula cancerosa. Mutações clonais derivam de ciclos repetitivos de seleção para fenótipos que representam passos fundamentais à progressão do câncer, enquanto que mutações ao acaso refletem mudanças no DNA que ocorreram pela primeira vez após o último ciclo de seleção clonal. A determinação de alterações genéticas é de extrema importância em câncer, uma vez que, a determinação de um grande número de alterações em cânceres em progressão pode ser a chave para quantificar a extensão da heterogeneidade de um tumor e avaliar pacientes quanto ao risco ou desenvolvimento de resistência a drogas (Loeb et al, 2008).

O câncer é um processo complexo no qual estão envolvidas anormalidades em muitos genes. O padrão de combinação de todos os genes mutados pode revelar as relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, além de identificar alvos para o desenvolvimento de tratamentos (Yeang et al, 2008). Para entender o mecanismo molecular da progressão tumoral e a formação de metástases é indispensável identificar os genes que acumulam essas alterações, assim como os genes

cuja expressão é responsável pela aquisição do potencial metastático nas células afetadas. A análise molecular destas células em vários estágios de progressão tem revelado que alterações nos genes supressores e oncogenes, acumuladas durante a progressão tumoral, estão associadas à agressividade do câncer (Yokota, 2000). A proliferação de células normais é promovida por proto-oncogenes, que são promotores de crescimento, e contrabalanceada por genes supressores de tumor, responsáveis pela restrição do crescimento. Mutações que potencializam as atividades dos proto-oncogenes convertem-nos em oncogenes, induzindo um crescimento celular anormal. Inversamente, mutações genéticas que inativam genes supressores liberam as células da repressão imposta por estes genes, permitindo o crescimento irrestrito de células cancerosas. A progressão de muitos tumores para a total malignidade requer ambos os tipos de alterações no genoma (Weinberg, 1991).

Alterações no DNA podem ocorrer em todas as fases do ciclo celular, sendo geralmente causadas por erros na replicação do DNA ou lesões provocadas por agentes mutagênicos físicos ou químicos. Para corrigir esses erros, a célula possui uma complexa maquinaria de reparo do DNA, que trabalha em conjunto com enzimas responsáveis pela replicação do DNA, desta forma, mutações que acometam genes envolvidos nesse processo, os chamados genes de reparo, podem levar ao acúmulo de danos no DNA, característica fundamental da gênese e progressão tumoral (Reddy and Vasquez, 2005).

O câncer é um dos problemas mais comuns, freqüentemente relatados na medicina clínica; dados estatísticos e epidemiológicos mostram que o câncer atinge mais de um terço da população mundial, levando à morte em mais de 20% dos casos. Só no ano de 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes e, deste total de óbitos, 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Estima-se que no ano de 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2009 apontam a ocorrência de aproximadamente 470.000 casos novos de câncer, sendo esperados 230.000 casos para o sexo masculino e 235.000 casos para o sexo feminino (Ministério da Saúde – INCA, 2007).

1 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO

Os tumores do sistema nervoso 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, os tumores do sistema nervoso 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 and Kleihues, 2005).

Os tumores primários do sistema nervoso representam cerca de 2% de todos os cânceres, mas é necessário levar em conta as elevadas taxas de morbidade e mortalidade apresentadas por eles. São estimados a cada ano 43.800 novos casos de tumores cerebrais benignos e malignos nos Estados Unidos, incluindo 3410 casos em crianças e adolescentes, e destes pacientes, aproximadamente 12.760 vão a óbito (Buckner et al, 2007). No Brasil, os dados epidemiológicos mais recentes datam de 2003, e de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, os tumores de sistema nervoso correspondem a aproximadamente 2,5% do total de casos de câncer ocorridos no país e as taxas de mortalidade variam entre 0,31 e 4,22 a cada 100.000 homens e entre as mulheres de 0,41 a 3,19 a cada 100.000, sendo que as regiões sul e sudeste agrupam os maiores índices (INCA, 2003).

A predisposição genética para os tumores do sistema nervoso parece ser relativamente incomum, embora alguns tipos possam ser herdados como sintomas de algumas doenças hereditárias. Especificamente, mutações na linhagem germinativa de genes supressores tumorais que caracterizam importantes síndromes genéticas apresentam um aumento da incidência de desenvolvimento de tumores cerebrais, como por exemplo, neurofibromatose tipo 1 (mutação em NF1), síndrome de Turcot (mutação em APC), síndrome de Gorlin (mutação em PTCH) e síndrome de Li-Fraumeni (mutação em TP53 ou CHEK2) (Buckner et al, 2007).

A identificação dos fatores de risco para os tumores de sistema nervoso é um processo complicado, devido à heterogeneidade desses tumores. Um importante fator de risco não herdado é a exposição à radiação ionizante, assim como a dieta, traumas na cabeça, consumo alcoólico materno, cigarro, exposição a agentes químicos, infecção por vírus, uso de drogas e outros medicamentos (Prados et al, 1998).

A transformação maligna das células cerebrais é um processo complexo e ainda incompletamente entendido, compreendendo múltiplos passos de inativação de genes

supressores tumorais e ativação e hiperexpressão de oncogenes que, juntos, provocam alterações na progressão do ciclo celular, anormalidades nas cascatas de transdução de sinal e no processo de angiogênese.

Devido à alta complexidade dos tumores do sistema nervoso, não existem métodos totalmente eficazes para a classificação do grau de malignidade desses tumores; dessa forma, a caracterização histológica de um tumor cerebral é realizada considerando-se a provável célula da qual ele foi originado, seu grau de malignidade e a extensão de sua invasão (Franks e Teich, 1990). Atualmente, com o auxílio de estudos citogenéticos e o avanço das técnicas de biologia molecular, foram incorporadas à classificação tumoral alterações em cromossomos e genes específicos.

Tumores extra-axiais do sistema nervoso são tumores de localização extra-cerebral. Eles são frequentemente benignos e sua localização pode afetar o tratamento e o prognóstico do paciente. Meningiomas, schwannomas, metástases, cistos epidermóides e dermóides representam a vasta maioria dos tumores extra-axiais do cérebro (Drevelegas, 2005).

2 MENINGIOMAS

Meningiomas constituem o segundo tipo de tumor primário cerebral mais comum, originando-se nas meninges que revestem o cérebro e o cordão espinhal. Eles somam cerca de 25% de todos os tumores cerebrais primários, com uma incidência anual estimada em 6 novos casos a cada 100.000 indivíduos (Wrobel et al, 2005). Entretanto, a verdadeira incidência é provavelmente muito mais alta, pois muitos meningiomas benignos não produzem sintomas. Em estudos baseados em autópsias, 2.3% dos indivíduos apresentaram meningiomas assintomáticos que não haviam sido diagnosticados, sugerindo que este tipo de tumor seja, muito mais comum do que é detectado clinicamente (Lusis and Gutmann, 2004).

Segundo a classificação dos tumores de sistema nervoso estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (WHO), os meningiomas apresentam três graus de malignidade (Tabela 1): meningiomas benignos (Grau I), meningiomas atípicos (Grau II) e meningiomas anaplásicos (Grau III). Cerca de 90% de todos os meningiomas são benignos; os meningiomas atípicos representam de 6 a 8% dos casos e são definidos histologicamente por um aumento de atividade mitótica e apresentam um alto risco de recorrência. Aproximadamente 2 a 3% dos meningiomas apresentam características de malignidade, como alta atividade mitótica e/ou aparência histológica similar a sarcomas, carcinomas ou melanomas, estão associados a um prognóstico muito ruim e a um tempo de sobrevivência média menor que dois anos após o diagnóstico (Wrobel et al, 2005).

Meningiomas apresentam uma incidência crescente, correspondente à idade, sendo mais comum a ocorrência entre a sexta e sétima década de vida. Entre adultos, existe uma razão de incidência de 3:2 entre os sexos feminino e masculino, sendo que em mulheres, a incidência anual é estimada em 2-7 casos em cada 100.000 indivíduos, e entre os homens, a incidência é de 1-5 casos em 100.000. Meningiomas atípicos e anaplásicos são mais comuns entre homens, fato que pode estar relacionado aos altos índices de proliferação observados em meningiomas de pacientes do sexo masculino. Em crianças e adolescentes, meningiomas são igualmente raros em ambos os sexos, porém apresentam uma tendência ao desenvolvimento de subtipos mais agressivos, geralmente associados a síndromes hereditárias, como Neurofibromatose tipo 2, síndrome de Gorlin e síndrome de Cowden (Marosi et al, 2008).

Tabela 1: Classificação dos meningiomas (WHO, 2002).

Baixo risco de recorrência e/ou agressividade		Alto risco de recorrência e/ou agressividade	
Meningioma Meningotelial	Grau I	Meningioma Atípico	Grau II
Meningioma Fibroso/Fibroblástico	Grau I	Meningioma Células Claras (intracranial)	Grau II
Meningioma Transicional (misto)	Grau I	Meningioma Cordóide	Grau II
Meningioma Psamomatoso	Grau I	Meningioma Rabdóide	Grau III
Meningioma Angiomatoso	Grau I	Meningioma Papilar	Grau III
Meningioma Microcístico	Grau I	Meningioma Anaplásico	Grau III
Meningioma Secretório	Grau I		
Meningioma Rico - Linfoplasmócitos	Grau I		
Meningioma Metaplásico	Grau I		

De acordo com Kleihues, et al (2002).

O perfil genético molecular dos meningiomas determina que a alteração encontrada com maior frequência seja a perda de heterozigose da região 22q (40 a 70% dos casos), que está associada à inativação do gene NF2 em cerca de 50% dos meningiomas. Este gene encontra-se mutado em 63% dos meningiomas esporádicos. É sugerido que exista um outro gene supressor tumoral além do NF2 neste locus do cromossomo 22, mas ainda não há comprovação. O gene DAL-1 (18p11), que é homólogo ao NF2, também apresenta ausência de expressão em 73% dos meningiomas esporádicos. Ambos, mutações em NF2 e perda de expressão de DAL-1 são considerados eventos iniciais na tumorigênese dos meningiomas, pois a incidência dessas alterações não é significativamente diferente nos três graus histológicos (Bello et al, 2004; Liu et al, 2005).

Deleções em 1p constituem a segunda anormalidade cromossômica mais comum em meningiomas e sua frequência aumenta de acordo com o aumento do grau de malignidade, sugerindo que algum gene supressor tumoral importante esteja envolvido na deleção. Importantes candidatos como INK2C e o TP73, localizados em 1p vêm sendo estudados, porém ainda sem comprovações de que estejam relacionados aos meningiomas (Bostrom et al, 2001; Nozaki et al, 2001).

Outras aberrações cromossômicas envolvidas na progressão de meningiomas incluem perdas de 6q, 9p, 10q, 14q e 18q e ganhos de 1q, 9q, 12q 15q e 20q. Inativação de p14^{ARF}, CDKN2B e CDKN2A são encontradas com frequência em meningiomas atípicos e anaplásicos, indicando que o *checkpoint* da fase de transição G1/S é um alvo importante na progressão de meningiomas (Liu et al, 2005). Meningiomas também são

componentes de uma síndrome de câncer hereditária, neoplasia endócrina múltipla tipo 1. Aproximadamente 8% dos pacientes com esta neoplasia desenvolvem meningiomas; assim, estudos relacionados a mutações e alterações na expressão do gene MEN1 precisam ser realizados (Lusis and Gutmann, 2004).

A metilação aberrante da região promotora é um importante processo que contribui para a progressão maligna de tumores do sistema nervoso. Entretanto, informações sobre o padrão de metilação em meningiomas são muito escassas. Recentes estudos apresentaram metilação de p14^{ARF} e RASSF1 em 5 de 19 e 2 de 12 meningiomas, respectivamente (Horiguchi et al, 2003; Yin et al, 2002); também foram estabelecidas relações entre a hipermetilação de TP73 e deleções de 1p em meningiomas. Porém, não foi observada nenhuma relação entre a hipermetilação de TP73 e o grau histológico do tumor, sugerindo que alterações epigenéticas em TP73 ocorrem durante um processo de múltiplos passos do desenvolvimento tumoral, e podem caracterizar um subgrupo de meningiomas (Lomas et al, 2004). Os genes supressores tumorais p15^{INK4B} e p16^{INK4A}, reguladores da fase G1/S do ciclo celular também são observados hipermetilados em poucos meningiomas. Entretanto, uma alta porcentagem do gene p14ARF (20 a 50%) é encontrado metilado em meningiomas de graus II e III, sendo a metilação reconhecida como um importante mecanismo responsável pelo acúmulo de proteínas p53 nesses tumores (Amatya et al, 2004).

3 SCHWANOMAS

Schwanomas (neurilemomas ou neurinomas) são tumores benignos, compostos inteiramente por células de Schwann. Representam o segundo tipo de tumor extra-axial mais comum, constituindo 5 a 10% de todas as neoplasias intracranianas e aproximadamente 29% dos tumores espinhais. Em relação à sua aparência macroscópica, schwanomas são tipicamente bem delimitados, apresentando freqüentemente uma configuração globular. Em pequenas lesões, o nervo pode ser detectado no tumor, mas em tumores maiores essa relação entre nervo e tumor torna-se obscura. Esse tipo de tumor pode aparecer em todas as idades, mas com maior freqüência entre 40 e 60 anos; existe uma tendência maior para a ocorrência no sexo feminino numa razão de 2:1 em relação ao sexo masculino (Drevelegas, 2005; Domanski et al, 2006).

A presença de schwanoma é uma característica muito comum em pacientes que apresentam neurofibromatose tipo 2, uma doença hereditária dominante com incidência de um em cada 33 a 40 mil indivíduos (Ikeda et al, 2005). Recentemente foi descoberta uma nova síndrome molecular e clinicamente distinta de NF2, na qual é observado o surgimento de schwanomas, a Schwanomatose. Pacientes com Schwanomatose apresentam múltiplos schwanomas. Existem outras doenças genéticas raras nas quais múltiplos schwanomas podem estar presentes, como no Complexo Carney. Com base nessas informações, os schwanomas são classificados em Schwanomas esporádicos – que ocorrem uma única vez no indivíduo, ou schwanomas que ocorrem múltiplas vezes em um mesmo indivíduo (Kirschner et al, 2000; Hanemann and Evans, 2006).

Estudos genéticos, cromossômicos e moleculares proporcionaram algumas informações sobre alterações relacionadas ao desenvolvimento de schwanomas. Schwanomas podem ser causados pela perda de função do gene NF2, localizado no cromossomo 22, responsável pela codificação de uma proteína cujo produto, chamado Merlin, é necessário às células de Schwann. Dentre os mecanismos que inativam esse gene, os mais freqüentes são mutações que truncam o primeiro alelo e perda do locus NF2 do segundo alelo, ou mais comumente, perda do cromossomo 22 inteiro. O segundo alelo também pode ser perdido por recombinação mitótica, deleção parcial ou silenciado por metilação. Existem fortes evidências de que todos os schwanomas podem ser causados pela perda de função do gene NF2 (Warren et al, 2003). Citogeneticamente, este tumor apresenta poucas alterações; as mais freqüentes são:

deleção total ou parcial do cromossomo 22, perda do cromossomo sexual, trissomia do cromossomo 7 e monossomias do 15 e 17. Análises moleculares indicam perda de função do gene supressor tumoral NF2 como a alteração mais freqüente (Gorunova et al, 2001).

A metilação de elementos regulatórios do gene NF2 e outros genes em schwannomas está sendo identificada por alguns pesquisadores, sugerindo que mecanismos epigenéticos podem contribuir para o desenvolvimento desse tipo de tumor. Genes como ER e THBS1 e genes relacionados à regulação do ciclo celular, como p16, estão hipermetilados em cerca de 10% dos schwannomas. O gene TIMP3 está metilado em 17% dos casos e outros genes como Caspase 8 e RASSF1A também se encontram hipermetilados em schwannomas (Bello et al, 2007).

4 METÁSTASES

As metástases são as características mais temidas, mais letais e menos efetivamente tratadas que um câncer pode apresentar, sendo também muito complexas de serem estudadas de forma detalhada. Estudos iniciados em meados dos anos 50 e que se estendem até os dias de hoje tem revelado que o processo de formação metastática depende de uma seqüência de processos uniformes (Stafford et al, 2008). O primeiro passo requerido para a formação de metástases é que as células do tumor primário se desprendam do estroma tumoral e migrem através do sistema vascular. Essas células precisam sobreviver ao transporte e a bloqueios como o de reconhecimento de células estranhas que muitos tecidos apresentam (Al Mehdí et al, 2000). Nas veias, essas células podem atravessar a membrana basal e adentrar um cenário totalmente desconhecido. Eventualmente, essas células podem deixar as veias, ficando protegidas de ataques tecido-específicos (Craig & Loberg, 2006; Ruffini et al, 2007). Finalmente, as células que completam todos os passos da cascata de proliferação metastática, colonizam tecidos ectópicos. Nos últimos anos, este último passo da cascata metastática, a colonização, tem se tornado o foco das pesquisas, pelo fato de oferecer a possibilidade de cultivar as células metastáticas em uma fase latente em um sítio secundário e então transformar o local em uma área potencial para o desenvolvimento de alvos terapêuticos (Welch et al, 2008; Stafford et al, 2008).

Tumores cerebrais malignos constituem um grupo heterogêneo de doenças, cada qual com sua biologia, prognóstico e tratamento específicos. Os tipos tumorais malignos mais comuns são as metástases e os gliomas malignos. A Sociedade Americana de Câncer estimou que mais de 100 mil pessoas morrem por ano vítimas de metástases intracranianas sintomáticas (Jemal et al, 2007).

Metástases cerebrais são complicações muito comuns em pacientes portadores de cânceres sistêmicos. Os tipos tumorais com maior probabilidade de se expandir para regiões cerebrais são pulmão, mama e melanoma. A sobrevivência média para pacientes com metástase cerebral é de menos de um ano (Chen, 2007).

As metástases cerebrais são os tumores intracranianos mais comuns em adultos, sendo dez vezes mais comuns do que os tumores primários. Avanços significativos vêm sendo obtidos no diagnóstico e tratamento dessas lesões, melhorando o tempo de sobrevivência e o controle dos sintomas. Metástases cerebrais ocorrem em cerca de 20 a 40% dos adultos que apresentam algum tipo de câncer. Dezoito por cento das lesões

ocorrem no hemisfério cerebral, 15% no cerebelo e 5% no tronco cerebral. Aproximadamente 80% dos pacientes portadores de metástases têm um histórico de câncer sistêmico e 70% apresentam múltiplas metástases cerebrais (Patchell et al, 1990; Buckner et al, 2007).

As metástases cerebrais mais freqüentes estão localizadas no compartimento supratentorial, podendo ser calvariais, durais ou leptomeningiais, e constituem a segunda forma de neoplasia extra-axial mais comum. Metástase calvarial pode aparecer em muitos pacientes com tumores malignos; carcinomas de pulmão, mama, fígado e próstata são as neoplasias primárias mais freqüentes das quais as metástases são derivadas. As metástases da região dural são derivadas de tumores de mama, pulmão, próstata, melanoma e neuroblastoma e menos freqüentemente de linfomas e leucemias. A metástase leptomeningeal ou carcinomatose meningeal é geralmente resultado da progressão de tumores do próprio sistema nervoso, como astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, ependimoma e meduloblastoma (Drevelegas, 2005).

A formação de metástases é um processo complexo e, para que ela se forme, a célula precisa adquirir várias características como mobilidade, invasão, angiogênese, habilidade de se agregar e impedir que ocorra resposta imune sobre si. Sendo assim, o mecanismo metastático provavelmente é constituído de um processo de múltiplos passos que combinam alterações genéticas e epigenéticas responsáveis por ativar ou inativar genes relacionados à progressão tumoral. O aumento da dosagem gênica através de ganho de cópias extras ou amplificação de oncogenes, assim como a inativação de genes supressores tumorais por deleções ou hipermetilação são mecanismos genéticos comuns que estão envolvidos no desenvolvimento de tumores sólidos, pelo fato de provocarem aumento da divisão celular ou inibição da morte celular ou ainda o bloqueio do ciclo celular (Franco-Hernandez et al, 2008).

É proposto que um aumento do potencial metastático em tumores primários está associado com a hiperexpressão de importantes genes como EGFR, CD44RI e c-erbB2, principalmente em lesões derivadas do pulmão, colon e mama. A perda de expressão de genes como DCC, KAI-1 e BAI-1 parece estar associada à progressão de cânceres do endométrio, próstata e pulmão. Finalmente, a metilação de genes reguladores do ciclo celular tem sido encontrada com freqüência em metástases cerebrais de tumores sólidos, envolvendo genes como p53, p73, p16, MGMT entre outros, indicando que alterações epigenéticas representam um outro processo multifatorial no desenvolvimento, metástase e invasão cerebral (Franco-Hernandez et al, 2007).

II. HIPERMETILAÇÃO DO DNA
EM TUMORES EXTRA-AXIAIS DO
SISTEMA NERVOSO

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido primeiramente por Conrad Waddington na década de 1940 para descrever “as interações dos genes com seu ambiente e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo”. Estudos primordiais em epigenética descreveram a heterocromatina como regiões do genoma que apresentam baixa densidade gênica. Subsequentemente observou-se que heterocromatina e eucromatina estão associadas com o padrão de metilação do DNA e modificação das histonas, ambas relacionadas à atividade gênica, levando à idéia de que um “código epigenético” determina o estado da cromatina e conseqüentemente à expressão dos genes (Murrell et al, 2005).

A herança da informação baseada nos níveis de expressão gênica é conhecida como epigenética, como oposto à genética, a qual se refere às informações transmitidas na base da seqüência gênica (Esteller and Herman, 2002). A palavra epigenética literalmente significa “mudanças em adição à seqüência genética”. O termo foi desenvolvido para incluir alguns processos que alteram a atividade de determinado gene sem mudar a seqüência do DNA, e este mecanismo leva a modificações que podem ser transmitidas para as células filhas através das divisões mitóticas e meióticas, além de ser um processo que pode ser reversível (Egger et al, 2004; Weinhold, 2006). Processos epigenéticos podem contribuir para a estabilidade da estrutura da cromatina, integridade do genoma, modulação da expressão de genes tecido-específicos, desenvolvimento embrionário, coordenação da replicação, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X em fêmeas (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). Recentes estudos demonstraram que a epigenética também desempenha papel importante em eventos como a biologia do câncer, infecções virais, atividade de elementos transponíveis, terapia gênica somática, desenvolvimento de anormalidades e saúde mental (Das and Singal, 2004).

Muitos tipos de alterações epigenéticas têm sido identificados. As alterações mais importantes são a metilação reversível do DNA e a acetilação e metilação das histonas; outros processos menos freqüentes incluem fosforilação, ubiquitinação e sumolinação. Modificações nas histonas são mecanismos epigenéticos universais e evolucionariamente conservados da regulação da transcrição em células eucarióticas; a metilação do DNA ocorre em células procarióticas e eucarióticas (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

A estrutura da cromatina que compõe o nucleossomo é um regulador epigenético de extrema importância para a expressão de determinados genes e ela está intimamente ligada ao processo de metilação do DNA e acetilação das histonas. A estrutura da cromatina aberta (eucromatina) pode levar à expressão gênica, em parte, devido ao aumento da acessibilidade dos promotores gênicos à maquinaria transcricional. Em contraste, a cromatina fechada (heterocromatina) está associada frequentemente com a repressão transcricional (Sutherland and Costa, 2003).

Organismos multicelulares necessitam de mecanismos eficientes que permitam padrões herdáveis de silenciamento gênico. Mutações em genes que afetam o perfil epigenético global podem levar ao aparecimento de doenças que podem ser herdadas ou adquiridas de maneira somática (Egger et al, 2004). Eventos epigenéticos participam também do desenvolvimento e progressão do câncer. Mutações ocorridas em oncogenes resultam frequentemente em ganho de função; mutações ou deleções associadas a genes supressores tumorais causam a perda ou inativação da repressão tumoral. Perda de função pode ocorrer também através de mudanças epigenéticas como a metilação do DNA (Baylin, 2005). Mudanças epigenéticas em células precursoras pluripotentes podem explicar muitas das propriedades heterogêneas que comumente estão associadas ao crescimento celular, invasão, metástase e resistência às terapias (Feinberg et al, 2006).

A relação entre estado epigenético, ambiente e câncer é sustentada por eventos de hipo e hipermetilação do DNA, que ocorrem ao longo do tempo, afetando seqüências repetitivas como elementos transponíveis. Esses eventos são observados principalmente em genes específicos como onco-supressores, os quais podem representar fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer (Scarano et al, 2005).

1.2 METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA, um importante mecanismo de modificação encontrado ao longo do genoma, ocorre em quase todos os organismos vivos, de bactérias a plantas e fungos, de invertebrados a vertebrados. Contudo, sua abundância e função variam entre esses genomas, desde o genoma demetilado de *Caenorhabditis elegans* até o DNA fortemente metilado de muitos vertebrados. Os diferentes padrões da metilação do DNA encontrados entre as espécies revelam as diferentes funções que estas modificações no DNA exercem em seus genomas. Em organismos eucariotos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em dinucleotídeos CpG e está associada com o estado de repressão da cromatina e a inibição da expressão gênica. Já em plantas e fungos, a metilação pode ocorrer em diferentes sítios, como CpNpG. Nos procariotos, a metilação do DNA ocorre tanto em bases citosina como adenina, fazendo parte de importantes sistemas de repressão (Scarano et al, 2005; Klose and Bird, 2006).

Levando-se em consideração um nível evolutivo, é proposto que a metilação do DNA está envolvida em sistemas de repressão gênica nos genomas de organismos mais complexos. A metilação do DNA pode atuar, por exemplo, como um mecanismo de repressão contra a expressão de transposons endógenos, que podem estar perturbando a organização e integridade do genoma, provocando o rompimento de genes funcionais ou formando rearranjos cromossômicos. Em mamíferos, a metilação do DNA é um dos principais atuantes em processos de silenciamentos gênicos longos, estando envolvida em importantes fenômenos biológicos, como a inativação do cromossomo X e o imprinting genômico (Bird, 1995; Yoder et al, 1997; Li, 2002).

No genoma de mamíferos, a metilação ocorre por adição covalente de um grupo metil ao resíduo do carbono na posição 5' da citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), resultando na formação de um composto chamando 5-metilcitosina (m^5C), que é designado como a quinta base do DNA. Esse grupo metil se projeta no sulco maior do DNA, inibindo efetivamente a transcrição da fita. Em mamíferos, a 5-metilcitosina é encontrada em cerca de 4% do genoma, principalmente nos sítios CpG (Baylin, 2005; Esteller, 2005b; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

No DNA genômico de células de mamíferos, cerca de 60 a 90% dos resíduos C localizados em dinucleotídeos CpG estão metilados. Em eucariotos superiores, os pares CpG são importantes *hotspots* mutacionais devido à sua deaminação espontânea de m^5C para timina (T). A transição $C \rightarrow T$ tem resultado na eliminação progressiva de sítios

CpG metilados em seqüências codificantes durante a evolução (Bird, 2002; Nakao, 2001). Diferindo do restante do genoma, pequenas regiões de DNA chamadas “ilhas CpG”, ricas em dinucleotídeos CpG (60 – 70%), apresentam propriedades distintas, tais como sua localização na região promotora de vários genes, podendo se estender até o primeiro éxon, com cerca de 0,5 a 5Kb de comprimento e ocorrendo em média a cada 100 – 200Kb, com uma razão de CpG para GpC de no mínimo 0,6 e frequentemente não estão metiladas. Cerca de metade de todos os genes humanos apresentam ilhas CpG, que estão presentes tanto em genes *housekeeping* como em genes com padrão de expressão tecido-específicos (Das and Singal, 2004; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Em células normais, as ilhas CpG estão metiladas em 4 casos: em genes imprintados, em genes de um dos cromossomos X femininos, em genes específicos da linhagem germinativa e em genes tecido-específicos. O *imprinting* genômico ou parental é um processo que envolve o silenciamento precoce, através da hipermetilação do DNA, de um dos alelos de um gene da linhagem germinativa masculina ou feminina, para que este mantenha uma expressão monoalélica. Um fenômeno similar de compensação de dose gênica que também é promovido pela metilação do DNA é a inativação de um dos cromossomos X em mulheres, processo que deve ocorrer devido ao nível duplicado de produtos gênicos ligados ao X no sexo feminino, comparados ao sexo masculino, e que podem levar a um desenvolvimento anormal do indivíduo. Embora a metilação do DNA não ocorra frequentemente em sistemas que regulam a expressão normal de genes, ela pode atuar na regulação de alguns genes que tem expressão restrita à linhagem germinativa masculina ou feminina e não são expressos em tecido adulto. Finalmente, a metilação tem sido encontrada como um mecanismo de silenciamento de genes tecido-específicos em células onde eles não devem ser expressos (Feinberg et al, 2002; Esteller, 2005; Scarano et al, 2005).

A metilação do DNA ajuda a manter o silenciamento transcricional em regiões não expressas ou não codificantes do genoma. Por exemplo, a heterocromatina pericentromérica, que está transcricionalmente inativa, apresenta-se muito condensada. A hipermetilação garante que este DNA seja replicado tardiamente, permanecendo transcricionalmente quiescente e assim, reprima a expressão de seqüências virais potencialmente nocivas ou elementos transponíveis que podem se integrar a sítios contendo seqüências altamente repetitivas. Em contraste, esses sítios não estão metilados em regiões promotoras de eucromatina, independentemente do estado

transcricional do gene (Baylin, 2005; Bird, 2002; Herman and Baylin, 2003; Jones and Baylin, 2002).

Historicamente, importantes hipóteses foram propostas para explicar o mecanismo pelo qual a metilação inibe a expressão gênica. A primeira possibilidade é que a metilação do DNA inibe a ligação de fatores de transcrição seqüência-específicos aos seus sítios de ligação que contém CpG. Neste contexto, uma proteína com afinidade por CpG não metilado está associada com regiões transcritas do genoma. Um modelo alternativo propõe que a metilação pode ter conseqüências diretas no posicionamento do nucleossomo, reunindo, por exemplo, uma série de estruturas nucleossômicas especializadas em DNA metilado, que silenciam a transcrição mais efetivamente do que a cromatina convencional. A terceira possibilidade é que a metilação leva ao recrutamento de fatores especializados que reconhecem seletivamente DNA metilado, impedindo a ligação de outros fatores nucleares que afetam diretamente a repressão transcricional (Esteller, 2005b).

O equilíbrio epigenético perfeito descrito para as células normais é drasticamente transformado em células do câncer. As aberrações epigenéticas observadas podem ser agrupadas dentro de duas categorias: o silenciamento transcricional dos genes supressores tumorais através da hipermetilação de ilhas CpG da região promotora e a hipometilação genômica global.

A dinâmica natural do processo de metilação da citosina torna-se evidente durante a tumorigênese, ou seja, a metilação sofre um processo de declínio ao longo do genoma, mas as ilhas CpG de regiões promotoras dos genes supressores tumorais adquirem metilação, levando ao silenciamento gênico e conseqüentemente à progressão tumoral (Fazzari and Grealley, 2004).

As ilhas CpG que estão localizadas na região promotora de genes supressores tumorais, apresentam-se normalmente demetiladas em células normais, porém, podem estar densamente hipermetiladas em células do câncer, promovendo o silenciamento gênico. Contudo, nem todos os genes estão metilados em todos os tipos de tumores, mas é observada uma especificidade aparente para cada tecido. Baseados nessa observação, muitos grupos de pesquisa têm mapeado um grande número de ilhas CpG de genes que estão hipermetilados em câncer, na tentativa de estabelecer um perfil único de hipermetilação que defina cada neoplasia. Somente aqueles marcadores que estão sempre demetilados em tecido normal podem ser incluídos. Se combinados três ou quatro desses marcadores, pode-se alcançar 100% de informação para diferenciar

determinados loci metilados nos diferentes tipos tumorais (Paz et al, 2003; Fraga et al, 2004).

1.3 DNA METILTRANSFERASES

A metilação do DNA é estabelecida através da atividade de enzimas específicas, as DNA metiltransferases (DNMTs), as quais são responsáveis pela transferência do grupo metil para a citosina dos dinucleotídeos CpG (Scarano et al, 2005). A atividade das DNA metiltransferases é importante para o início do remodelamento da cromatina e regulação da expressão gênica. Em mamíferos, as DNMTs incluem DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, que são responsáveis pela aquisição do padrão de metilação durante a gametogênese, embriogênese e desenvolvimento de tecido somático. As DNMTs utilizam S-adenosil-L-metionina como doador dos grupos metil (Figura 1) (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

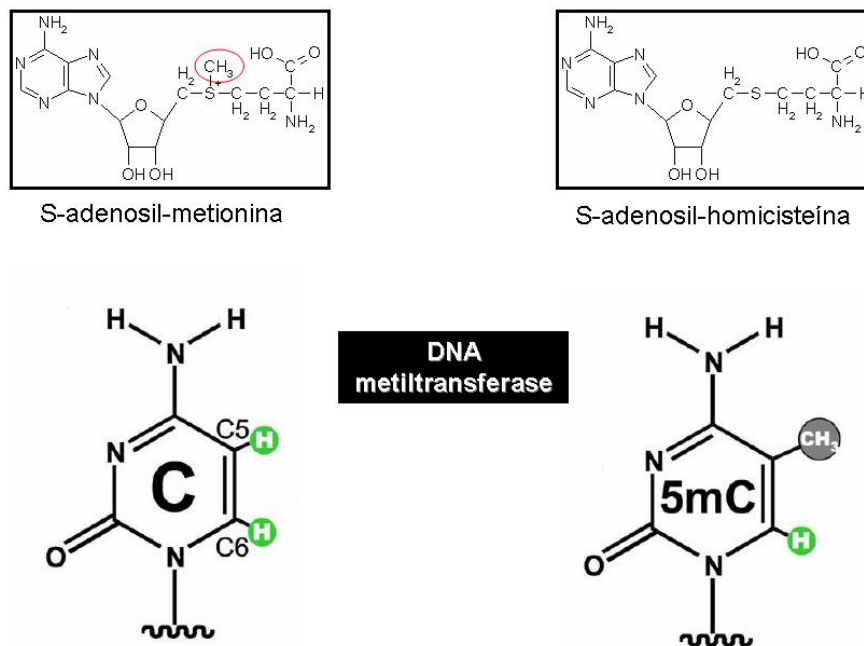


Figura 1: Mecanismo de transferência de um grupo metil do composto S-adenosil-metionina para o carbono 5 da citosina em dinucleotídeos CpG. A reação é catalizada por uma enzima DNA metiltransferase e o composto formado é chamado 5-metilcitosina.

As enzimas DNA metiltransferases de mamíferos estão agrupadas em duas classes baseadas em suas afinidades pelo DNA substrato. As DNA metiltransferases *de novo* (DNMTs 3A e 3B) são responsáveis por introduzir o radical metil em sítios CpG que nunca foram metilados, enquanto DNMT1 mantém o padrão de metilação nas novas fitas de DNA que são formadas durante a replicação. Uma quarta DNA metiltransferase,

a DNMT2, apresenta uma atividade fraca *in vitro* e sua deleção em células tronco embrionárias não provoca nenhum efeito no padrão de metilação global, sugerindo que esta enzima tem pouco envolvimento na aquisição do padrão de metilação. A DNMT3L está fisicamente associada com as DNMTs 3A e 3B e é responsável por modular a atividade catalítica de ambas. Quando combinadas, essas DNMTs *de novo* e de manutenção parecem constituir um conjunto de componentes enzimáticos do sistema de metilação do DNA em mamíferos (Klose and Bird, 2006).

A primeira DNA metiltransferase identificada foi revelada por purificação e clonagem. Esta enzima, hoje nomeada DNMT1 contém 1620 aa e exibe de 5 a 30 vezes maior preferência por substratos hemimetilados. DNMT1 é a principal enzima responsável pela manutenção do padrão metilado do DNA durante a replicação. No decorrer do processo, aproximadamente 40 milhões de nucleotídeos m⁵CpG são convertidos ao estado hemimetilado e serão sintetizados em uma nova fita de DNA. Estes sítios CpG hemimetilados devem ser precisamente metilados para manter o padrão original de metilação do DNA. As DNMT1 estão localizadas em uma forquilha de replicação e metilam novamente a fita de DNA biosintetizada após o ciclo de replicação (Esteller, 2005b; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). Entretanto o fato da DNMT1 ter afinidade por DNA hemimetilado não é evidência direta de que esta enzima não esteja envolvida em certos tipos de metilação *de novo*, como por exemplo, na maioria da atividade de metilação *de novo* em embriões lisados.

As DNMT3A e DNMT3B exibem um alto grau de homologia em suas estruturas primárias, mas elas são codificadas por diferentes genes mapeados nos cromossomos 2p23 e 20q11, respectivamente. Estas DNA metiltransferases metilam dinucleotídeos CpG sem preferência por DNA hemimetilado, e são responsáveis pela metilação *de novo* do DNA, particularmente durante a embriogênese. O nível de expressão da DNMT3B é fortemente aumentado em várias linhagens de células tumorais, indicando que a DNMT3B tem atuação importante na tumorigênese (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Kelly e Trasler (2004) observaram que a DNMT3A é responsável pela aquisição do padrão de metilação *de novo* durante o desenvolvimento pré-natal das células germinativas de machos, e que a DNMT3B está envolvida na manutenção da metilação *de novo*, nos estágios iniciais de mitose, em células germinativas de machos. Os diferentes papéis das DNMT3A e 3B na gametogênese de machos sugerem que ambas as enzimas são essenciais para esse processo e não podem ser substituídas.

A DNMT3A exibe baixos níveis de atividade enzimática quando comparada com a DNMT1; isto pode indicar que a DNMT3A necessita de uma pequena proteína ou um co-fator para alcançar sua atividade ótima. DNMT3A exibe uma preferência pela metilação de sítios que são flanqueados por pirimidinas. Embora as DNMT3A sejam altamente específicas pela metilação de CpG, estas enzimas também são capazes de metilar citosinas de dinucleotídeos CpA e CpT, porém a função dessas modificações no DNA ainda é desconhecida. DNMT3B é especializada na metilação de dinucleotídeos CpG em seqüências repetitivas de regiões satélites dos cromossomos. Mutações no gene DNMT3B estão associadas com desordens de imunodeficiência humana e instabilidade centromérica (Bestor, 2000).

A DNMT3L (DNA 5-metiltransferase ligada à citosina) atua em cooperação com as outras DNA metiltransferases *de novo*. Seu gene está localizado no cromossomo 21q22 e é expresso principalmente na linhagem germinativa pós-natal de fêmeas durante a aquisição do padrão de metilação do DNA. DNMT3L interage com enzimas histonas desacetilases (HDACs), indicando que sua proteína pode estar envolvida no processo de desacetilação de histonas, remodelamento da cromatina e conseqüente repressão transcricional (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

A DNMT2 é a menor DNA metiltransferase observada em mamíferos. Ela é composta apenas por um domínio C-terminal e não possui uma região regulatória N-terminal. O domínio catalítico da DNMT2 não exibe significativa atividade metiltransferase *de novo* ou de manutenção em células tronco-embriônicas ou em tecido somático adulto. A estrutura desta DNMT sugere que ela pode estar envolvida com o reconhecimento de danos no DNA, com o processo de recombinação do DNA e reparo de mutações (Pradhan and Esteve, 2003).

1.4 ESTRUTURA DA CROMATINA

O genoma humano contém mais de 23.000 genes que devem ser expressos em células específicas e em tempos precisos. As células administram a expressão de genes através do empacotamento do DNA ao redor dos octâmeros de histonas que formam os nucleossomos. Esses nucleossomos são organizados na cromatina. Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão gênica de forma que os genes são inativados quando a cromatina é condensada e são expressos quando a cromatina está aberta. Esse dinamismo do estado da cromatina é controlado por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e modificações histônicas (Rodenhiser and Mann, 2006).

A informação gerada pelas ilhas CpG hipermetiladas tem significado funcional somente no contexto da cromatina. Desde sua descoberta, a metilação do DNA tem sido associada com o estado transcricional inativo da cromatina; contudo, os mecanismos pelos quais a metilação do DNA atua dentro da cromatina inativa estão sendo desvendados atualmente (Esteller, 2005a). Embora a metilação controle a atividade gênica, somente esse processo é insuficiente para reprimir a transcrição. A estrutura da cromatina também contribui para determinar se os genes serão transcritos ou reprimidos.

A estrutura da cromatina não metilada, em que os genes são transcionalmente ativos, difere da estrutura metilada dos genes silenciados. Tanto a estrutura do nucleossomo quanto a acetilação das histonas afetam a estrutura da cromatina e auxiliam na regulação da transcrição. Em ilhas CpG que não estão metiladas, o nucleossomo apresenta uma configuração mais aberta do que nas metiladas, permitindo acesso a fatores que favorecem a transcrição. Quando as ilhas CpG estão hipermetiladas, como na heterocromatina, o nucleossomo torna-se fortemente compactado, inibindo o acesso de proteínas regulatórias que promovem a transcrição (Fuks et al, 2001; Baylin, 2005).

As DNMTs atuam na regulação do silenciamento gênico, unindo a metilação da região promotora do DNA, o recrutamento de histonas desacetilases (HDACs) e outras proteínas ligadas à cromatina por sítios promotores, para manter a desacetilação das histonas. O estado de acetilação das histonas é importante para controlar a estrutura da cromatina e regular a transcrição gênica.

Primeiramente, proteínas ligantes ao grupo metil CpG (MeCPs) são recrutadas e reconhecem as ilhas CpG metiladas, pois apresentam um domínio de ligação aos sítios metil CpG (MDB) que tem afinidade por DNA metilado. MeCP1 e MeCP2 foram as primeiras proteínas dessa classe descritas. Enquanto MeCP1 foi identificada como um amplo complexo multiproteico, MeCP2 é um único polipeptídeo com afinidade por dinucleotídeos CpG metilados (Meehan et al, 1992; Fraga et al, 2003). Em 1997 foi descoberto que MeCP2 reprime a transcrição do DNA metilado através do recrutamento de complexos contendo histonas desacetilases. Esta descoberta estabeleceu um mecanismo de conexão entre a metilação do DNA e a repressão transcricional pela modificação da cromatina (Jones et al, 1998).

Num passo seguinte, as DNMTs juntamente aos MDBs recrutam enzimas histonas metiltransferases (HMTs) que são responsáveis por modificar a lisina 9 das histonas H3. Nas ilhas CpG hipermetiladas de um gene supressor tumoral, essa seqüência de recrutamentos de múltiplos repressores levam a um padrão de modificações de proteínas histônicas característico, que é definido pela desacetilação das histonas H3 e H4, metilação da lisina 9 da histona H3 e demetilação da lisina 4 da histona H3 (Figura 2) (Stirzaker et al, 2004; Esteller, 2005a).

Estudos determinaram que a metilação de resíduos específicos da histona H3 são críticos para a manutenção da configuração apropriada da cromatina. A metilação de resíduos de lisina 9 em H3 facilita a repressão transcricional; já a metilação da lisina 4 em H3 está associada com a eucromatina transcionalmente ativa (Jenuwein and Allis, 2001; Nakayama et al, 2001). Muitas dessas modificações nas histonas ocorrem em extensões localizadas em suas caudas N terminais e a especificidade no padrão das modificações levou pesquisadores a proporem a hipótese de um “código de histonas”; por exemplo, as ilhas CpG hipermetiladas dos genes supressores tumorais desenvolvem um código de histonas característico, composto por padrões de hipoacetilação e metilação das histonas (Turner, 2002).

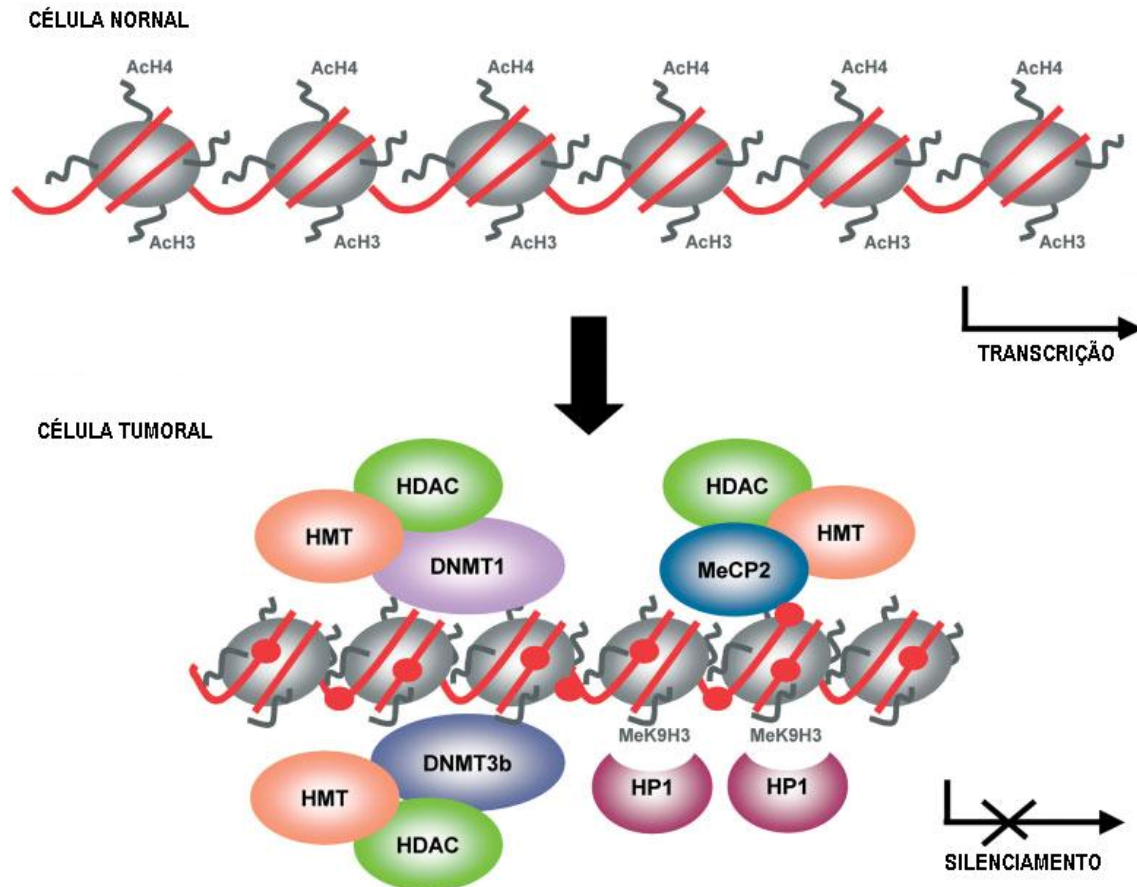


Figura 2: Estrutura da cromatina, padrão de modificação das histonas e recrutamento de múltiplos repressores em ilhas CpG hipermetiladas de um gene supressor tumoral. DNMT =DNA metiltransferase; HDAC = histona desacetilase; HMT = histona metiltransferase; MeCP2 = proteínas ligadas à metil CpG; , Ac = acetilação das histonas e Me = metilação das histonas (Esteller, 2005a).

1.5 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

O câncer é considerado uma doença complexa que afeta o bom funcionamento de muitas cascatas celulares, como o ciclo celular, a maquinaria de reparo do DNA, apoptose, mecanismos de reposta hormonal, invasão de células tumorais e formação de metástase. Muitos estudos têm sugerido que oncogenes ativados, genes supressores tumorais inativos, receptores de hormônio, receptores de citocinas e receptores de fatores de crescimento que participam dessas cascatas são regulados por mecanismos epigenéticos (Mulero-Navarro and Esteller, 2008).

A metilação aberrante do DNA está fortemente envolvida na predisposição e progressão da transformação celular. O papel da metilação do DNA é complexo; a análise do perfil de metilação sugere a existência de diferenças importantes entre as células normais e cancerosas. Tanto cânceres esporádicos quanto hereditários apresentam desregulação no padrão de metilação. Os defeitos na metilação do DNA incluem hipometilação global do genoma e hipermetilação de ilhas CpG específicas, ambas associadas a outras alterações nas características da cromatina (Scarano et al, 2005).

As principais alterações epigenéticas que são marcas características da formação e progressão tumoral incluem a hipometilação genômica global e a hipermetilação das ilhas CpG. A hipometilação está associada principalmente com regiões de DNA repetitivo e elementos transponíveis, embora a hipometilação também ocorra em promotores de genes normalmente silenciados. Este tipo de alteração gera instabilidade genômica. A hipermetilação ocorre frequentemente em regiões promotoras de genes supressores tumorais e pode atuar como um ou ambos os passos da hipótese “two hit” de Knudson (Gopalakrishnan et al, 2008).

Do mesmo modo que certas ilhas CpG tornam-se hipermetiladas, o genoma das células cancerosas pode sofrer hipometilação global. As células malignas têm cerca de 20 a 60% menos m^5C que as células normais. A perda dos grupos metil é acompanhada principalmente por hipometilação do “corpo” dos genes (regiões codificantes e introns) e demetilação de seqüências repetitivas do DNA, que representam de 20 a 30% do genoma humano. O grau de hipometilação aumenta no decorrer de todos os passos tumorigênicos, de tumores benignos, proliferantes e invasivos (Fraga et al, 2004).

A hipometilação global está envolvida na carcinogênese através de três mecanismos: instabilidade cromossômica, reativação de elementos transponíveis e

perda do *imprinting*, favorecendo recombinações mitóticas, perda de heterozigose e promovendo rearranjos cariotipicamente detectáveis. Além disso, a demetilação de regiões centroméricas é muito comum em tumores humanos e pode atuar na formação de aneuploidias (Esteller, 2005b).

A hipometilação é o segundo tipo mais comum de defeito no padrão de metilação do DNA, que pode ser observado numa ampla variedade de malignidades. É frequentemente encontrada em tumores sólidos, como metástases hepatocelulares, carcinomas cervicais, tumores de próstata e em neoplasias hematológicas como leucemia linfocítica. A hipometilação global pode ser observada em um grande número de cânceres, como mama, cervical e cérebro, mostrando um aumento progressivo de acordo com o grau de malignidade. Têm se sugerido que a hipometilação contribui para a oncogênese por ativação de genes como cMYC e H-RAS ou pela ativação de retrotransposons latentes. A hipometilação desses elementos promove sua ativação transcricional e é comum em muitos tipos de câncer, como o de bexiga. Esse processo também pode causar alterações no produto de genes que contém esses elementos inseridos, como inserções do elemento L1 encontradas nas seqüências de APC e cMYC em cânceres de cólon e mama (Costello and Plass, 2001; Das and Singal, 2004).

A hipermetilação pode constituir o passo inicial da hipótese “two hit” de Knudson em muitos cânceres somáticos, em que mutações subseqüentes ou deleções eliminam a segunda cópia do gene. Alterações epigenéticas também têm sido encontradas como causa do segundo passo em cânceres familiares. A metilação de ambos os alelos também é observada em tumores não familiares, na ausência de mutações ou outros mecanismos genéticos. Acredita-se que a inativação epigenética seja tão ou mais comum que eventos mutacionais no desenvolvimento do câncer. O amplo número de genes que sofrem hipermetilação em várias malignidades sugere uma função para alterações epigenéticas na iniciação e/ou progressão do câncer. Muitos desses genes atuam na regulação do crescimento celular, diferenciação, transdução de sinal e reparo do DNA, enquanto outros estão implicados na formação de metástases e angiogênese (Baylin, 2005). Não se sabe por que apenas alguns genes tornam-se metilados em certos tumores, e outros, com propriedades similares (ilhas CpG típicas, histórico de perda de expressão em certos tumores e ausência de mutações) permanecem livres de metilação. Uma hipótese é de que um gene específico é preferencialmente metilado em determinados tumores, porque sua inativação confere vantagem seletiva ao tumor; uma outra opção é que a metilação é direcionada diretamente a determinados genes. Seleção

e alvo não são eventos exclusivos e é mais provável que aconteçam juntos na geração e manutenção de ilhas CpG metiladas em genes supressores tumorais (Esteller et al, 2002).

O inibidor do ciclo celular p16^{INK4a} está hipermetilado em uma grande variedade de linhagens celulares de tumores primários, como próstata, colo-retal, pâncreas, cabeça e pescoço, permitindo que as células cancerosas escapem do processo de senescência e comecem a proliferar (Fujiwara et al, 2008). O gene *TP16* é um regulador do ciclo celular que induz um bloqueio do ciclo na fase G1 por inibir a ligação das proteínas CDK4 e CDK6 à ciclina D; esse processo interfere na fosforilação da proteína pRb, levando à inibição da transcrição de proteínas responsáveis por promoverem a passagem da célula pelo ponto de restrição em G1 (Abbaszadegan et al, 2008).

O gene *GSTP1* pertence à superfamília glutationa S-transferase. Essas enzimas de fase II catalizam a conjugação de compostos de glutationa de vários xenobióticos eletrofilicos, incluindo substratos provenientes de toxinas do ambiente e carcinógenos que podem estar presentes em drogas usadas no tratamento do câncer. O *GSTP1* também atua como um regulador da proteína MAPK (Moyer et al, 2008). A hipermetilação do promotor de *GSTP1* está fortemente associada com o silenciamento de genes em câncer de próstata e mama. *GSTP1* tem sido encontrado metilado também em cânceres de fígado, renal e pulmão. Recentemente, foi observado que a hipermetilação de *GSTP1* está associada ao tamanho do tumor, a metástases em linfonodos e à taxa de sobrevivência em portadores de câncer de mama (Ronneberg et al, 2008).

DAL-1 é membro da superfamília 4.1 de proteínas associadas à membrana e atua como um supressor de crescimento que está envolvido principalmente no desenvolvimento de cânceres de pulmão, mama e meningiomas. Os membros dessa família de proteínas estão localizados no lado citoplasmático da membrana e ligam as proteínas de membrana com o citoesqueleto (Jiang et al, 2005). A perda de expressão de *DAL-1* pode levar a uma diminuição da adesão celular. Estudos em células de câncer de mama demonstraram que a re-expressão de *DAL-1* aumenta a adesão celular e induz apoptose. Alterações no gene que codifica *DAL-1* são encontradas em muitos tipos de tumores. Em particular, a hipermetilação do gene é frequentemente detectada em câncer de pulmão (Tsujiuchi et al, 2007).

NDRG2 é um gene supressor tumoral que induz apoptose em certos tipos de cânceres e seu nível de expressão é reduzido em vários tecidos tumorais. É sugerido que

o NDRG2 também atua na diferenciação e crescimento celular, apoptose e doença de Alzheimer. A fosforilação de NDRG2 pelas proteínas Akt e PKC foram descritas na cascata de sinalização da insulina; entretanto, a função desse gene não é totalmente entendida. Baixos níveis de NDRG2 são observados em glioblastomas, câncer de pulmão e meningiomas agressivos (Wang et al, 2007). A hipermetilação do DNA é um mecanismo de inativação encontrado frequentemente em tumores do sistema nervoso (Lusis et al, 2005).

O gene MEN-1 está localizado no cromossomo 11q13, contém 10 éxons e codifica uma proteína de 610 aminoácidos chamada MENIN que é expressa em grandes quantidades no núcleo. Ela apresenta grande habilidade de se ligar ao DNA, independentemente de qual seja a seqüência deste. Durante a meiose, a proteína MENIN se localiza junto aos telômeros, mas isso não acontece na mitose. A proteína pode ligar-se direta ou indiretamente a fatores de transcrição, fatores de processamento e reparo do DNA e proteínas associadas ao citoesqueleto (Guru et al, 1998). Sabe-se que o gene MEN-1 atua como um supressor tumoral, mas sua função ainda não foi totalmente explicada. A inativação do gene aumenta os níveis de proliferação, promovendo a transição da célula de G0/G1 para a fase S. Muitas das mutações observadas em MEN-1 levam à ausência ou a baixos níveis de expressão de MENIN. Alterações no gene MEN-1 provocam uma síndrome chamada “Neoplasias Endócrinas Múltiplas” que envolvem a formação de hiperplasias na paratireóide, tumores pancreáticos e adenomas de pituitária. Perda de heterozigose e mutações do gene são observadas em carcinoma de pulmão, timo e gástrico, lipomas e tumores cutâneos (Piecha et al, 2008).

O gene Tp53, localizado no cromossomo 17p13, representa um dos genes supressores tumorais mais bem estudados na biologia; seu produto é conhecido como “o guardião do genoma” e constitui um importante regulador do crescimento celular. P53 é uma fosfoproteína codificada por 393 aminoácidos que responde a vários sinais de estresse, incluindo estresse genotóxico, hipoxia e ativação oncogênica. A proteína apresenta estabilização pós-transcricional, importante para sua ativação como um fator de transcrição seqüência-específica. Esta estabilização pode levar a diferentes programas, dependendo da célula de origem ou do contexto celular, tais como bloqueio do ciclo celular, senescência ou apoptose (Pietsch et al, 2006). Alterações no gene Tp53 são encontradas em mais de 50% de todos os tumores descritos, incluindo os tumores de sistema nervoso, e podem inibir a função de p53 no controle do ciclo celular e proliferação celular.

1.6 METILAÇÃO DO DNA: APLICAÇÕES CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS

Estudos epigenéticos são muito frequentes entre diversos grupos de pesquisadores em todo o mundo, e entre eles existe uma grande necessidade de transformar cada novo resultado, obtido através de descobertas relacionadas a aberrações que são provocadas pela metilação do DNA em câncer, em aplicações clínicas.

Mudanças epigenéticas em células cancerosas, não somente promovem novos alvos para terapias, como também oferecem perspectivas para diagnóstico de cânceres. As três principais fontes de pesquisa são: determinar o estado epigenético de loci gênicos individuais para medir o nível de expressão gênica, determinar modificações nas histonas e nas proteínas que compõem a cromatina e analisar o estado da região promotora (Laird, 2005).

Avanços nas técnicas para detecção da metilação incluem poderosas ferramentas como conversão por bissulfito de sódio, cDNA *microarrays*, utilização de enzimas de restrição e *microarrays* de ilhas CpG. Para ser utilizada como técnica de diagnóstico de rotina, o método de detecção de metilação precisa ser sensível, fácil, rápido e reproduzível. Das várias técnicas avaliadas, a PCR por metilação específica (MSP) parece ser a mais eficaz (Das and Singal, 2004).

Muitos laboratórios têm se preocupado em descobrir um número cada vez maior de genes que possuem ilhas CpG hipermetiladas em câncer, procurando encontrar um perfil específico que defina cada tipo de neoplasia, na tentativa de estabelecer um “metiloma”, ou seja, um padrão da metilação do DNA específico para cada forma de câncer humano. Somente aqueles marcadores que estejam sempre não metilados em tecidos saudáveis devem ser incluídos nesse painel. Combinando-se 3 ou 4 marcadores já se pode estabelecer um padrão 100% confiável (Akiyama et al, 2003). Muitos estudos estão testando técnicas que determinem hipermetilação de ilhas CpG para serem aplicadas como detectores de células cancerosas em sangue e plasma, saliva, fluidos bronco-alveolares, linfonodos, sêmen, suco pancreático, urina e sedimentos urinários, fluido peritoneal e fluido vaginal entre outros. Estes são procedimentos não invasivos ou pouco invasivos e fáceis para se coletar e processar (Laird, 2005).

Devido ao fato de que a hipermetilação do DNA está intimamente relacionada ao desenvolvimento de câncer, pode ser possível determinar se sua presença ou ausência

afeta o prognóstico da doença; isso pode auxiliar na escolha do tratamento inicial, no monitoramento da resposta do paciente à quimioterapia e estimar o tempo de sobrevivência. Algumas mudanças no padrão de metilação de genes-alvo do câncer são sugeridas como idade-dependente, já outras são propostas como pré-malignas, e em alguns casos, estão associadas com exposição a ambientes de risco e/ou dieta. A detecção de anormalidades epigenéticas em tecidos histologicamente normais ou pré-malignos com risco de progredir para a malignidade pode ser o caminho para o uso da metilação do DNA como marcador de risco (Das and Singal, 2004; Laird, 2005).

Ao contrário das modificações genéticas, mudanças epigenéticas são reversíveis, tornando-se alvo de terapias. Experimentos utilizando culturas de células mostraram que drogas demetilantes são capazes de reverter o silenciamento de genes metilados. Este potencial para reverter a metilação do DNA e re-expressar importantes genes afetados representa uma opção atraente para explorar seu uso clínico. Importantes triagens clínicas estão sendo realizadas para se testar a ação de drogas como azacitidina, inibidores de histonas desacetilases e fenilbutiratos na reativação de genes silenciados em tumores sólidos e hematológicos (Strathdee and Brown, 2002).

1.7 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo:

- analisar o perfil de metilação do DNA dos genes Tp16, Tp53, DAL-1, MEN-1, GSTP-1, NDRG2 e das DNMTs 3A, 3B e 3L e avaliar o possível envolvimento destes genes com a formação e progressão de meningiomas, schwannomas e/ou metástases.

- analisar as relações entre o padrão de metilação destes genes com os diferentes graus histológicos dos tumores para traçar um perfil de silenciamento sofrido pelos mesmos no decorrer da progressão tumoral.

- relacionar a inativação dos genes através da hipermetilação do DNA ao prognóstico e sobrevivência dos pacientes e sua resposta a quimioterápicos.

2. MATERIAIS E

MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

O grupo amostral utilizado neste trabalho consistiu de patologias provenientes de tecidos removidos através de biopsia ou cirurgia realizada em 90 pacientes não tratados, portadores de meningiomas, schwannomas ou metástases. Duas amostras controle foram obtidas de tecido de sistema nervoso central normal proveniente de autópsias. O transporte das amostras para o laboratório foi realizado logo após a sua remoção, em condições estéreis e à temperatura ambiente.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FRESCO

Para a extração de DNA de tecido neoplásico, a amostra tumoral foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pulverizado e transferida para um tubo de centrífuga ao qual se acrescentou 5ml de tampão de extração (Tris 1M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M) e 50 µl de proteinase K (10 mg/ml). As amostras foram misturadas por inversão e incubadas em banho-maria a 37°C *overnight*. Em seguida adicionou-se 3 a 5ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), com inversão suave durante 5 minutos, para homogeneização. Centrifugou-se a 8000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga e foram adicionados 3 ml de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se por inversão suave durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga maior, o volume da amostra medido e acrescentou-se um quarto deste volume de acetato de amônio 7,5M e 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas, o material lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. O etanol foi retirado e o material colocado para secar a 37°C durante uma hora. Em seguida, adicionou-se 500 a 700µl de água e o material foi guardado em geladeira até sua completa dissolução.

2.3 MODIFICAÇÃO DO DNA POR BISSULFITO DE SÓDIO

A modificação química da citosina em uracila através do tratamento por bissulfito de sódio foi sugerida como um método alternativo para o estudo da metilação

do DNA, evitando o uso de enzimas de restrição. Na reação, todas as citosinas são convertidas em uracila, mas aquelas que estão metiladas (5-metilcitosinas) são resistentes à modificação e permanecem como citosinas. Este DNA alterado pode ser amplificado e seqüenciado, permitindo a obtenção de informações detalhadas sobre a metilação de todos os sítios CpG da região amplificada (Frommer et al, 1992).

A modificação do DNA genômico por bissulfito foi realizada de acordo com o protocolo de Frommer et al (1992) com algumas modificações. Desnatura-se 2µg de DNA diluídos em 50µl de água com 2M de NaOH a 45°C por 30 min; em seguida incuba-se a mistura com 30µl de hidroquinona 10mM e 520µl bissulfito de sódio 3M (pH 5.0) a 50°C por 16 horas em ausência de luz. Após o tratamento, o DNA é purificado com a utilização da resina do *DNA clean kit* (Promega, Madison, WI), onde é incubado com 3M de NaOH durante 5 min à temperatura ambiente e precipitado com etanol absoluto, ressuspendido em 30µl de água destilada e estocado a -80°C por 48h.

2.4 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA MSP

Os *primers* foram desenhados para discriminar entre alelos metilados e não metilados após o tratamento por bissulfito e ainda para determinar quais amostras foram ou não modificadas. Assim, a seqüência dos *primers* apresenta regiões que contém alta freqüência de citosinas (para distinguir entre DNA modificado e não modificado) e pares CpG próximos da região 3' final (para promover a máxima discriminação entre DNA metilado e não metilado). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *MethPrimer* (Li and Dahiya, 2002), que leva em consideração as condições acima. O programa foi criado especialmente para a construção de oligonucleotídeos para PCR, baseada na metilação por conversão pelo bissulfito. Atribuindo-se os parâmetros desejados, o programa localiza ilhas CpG e desenha *primers* para a técnica MSP (Figura 3). A tabela 1 apresenta os *primers* utilizados neste trabalho.

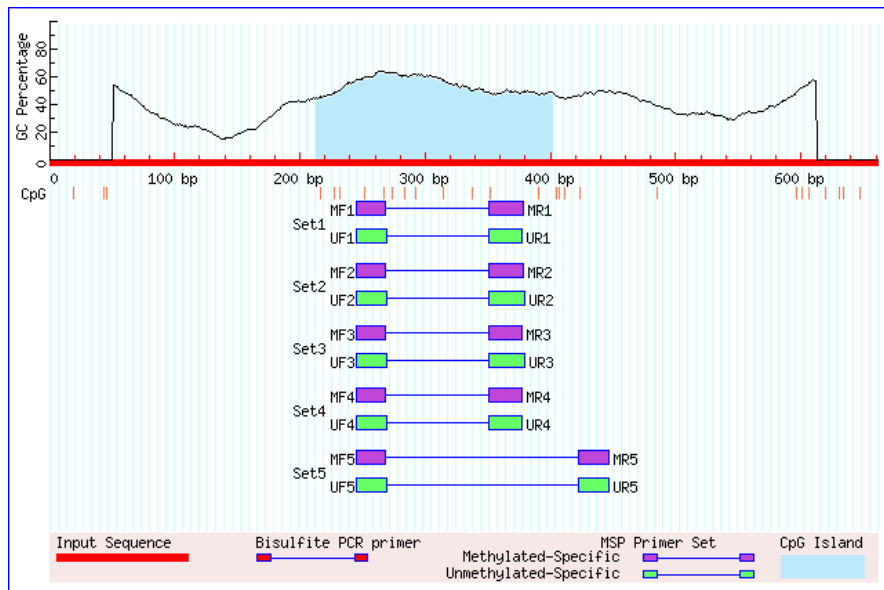


Figura 3: Identificação de ilhas CpG e construção dos *primers* para MSP através do programa Methprimer.

Tabela 1: Primers utilizados não reação de MS-PCR

Gene	Metilado	Pb	Não Metilado	Pb
p16	F: GTAGGGTTTAGAGTCGTTTCGA R: AACTACAAACTAAAACCCACGC	162	F: CGTAGGGTTTAGAGTTGTTTTGA R: AACTACAAACTAAAACCCACACA	163
P53	F: CGTCGTATTTTCGGATTAGATTTTC R: AAAAAACGTAACGCTTCTCG	166	F: GGTGTGTGTATTTGGATTAGATTTT R: AAAAAACATAAACACTTCTCACC	170
MEN I	F: TAGTTATTCGGGAGGTTGAGGTAC R: ACCTACTCTATATACAACACTCGTT	203	F: TAGTTATTTGGGAGGTTGAGGTATG R: ACCTACTCTATATACAACACTCATT	203
GSTP - 1	F: GCCCCAATACTAAATCACGACG R: TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	89	F: CCACCCAATACTAAATCACAACA R: GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	95
DAL - 1	F: GTGTTTTTGTAAATAGGGGGC R: GTAATAAACTAAACTCGAACG	125	F: TGTTTTTGTAAATAGGGGGTGG R: CAACATAAACTAAACTCAAACAC	125
NDRG2	F: AGAGGTATTAGGATTTGGGTA R: GCTAAAAAACGAAAATCTC	121	F: AGAGGTATTAGGATTTGGGTATGA R: CCACTAAAAAACGAAAATCTCACC	125
DNMT3A	F: GAAGTATTGGAGAATTTTT R: ACTCACTTACAATAAAACGAA	177	F: GGAAGTATTGGAGAATTTTTTG R: AACTCACTTACAATAAAACAA	180
DNMT3B	F: TATTTATTTTCGTTGTTTCGTTTC R: TAAACCACTTAACCCCAACG	181	F: TATTTATTTTGTGTTTGTGTTTG R: TTAAACCACTTAACCCCAACA	181
DNMT3L	F: TTTtagtattttgggaggtcga R: CCCAAactaaaatacaataacgc	160	F: ATTTtagtattttgggaggttga R: ACCCAAactaaaatacaataacaca	162

F: forward; R: reverse; Pb: pares de base

2.5 PCR POR METILAÇÃO ESPECÍFICA

Esta técnica, descrita por Herman et al (1996) é sensível e específica para visualizar a metilação de sítios CpG dentro das ilhas CpG. Os *primers* são desenhados para distinguir entre DNA metilado e não metilado após o tratamento/modificação por bissulfito de sódio, tendo como vantagem a observação das diferenças nas seqüências resultantes da modificação por bissulfito.

Após o tratamento com bissulfito, as amostras são submetidas à reação de PCR. A técnica consiste na amplificação de seqüências específicas de DNA por uma reação de polimerização em cadeia, através de síntese da enzima DNA polimerase, associada ao uso de seqüências de oligonucleotídeos (*primers*), que hibridizam as fitas opostas e flanqueiam a região de interesse do DNA alvo. As amostras passam por uma série de ciclos repetidos que envolvem desnaturação da dupla fita, anelamento dos *primers* e extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase, resultando no acúmulo exponencial de fragmentos específicos (Erlich, 1992).

Para a reação de PCR, é preparada uma mistura contendo cerca de 200ng de DNA genômico, 50 mol de cada *primer*, tampão da Taq polimerase e MgCl₂ 1,5 mM, 50µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado e 1,25 unidades da Taq polimerase. As amplificações foram realizadas utilizando-se um ciclador térmico PTC-100 (MJ Research, INC). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 2-3% ou géis não denaturantes de poliacrilamida a 6%, corados com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta.

2.6 SEQUENCIAMENTO

As amostras que apresentaram um padrão de metilação no gel de poliacrilamida foram submetidas ao seqüenciamento. Inicialmente, o produto de PCR foi submetido a um processo de purificação, com a utilização do kit ExoSAP-IT (USB – Amersham Biosciences), utilizando-se 5µl do produto da PCR e 2µl da enzima ExoSAP. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min e a ativação da enzima se deu a 80°C durante 15 min. O produto purificado foi visualizado em gel de agarose, para a confirmação de banda única. Em seguida realizou-se a reação de seqüenciamento,

utilizando-se o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences), onde se acrescentou 1µl da amostra, 5µl do kit de sequenciamento, 1µl de *primer* e 3µl de água. O preparado foi submetido a uma reação de precipitação, onde foram utilizados 1µl de acetato de sódio (1,5M de acetato de sódio + 259mM de EDTA) e 40µl de etanol 100% gelado. O preparado foi reservado em local escuro, à temperatura ambiente por 20 minutos; em seguida foi centrifugado a 10.000rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se novamente. As amostras passaram por um processo de secagem a 60°C durante 15 minutos e foram levadas ao seqüenciador (modelo ABI PRISM Big Dye).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o índice de metilação (IM) para determinar a taxa total de metilação em amostras individuais. IM é definido como uma fração representando o número de genes metilados/número de genes testados. Foram utilizados os testes de χ^2 e o teste exato de Fisher para as diferenças entre grupos e o teste *t* de Student e teste de Mann-Whitney entre as médias.

3. RESULTADOS

As 90 amostras foram analisadas através da técnica MS-PCR, utilizando-se iniciadores específicos dentro de ilhas CpG, localizadas próximas ou dentro da região promotora do gene. A análise de cada gene foi visualizada em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata 10%. A figura 4 representa algumas das amostras analisadas. Foi analisado o perfil de metilação de 9 genes: DAL-1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, GSTP, MEN-1, NDRG2, TP16 e TP53 em 48 meningiomas, 23 schwannomas e 19 metástases. O resultado da análise pode ser observado na tabela 2.

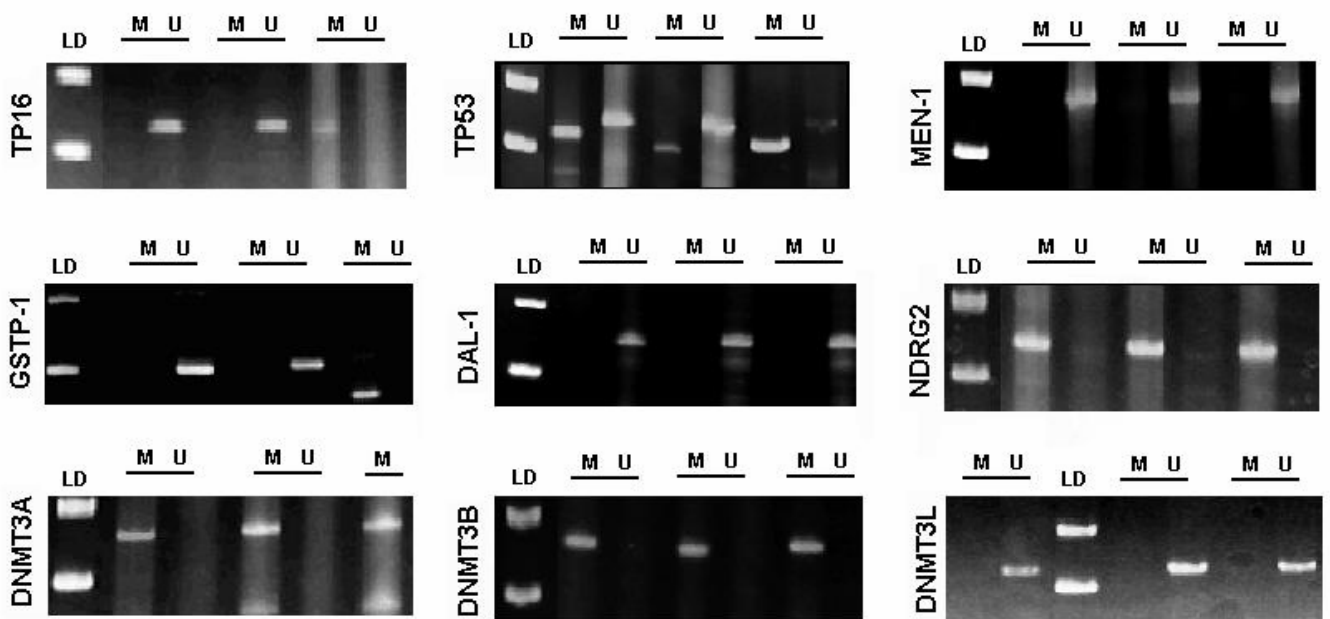


Figura 4: Visualização das amostras submetidas à técnica MSP em gel de poliacrilamida. **LD** (*ladder* – marcador de peso molecular), **M** (amostras metiladas), **U** (amostras não-metiladas).

	TP16	TP53	GSTP	DAL1	MEN1	NDRG	DNMT3A	DNMT3B	DNMT3L
SNB94	M	U	U	M	M	M	M	M	U
SNB101	U	M	M	M	U	M	M	M	U
SNB102	U	U	U	M	U	M	M	M	U
SNB110	U	U	U	M	U	M	M	M	U
SNB111	U	M	U	M	M	U	M	M	U
SNB112	U	U	U	U	U	U	M	M	U
SNB119	U	M	U	M	U	M	M	M	U
SNB120	U	M	U	U	M	U	U	M	U
SNB124	U	U	U	U	U	U	M	U	U
SNB128	U	U	M	U	U	M	M	M	U
SNB136	U	M	U	M	U	U	M	U	U
SNB137	U	M	U	U	U	M	M	M	U
SNB144	U	U	M	U	U	M	U	U	U
SNB146	U	M	U	M	U	M	M	M	U
SNB147	M	M	U	U	U	M	M	M	U
SNB152	M	M	M	U	U	M	M	M	U
SNB153	M	U	U	M	U	M	M	M	U
SNB155	M	U	U	U	U	M	M	M	U
SNB169	M	U	U	U	U	U	U	U	U
SNB179	U	U	U	U	U	M	U	M	U
SNB183	M	M	U	U	M	M	U	M	U
SNB184	U	U	M	U	M	M	M	M	U
SNB187	U	U	M	U	M	M	M	M	U
SNB188	U	U	U	U	U	M	U	M	U
SNB203	M	U	U	U	U	M	M	U	U
SNB206	U	U	U	U	U	U	M	M	U
SNB207	U	U	U	U	U	M	U	M	U
SNB211	U	M	U	M	U	M	U	M	U
SNB212	M	M	U	M	M	U	U	M	U
SNB213	U	U	U	U	U	U	U	M	U
SNB215	U	M	U	U	M	M	M	M	U
SNB221	U	U	M	M	U	M	U	M	U
SNB223	U	U	M	U	U	U	U	M	U
SNB224	M	U	U	U	M	U	U	M	U
SNB226	U	M	U	U	M	M	M	M	U
SNB227	U	U	U	U	U	M	M	M	U
SNB231	U	M	U	U	U	M	U	M	U
SNB232	U	U	U	U	U	M	M	M	U
SNB234	U	U	M	U	U	M	M	M	U

Continuação tabela 2. ID (identificação das amostras), M (metiladas), U (não-metiladas).

Através da análise estatística pudemos observar que não existe associação entre o perfil de metilação das DNA metiltransferases com o perfil de metilação dos demais genes ($p>0,05$). Com exceção das DNA metiltransferases, todos os outros seis genes estudados estavam metilados em pelo menos 20% das amostras: NDRG2 (53,3%), TP53 (40%), DAL-1 (29%), TP16 (26,6%), GSTP-1 (25,5%) e MEN-1 (20%), como está apresentado na figura 5. Nenhum dos seis genes estudados estava metilado nas duas amostras de tecido normal.

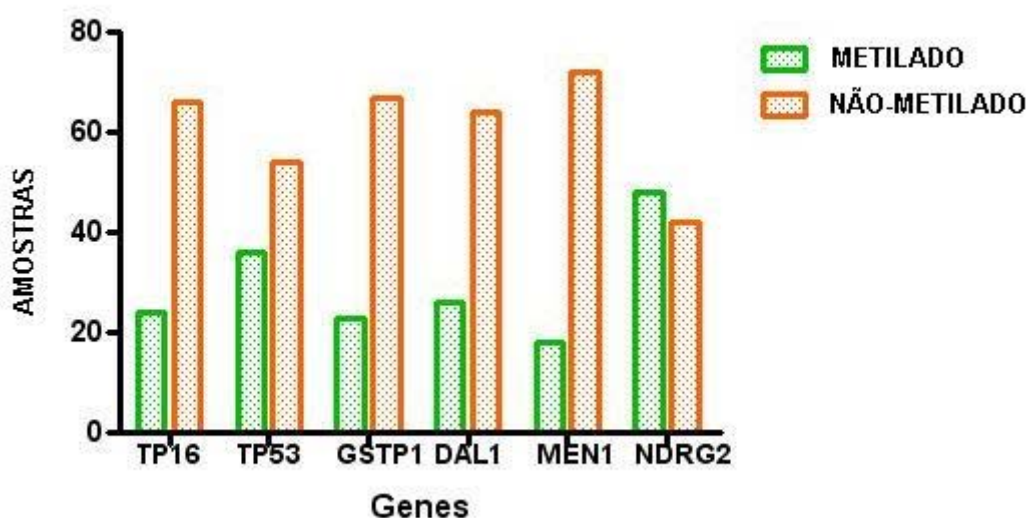


Figura 5: Representação gráfica do número de amostras metiladas e não-metiladas para cada gene estudado.

A metilação da região promotora foi observada em pelo menos um gene em 87% das amostras analisadas. A frequência de metilação dos múltiplos genes em cada amostra tumoral foi determinada utilizando-se o Índice de Metilação (MI), que é definido como a razão entre o número de *loci* metilados e o número de *loci* testados. O índice variou de 0 a 0,86, sendo que a média geral foi de 0,3. O índice de metilação foi de 0,36 em schwannomas, 0,37 em meningiomas e 0,22 em metástases. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os índices. Também não foram observadas diferenças entre os índices, quando comparamos grau tumoral, sendo que o índice entre tumores benignos foi de 0,32 e entre os malignos de 0,36. O maior índice de metilação encontrado foi entre os meningiomas de maior grau de malignidade, cujo índice atingiu 0,45, porém as análises estatísticas não apresentaram diferenças significativas.

Entre os meningiomas, o gene NDRG2 foi observado metilado com maior frequência, em 67% dos casos (Figura 6A); em schwannomas, o gene Tp16 estava metilado em 48% das amostras analisadas (Figura 6B) e nas metástases, o gene Tp53 encontrou-se metilado em 53% dos pacientes (Figura 6C).

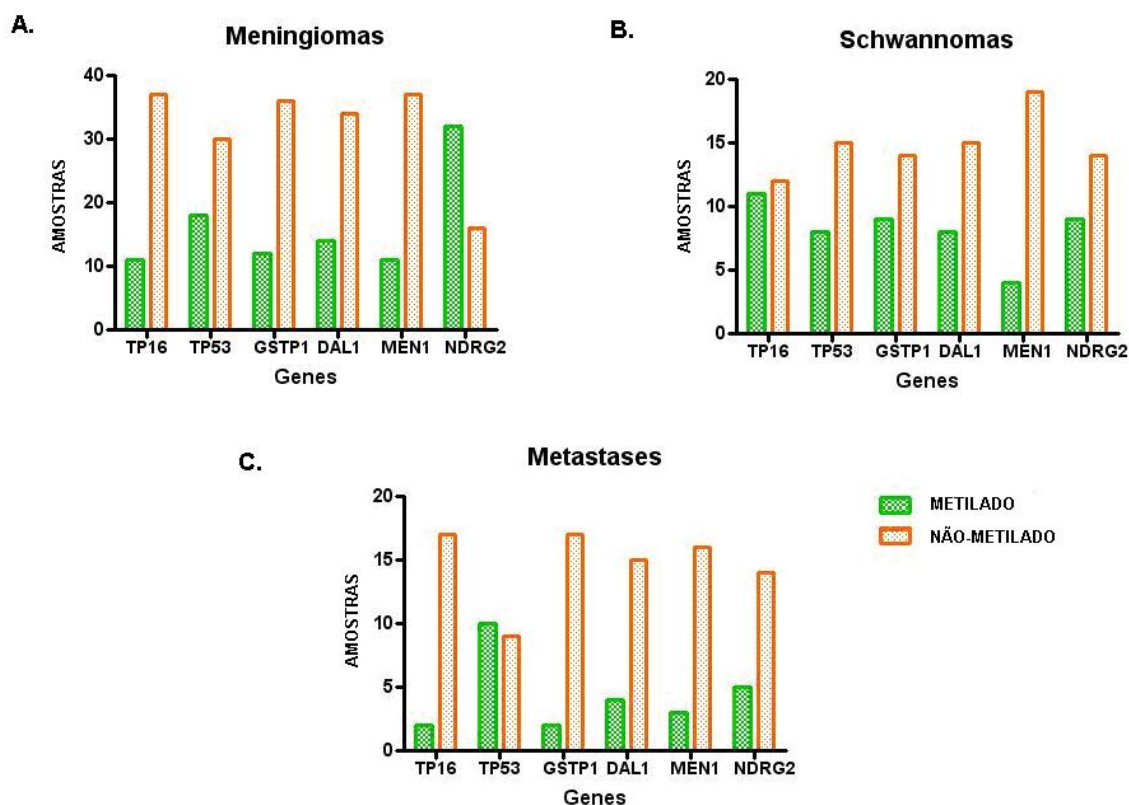


Figura 6: Número total de amostras metiladas e não-metiladas para os genes Tp16, Tp53, GSTP-1, DAL-1, MEN-1 e NDRG2 em Meningiomas (A), Schwannomas (B) e Metástases (C).

Análises estatísticas revelaram que a metilação do gene NDRG2 pode estar relacionada à progressão dos meningiomas ($p=0,03$), uma vez que ele foi encontrado fortemente metilado nesse tipo tumoral, e pudemos observar que 100% dos meningiomas atípicos e anaplásicos apresentaram o gene NDRG2 hipermetilado. O gene TP53 apresentou uma maior correlação com a formação de metástases ($p=0,05$) do que com as outras classes tumorais estudadas. Pudemos observar também uma relação entre a hipermetilação de TP53 e a ineficiência da resposta a tratamentos como quimio e radioterapia. De um total de vinte pacientes que foram submetidos a radio e/ou quimioterapia, apenas três responderam bem ao tratamento, e nenhum desses três

apresentou TP53 metilado; os dezessete indivíduos restantes foram a óbito e destes, dez (59%) apresentaram TP53 hipermetilado ($p=0,033$). Nenhuma associação foi observada entre a hipermetilação dos genes estudados e o prognóstico dos pacientes. Também não observamos nenhuma correlação entre sexo e o padrão de metilação dos genes em questão (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação das frequências de amostras metiladas entre os genes estudados

	<i>TP16</i>	<i>TP53</i>	<i>DAL-1</i>	<i>GSTP-1</i>	<i>MEN-1</i>	<i>NDRG2</i>
Meningiomas	23%	37,5%	29%	25%	23%	67%
Schwnomas	48%	35%	35%	39%	17%	39%
Metástases	10,5%	53%	21%	10.5%	16%	26%
Grau de Malignidade						
Benignos	30%	37%	30%	30%	18%	57%
Malignos	16%	48%	24%	12%	24%	44%
Sexo						
Feminino	29%	43,5%	33%	29%	22%	58%
Masculino	23%	34%	23%	20%	17%	46%
Status Vital						
Bom	33%	36%	29%	23%	16%	54,5%
Óbito	17%	46%	28.5%	28,5%	26%	51,5%

4. DISCUSSÃO

Alterações no padrão de metilação do DNA, como a hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais, constituem importantes alterações epigenéticas envolvidas na perda da regulação de muitos processos celulares que podem levar à formação e progressão de muitos cânceres humanos (Weinhold, 2006).

Em mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal, regulação da expressão gênica, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, modificações na cromatina e silenciamento de retrovirus endógenos. Esse processo é catalizado pelas DNA metiltransferases. Estas enzimas atuam na iniciação do remodelamento da cromatina e na regulação da expressão gênica. As DNA metiltransferases de mamíferos são DNMT1, DNMT3A e DNMT3B que, ligadas a outras proteínas, juntamente à DNMT3L, são responsáveis pela aquisição do padrão de metilação durante a gametogênese, embriogênese e desenvolvimento do tecido somático (Jair et al, 2006).

A DNMT1 necessita que o DNA alvo esteja hemimetilado para sua máxima eficiência. Ela se encontra ativa em células diferenciadas de tecidos específicos, indicando que esta enzima é responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA, que foi estabelecido durante o desenvolvimento embrionário (Hermann et al, 2004). As DNMTs 3A, 3B e 3L são conhecidas como DNA metiltransferases *de novo*, pois são responsáveis por estabelecerem o padrão de metilação do genoma humano sem a necessidade de que o DNA esteja hemimetilado (Gowher et al, 2005).

As DNA metiltransferases também apresentam ilhas CpG em suas regiões promotoras. Com base nessa informação, analisamos o perfil de metilação das DNMTs 3A, 3B e 3L e tentamos correlacionar o padrão de metilação destas com os demais genes estudados. Nossos resultados indicaram que, assim como nos controles, a maioria das amostras tumorais apresentaram as DNMTs 3A e 3B metiladas (63% e 84% respectivamente), enquanto que 100% das amostras apresentaram DNMT3L não metilada; porém, a DNMT3L sozinha não é capaz de metilar dinucleotídeos CpG, pois ela atua ligada às demais DNMTs.

O fato de que apenas 44% das amostras estudadas apresentaram pelo menos uma das DNMTs, 3A ou 3B, livre de metilação, pode sugerir que outra DNA metiltransferase, como a DNMT1 seja responsável pela metilação em células cancerosas. Jair et al (2006) usaram seqüências de ilhas CpG humanas como substrato para avaliar o padrão de metilação *de novo* em células cancerosas. Eles modificaram geneticamente as células de forma que elas se tornaram deficientes na expressão das

DNMTs 3A e 3B, e puderam observar que houve um aumento da atividade enzimática de DNMT1, e esta foi responsável por iniciar o processo de hipermetilação nessas células. Quando comparamos o padrão de metilação das DNA metiltransferases aos demais genes estudados, não observamos nenhuma associação estatisticamente significativa, indicando que a presença das DNMTs não metiladas ocorre de forma aleatória dentre os demais genes estudados, ou ainda, que esta falta de metilação pode estar relacionada ao padrão de metilação de outros genes não estudados por nós.

Um grande número de alterações epigenéticas está relacionado ao processo de carcinogênese, afetando principalmente genes supressores tumorais, oncogenes, genes que regulam a apoptose e genes de reparo. A repressão dos genes pela metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora do gene, é a alteração epigenética mais freqüente, na qual a estrutura do DNA é afetada, enquanto o código genético continua intacto. Dessa forma, caracterizar a maior quantidade possível de genes que sofrem hipermetilação na região promotora, tornou-se um mecanismo importante para a determinação de novos marcadores tumorais que podem levar à detecção precoce do tumor, assim como auxiliar na sua classificação e prognóstico e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para aumentar a expectativa de vida dos pacientes (Abbaszadegan et al, 2008).

Na tentativa de contribuir para o aumento de informações sobre o perfil de metilação do DNA em células cancerosas, analisamos o padrão de hipermetilação da região promotora dos genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1 e NDRG2 em tumores extra-axiais do sistema nervoso.

A predisposição ao câncer é resultado da herança de alelos alterados de genes que pertencem, na maioria das vezes, à classe dos genes supressores tumorais. O gene supressor tumoral mais bem estudado, TP53, está envolvido na maioria dos cânceres humanos, incluindo os tumores cerebrais (Biros et al, 2002). P53 é uma proteína multifuncional, que participa de mecanismos de resposta celular a danos no DNA e processos de senescência e apoptose para manter a estabilidade da célula (Kashima et al, 2007). A região promotora de TP53 não contém uma ilha CpG bem definida, porém, a metilação de alguns poucos sítios CpG pode produzir um grande efeito de redução na transcrição do gene, da mesma forma que um gene supressor tumoral que apresenta uma ilha CpG clássica em sua região promotora (Sidhu et al, 2005).

A perda de atividade de TP53, que resulta na diminuição do processo de apoptose em resposta a danos no DNA, é um mecanismo muito comum de

sobrevivência que as células tumorais adquirem. Um dos caminhos mais comuns de inativação do gene é através de mutações ou deleções; porém, em alguns tipos de tumores, essas alterações são raras. Em mieloma, por exemplo, a hipermetilação de TP53 é um dos mecanismos de inativação que ocorrem com maior frequência (Hurt et al, 2006).

A metilação do DNA de TP53 é um mecanismo de silenciamento gênico frequentemente observado em neoplasias como leucemias, gliomas malignos e metástases cerebrais de tumores sólidos (Lima et al, 2008). Kang et al (2001) estudaram o padrão de metilação de TP53 em carcinomas mamários e observaram que 16% das amostras estavam metiladas. Em leucemia linfoblástica aguda, Agirre et al (2003) encontraram a presença de metilação de TP53 em 32% dos casos analisados. Amatya et al (2005) observaram que a metilação de TP53 é freqüente em gliomas de baixo grau; eles observaram que 60% dos astrocitomas de baixo grau, 61% dos oligoastrocitomas e 73% dos oligodendrogliomas analisados estavam metilados. Nós observamos neste trabalho que a metilação do gene TP53 pode ser um importante evento relacionado aos tumores extra-axiais, uma vez que, 37,5% dos meningiomas, 35% dos schwannomas e 53% das metástases estavam hipermetiladas; 48% dos tumores malignos analisados apresentaram TP53 metilado. Esses resultados sugerem que a metilação de TP53 pode estar envolvida na progressão tumoral.

Um dos *checkpoints* de controle do ciclo celular mais importante está localizado entre as fases G1 e S e, entre os genes que regulam essa passagem, está o TP16. A perda de atividade desse gene pode romper a cascata regulatória do ciclo celular e permitir uma proliferação celular irrestrita. Alterações nessa cascata ocorrem frequentemente nos cânceres humanos por inativação da função de genes como o TP16 (Belinsky et al, 1998).

Diferentes mecanismos são sugeridos como responsáveis pela diminuição dos níveis celulares de p16, incluindo deleções homozigotas, mutações de ponto e metilação da região promotora. Os dois primeiros mecanismos ocorrem em menos de 10% dos tumores (Lee et al, 1997). A frequência de metilação da região promotora de TP16 varia entre os diferentes tipos tumorais. Estudos apresentaram hipermetilação de TP16 em 16,2% de tumores de próstata, 18% de adenocarcinomas pancreáticos, 20% de carcinomas de esôfago, 25% de tumores coloretais esporádicos, 29% de tumores de cabeça e pescoço, 36% de adenocarcinomas e 71% de carcinomas de pulmão (Fujiwara et al, 2008).

Neste trabalho, nós encontramos hipermetilação de TP16 em 23% dos meningiomas, 10.5% das metástases e 48% dos schwannomas estudados. Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos, no que diz respeito à heterogeneidade das frequências observadas nos diferentes tipos tumorais. Gonzáles-Gomes et al (2003) analisaram o perfil de metilação entre amostras de schwannomas e observaram uma frequência de metilação de 11,3% do gene TP16. Esta diferença entre as duas frequências pode ser devido ao número amostral, pois eles analisaram 44 amostras e nós apenas 23, ou ainda devido a diferenças nos pares de *primers*; pode ser que os *primers* construídos por nós apresentem uma maior abrangência de dinucleotídeos CpG, e por este motivo foi detectada uma frequência maior de metilação entre os schwannomas. Esta variação no padrão de metilação de TP16 pode ser observada também entre outros tumores: em câncer gástrico, por exemplo, Lima et al (2008) encontraram 30.43% das amostras metiladas, enquanto Abbaszadegan et al (2008) observaram 62.5% das amostras metiladas. Esses dados poderiam indicar que a variação observada pode ser um fator regional.

Em meningiomas, Bello et al (2004) observaram que 17% das amostras estavam metiladas, resultado bem próximo aos 23% encontrados por nós. Em relação às metástases, não encontramos outros trabalhos que fazem referência a hipermetilação do gene TP16. De qualquer forma, analisando nossas amostras, podemos sugerir que, em tumores extra-axiais do sistema nervoso, a metilação de TP16 parece estar associada aos tumores de baixa malignidade, onde observamos 30% das amostras metiladas em comparação aos 16% de amostras malignas.

O NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) é normalmente expresso no cérebro, coração e músculos. NDRG2 foi descrito como um gene supressor tumoral que está envolvido no crescimento celular, diferenciação, apoptose e no estímulo de mineralocorticóides nos rins; níveis alterados da proteína são encontrados no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, sugerindo um importante papel deste gene na neurodegeneração (Deng et al, 2003).

Lusis et al (2005) buscavam mapear genes envolvidos na progressão de meningiomas e observaram que a maioria das amostras tumorais estudadas apresentou perdas dos níveis de expressão de NDRG2, sendo que o mecanismo responsável por essa inativação era a hipermetilação do DNA. Foi observado que a metilação foi encontrada com maior frequência entre os meningiomas mais agressivos; 70% dos meningiomas anaplásicos estavam metilados.

Nossos resultados mostraram que o NDRG2 foi o gene mais freqüentemente hipermetilado. Mais de 53% dos tumores extra-axiais estudados estavam metilados. De acordo com outros trabalhos, nós pudemos observar uma forte correlação entre a hipermetilação do gene e a progressão de meningiomas, pois encontramos 67% dos meningiomas metilados e, quando analisamos apenas os mais agressivos, pudemos observar que 100% dos meningiomas anaplásicos estavam metilados. Tepel et al (2008) analisaram o perfil de hipermetilação de NDRG2 na progressão de gliomas e observaram que 62% dos glioblastomas estudados estavam metilados, enquanto apenas 9% dos astrocitomas anaplásicos e nenhuma amostra de gliomas de baixo grau estavam metilados. Assim, eles puderam observar que a hipermetilação de NDRG2 pode estar associada também à progressão de tumores gliais.

GSTP-1 pertence à família das Glutathionas S-transferases, que são enzimas responsáveis pela desintoxicação de uma grande quantidade de xenobióticos. Esses genes catalisam a conjugação da glutathiona a componentes eletrofilicos, incluindo carcinógenos químicos, compostos mutagênicos e agentes anti-câncer, e protegem as células prevenindo a formação de danos oxidativos através de sua atividade peroxidase orgânica (Esteller et al, 2001).

A hipermetilação da região promotora de GSTP-1 é um importante mecanismo de inativação do gene em várias neoplasias humanas, incluindo tumores de próstata, mama e rins. Esteller et al (1998) analisaram o perfil de metilação de GSTP-1 em 18 meningiomas, e não encontraram nenhuma alteração epigenética nessas amostras. Porém, Liu et al (2005) observaram que 32% de suas amostras de meningiomas atípicos e 54% dos anaplásicos apresentaram GSTP-1 metilado. Nós não encontramos níveis significativamente elevados de metilação de GSTP-1 nos tumores extra-axiais; pouco mais de 25% das amostras estavam metiladas e, em oposição aos dados acima, em nossas amostras, a hipermetilação de GSTP-1 parece estar mais relacionada aos tumores de menor grau de malignidade, pois a maior freqüência encontrada foi entre os schwannomas (39%), que são classificados como benignos de acordo com a Organização Mundial de Saúde. GSTP-1 parece estar fortemente metilado em outros tipos de tumores, como próstata e mama. Recentemente, a hipermetilação de GSTP-1 foi significativamente associada ao tamanho do tumor, ao aparecimento de metástases nos linfonodos e à média de sobrevivência em portadores de câncer de mama. Ronneberg et al (2008) encontraram metilação do gene em 71% dos tumores de mama analisados.

Uma das regiões mais freqüentemente relacionadas à tumorigênese de meningiomas está localizada no cromossomo 22 e refere-se ao gene NF2. Indivíduos que apresentam NF2 alterado podem desenvolver vários tumores relacionados ao sistema nervoso. O gene DAL-1 pertence à mesma família de NF2. Esta família apresenta níveis de expressão extremamente altos em células do sistema nervoso normal. DAL-1 tem 73% de homologia com NF2 e parece haver uma freqüente perda de expressão também de DAL-1 entre tumores de pulmão, cérebro e mama (Gutmann et al, 2000). Experimentos demonstraram que a reintrodução de DAL-1 em linhagens de células de carcinoma de pulmão, mama e meningiomas resultaram na supressão do crescimento tumoral. Estudos caracterizaram perdas da expressão de DAL-1 em 38% dos carcinomas de pulmão e em 76% dos meningiomas, propondo que perdas de expressão de DAL-1 sejam um passo inicial na tumorigênese de meningiomas (Yi et al, 2005). Com base nessas informações, analisamos o perfil de metilação de DAL-1 para tentar identificar se o mecanismo responsável pela forte perda de expressão gênica está associado a alterações epigenéticas.

De acordo com nossos resultados, aproximadamente 29% do total dos tumores analisados apresentaram hipermetilação de DAL-1; a freqüência obtida ficou bem abaixo dos resultados obtidos em outros trabalhos, indicando que outros mecanismos de inativação podem estar atuando. Quando separamos as diferentes classes tumorais, podemos observar que 29% dos meningiomas, 35% dos schwannomas e 21% das metástases analisadas estavam metiladas. A hipermetilação da região promotora de DAL-1 é encontrada com freqüência em tumores de pulmão. Tsujiuchi et al (2007) observaram metilação de DAL-1 em 55% dos tumores primários de pulmão e em 33% das linhagens celulares estudadas. A hipermetilação de DAL-1 também foi observada em 45% dos carcinomas renais estudados pelo mesmo grupo de pesquisadores e eles sugeriram que a metilação nesse gene aumenta gradualmente com a progressão tumoral. Em nosso grupo de amostras, não encontramos nenhuma associação significativa entre a metilação de DAL-1 e a progressão tumoral.

Poucas informações são encontradas sobre o gene MEN-1 em tumores do sistema nervoso. Sabe-se que alterações nesse gene são responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome “neoplasias endócrinas múltiplas”, na qual estão envolvidas a formação de hiperplasias na paratireóide, tumores pancreáticos e adenomas de hipófise. As alterações relacionadas a este gene mais bem estabelecidas são perda de heterozigose e mutações do gene em carcinoma de pulmão, timo e gástrico, lipomas e

tumores cutâneos. Observamos uma frequência de metilação relativamente baixa entre as amostras estudadas por nós; apenas 20% dos tumores extra-axiais estavam metilados. Do total de meningiomas, apenas 23% estavam metilados, e esta frequência foi ainda menor entre schwannomas e metástases, abrangendo 17% e 16% das amostras, respectivamente. Com base nesses dados, podemos sugerir que a hipermetilação da região promotora de MEN-1 não é um evento significativamente associado à gênese e progressão desses tumores.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pudemos concluir que a metilação do DNA não é o principal mecanismo responsável pela regulação das DNA metiltransferases 3A, 3B e 3L. A atividade destas três enzimas não está intimamente associada à metilação dos tumores extra-axiais e ainda, os perfis de metilação das DNMTs *de novo* não estão associados com alterações no padrão de metilação dos genes TP16, TP53, DAL-1, GSTP-1, MEN-1 e NDRG2.

A metilação de TP53 foi observada com frequência entre os tumores de maior grau de malignidade, sugerindo que a metilação de TP53 pode estar envolvida na progressão tumoral. Também observamos uma correlação entre a hipermetilação de TP53 e a ineficiência da resposta a tratamentos como quimio e radioterapia. Entre os pacientes que foram a óbito, a grande maioria apresentou TP53 metilado.

Em relação ao gene TP16, pudemos observar uma heterogeneidade nas frequências entre os diferentes tipos de tumores e graus de malignidade, indicando que a hipermetilação de TP16 ocorre de forma aleatória entre os tumores extra-axiais, fato que foi observado também entre os genes DAL-1, GSTP-1 e MEN-1.

O gene mais frequentemente metilado dentre as amostras analisadas foi o NDRG2, no qual observamos que a perda de expressão por hipermetilação de sua região promotora está associada principalmente com a progressão de meningiomas.

Devido à heterogeneidade e a ausência de especificidade, observadas entre os genes estudados e os diferentes tipos tumorais, não foi possível traçar um perfil de silenciamento dos genes e sua relação com a progressão desses tumores, para tal finalidade, é necessário avaliar o perfil de metilação de um número maior de genes. Apenas pudemos observar que TP53 foi observado metilado com maior frequência entre tumores metastáticos, TP16 apresentou-se mais metilado entre os schwannomas e finalmente, a hipermetilação de NDRG2 está relacionada principalmente aos meningiomas.

Através da alta frequência de metilação observada nas amostras estudadas, pudemos concluir que a hipermetilação das ilhas CpG na região promotora dos genes em questão é um importante mecanismo de inativação gênica entre os tumores extra-axiais do sistema nervoso.

III. INFLUÊNCIA DE SNPs EM
TUMORES EXTRA-AXIAIS DO
SISTEMA NERVOSO

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)

Com o projeto genoma humano concluído, um grande número de seqüências localizadas em “porções genéricas” do genoma está disponível. Este fato poderá levar à identificação de todas as possíveis variações gênicas nas diferentes populações humanas, associar sua presença com fenótipos individuais, incluindo susceptibilidade a doenças e ainda determinar o impacto funcional dessas variações. A fonte mais abundante de variações no genoma humano são os polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Suh and Vijg, 2005).

SNPs são substituições de pares de bases únicas que ocorrem no DNA genômico e geram diferentes seqüências alternativas (alelos) em indivíduos normais de algumas populações, e cuja freqüência mínima do alelo na população deve ser de 1% ou maior. SNPs podem ser polimorfismos bi, tri ou tetra alélicos; porém, em populações humanas, polimorfismos tri e tetra alélicos são raros ou inexistentes (Brookes, 1999).

Um aspecto chave das pesquisas em genética é a associação das descobertas com fenótipos herdáveis. Ocorrendo aproximadamente a cada 500 – 1000 pares de base, os SNPs estão entre as variações genéticas mais comuns. Inicialmente, as expectativas eram de que os SNPs fossem apenas alguns milhares ao longo do genoma, porém, no início deste século, o número de SNPs encontrados aumentou cerca de mil vezes. Dos genes conhecidos, 93% contêm SNPs e 98% destes genes estão a pelo menos 5 Kb distantes de um SNP. Logo, quase todos os genes ou regiões gênicas são marcados por uma dessas seqüências variáveis (Sachidanandam et al., 2001). Por serem encontrados ao longo de todo o genoma, os SNPs geram alelos funcionais ou fisiologicamente relevantes, pois, em uma região codificante, podem ter impacto na proteína, em um íntron, podem influenciar no mecanismo de *splicing* e, no promotor, podem modificar a transcrição gênica (Krawczak et al., 1992).

Atualmente existe um grande interesse no estudo em larga escala de SNPs que possam estar associados a doenças genéticas, para que possam ser utilizados em pesquisas fármaco-genômicas, pesquisas de populações genéticas e biologia evolutiva, clonagem posicional e ainda mapeamento físico (Smigielski et al, 2000). A associação dos SNPs com fenótipos de doenças humanas tem um grande potencial para direcionar aplicações clínicas, através da descoberta de novos marcadores genéticos mais específicos, para propósitos de diagnóstico e prognóstico e possivelmente novos alvos terapêuticos.

1.2 GENE EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)

A atividade proliferativa das células cancerosas pode ser mantida através de importantes mecanismos, inclusive por descontroles autócrinos, que fazem com que as células apresentem um declínio da necessidade de fatores de crescimento exógenos. Essa independência é devida à habilidade da própria célula cancerosa em produzir altos níveis dos fatores de crescimento dos quais necessita, e essa habilidade depende da ativação de proto-oncogenes. Assim, o envolvimento dos fatores de crescimento na sobrevivência das células cancerosas e na indução da proliferação tumoral através da neoangiogênese e perda de capacidade apoptótica contribui para a progressão de diversos tipos tumorais (Araújo et al, 2007).

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um membro da superfamília EGF de fatores de crescimento, que também inclui TGF α , epiregulinas, betacelulinas e anfiregulinas. O EGF, como todos os fatores de crescimento, está relacionado à síntese de DNA, proliferação celular e estímulos mitogênicos em tecidos epidermais. EGF pode induzir a expressão de ciclina D, uma proteína necessária para a progressão do ciclo celular, da fase G1 para S. EGF também atua como um fator de sobrevivência para a inibição apoptótica e conseqüente promoção de crescimento tumoral, e ainda, juntamente à TGF α , atua como fator de estímulo angiogênico (Harari et al, 2007).

O gene EGF está localizado no cromossomo 4q25-27 e é codificado por um RNAm de 4,8Kb transcrito de um gene de 110Kb contendo 24 éxons (Laurence and Gusterson, 1990). É proposto que a interação de EGF e EGFR pode ser um fator de suscetibilidade e prognóstico em vários tumores, como melanoma, glioblastoma multiforme e câncer gástrico (Moulder et al, 2001).

Como um sinal mitogênico, EGF pode ativar a síntese de DNA e a proliferação celular. Desta forma, a hiperexpressão de EGF pode aumentar os níveis de diferenciação e proliferação, inibir apoptose e acentuar a capacidade de invasão de células cancerosas em muitos tipos de tumores, incluindo tumores do sistema nervoso. O gene EGF contém um domínio TATA Box atípico com sítios de ligação para muitos fatores de transcrição, como NF-kB, GAS, AP-1, Sp1 e C/EBP. Foi sugerido que tanto a expressão de EGF quanto a divisão celular são reguladas pelo promotor de EGF. Sendo assim, variações genéticas comuns na região promotora de EGF podem contribuir para diferenças na expressão de EGF e conseqüentemente à susceptibilidade a doenças (Wang et al, 2008).

Até o momento, somente um polimorfismo descrito no gene EGF parece ser funcional e está associado com diferentes tipos de tumores. Identificado em 2002 por Shahbazi e colaboradores, este polimorfismo está localizado na região 5`UTR do gene. Ele consiste de uma substituição de guanina (G) por adenina (A), que leva a um aumento da expressão de EGF em células mononucleadas de sangue periférico em cultura. Esse SNP está localizado à 61 pares de bases *downstream* do promotor de EGF e foi observado em 44% da população caucasiana europeia e em quase 66% dos pacientes que apresentam melanoma. Indivíduos heterozigotos, que carregam apenas um alelo G apresentaram um aumento de 2,7 vezes na susceptibilidade de desenvolver melanoma quando comparados com a população homozigota AA; em indivíduos homozigotos GG, o aumento observado foi de 4,9 vezes (Shahbazi et al, 2002; Kang et al, 2007).

A proteína EGF está envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo processos de crescimento do sistema nervoso central, diferenciação e manutenção. Lazar e Blum (1992) mostraram que no cérebro de roedores, a produção de EGF começa no início do desenvolvimento embrionário e que após o nascimento, a expressão de EGF está amplamente distribuída pelo cérebro, incluindo tronco cerebral, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e tálamo. A proteína EGF é responsável por estimular a proliferação de células ectodérmicas e mesodérmicas além de regular o desenvolvimento de neurônios (Puttonen et al, 2008). Pesquisas sobre a influência de EGF no sistema nervoso humano são muito escassas, porém, o polimorfismo EGF 61G/A parece estar associado com o aumento da expressão de EGF observado em amostras de biópsias de glioblastoma multiforme primário e secundário. Esta hiperexpressão pode ser responsável pelo desenvolvimento e progressão deste tipo de tumor e pode estar associada ainda ao aumento da agressividade da doença (Bhowmick et al, 2004).

O mecanismo pelo qual ocorre um aumento da expressão de EGF associado à presença do polimorfismo da região 5`UTR ainda é desconhecido, mas uma hipótese plausível está na proximidade do locus 61G à região envolvida na regulação do gene EGF (Bhowmick et al, 2004).

1.3 GENE GSTP-1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1)

As glutathionas S-transferases (GSTs) constituem uma superfamília de ubiquitinas, enzimas multifuncionais que exercem um papel fundamental na desintoxicação celular de um grande número de agentes químicos endógenos e exógenos que apresentam grupos eletrofilicos funcionais. O processo é realizado através da conjugação das enzimas com um tripeptídeo glutathiona. Essa reação neutraliza os sítios eletrofilicos das toxinas tornando seu produto mais solúvel em água. Adicionalmente, essas enzimas atuam para proteger o DNA contra os danos sofridos por agentes mutagênicos (Ryberg et al, 1997).

Em humanos, cinco classes das enzimas GSTs foram identificadas (GSTT-1, GSTM-1, GSTP-1, α e σ). Variações alélicas presentes nos diferentes genes podem resultar na ausência ou na redução da eficiência da capacidade de desintoxicação, aumentando assim a susceptibilidade ao câncer. O papel das enzimas GSTs em mecanismos de desintoxicação de componentes carcinogênicos têm levado à hipótese de que, se o genótipo de um indivíduo codifica níveis deficientes das enzimas GSTs, ou codifica um produto alterado que apresenta menor afinidade pelo seu substrato, isto pode resultar no aumento do risco de desenvolvimento do câncer. Polimorfismos nos genes GSTP-1, M-1 e T-1 humanos estão relacionados com a perda ou redução da atividade enzimática direcionada a importantes substratos, incluindo aqueles encontrados no tabaco (Hayes and Strange, 2000).

Polimorfismos nas enzimas de fase II como GSTM-1 e GSTT-1 são encontrados na forma de pequenas deleções que, quando ocorrem em homozigose, resultam na total ausência de um produto gênico funcional (Saxena et al, 2008).

Variações na expressão e atividade de GSTP-1 têm sido frequentemente associadas com um grande número de tumores humanos. GSTP-1 pode metabolizar e inativar muitas drogas anti-neoplásicas e também ativar pró-drogas anti-neoplásicas. O produto gênico de GSTP-1 não age somente como uma enzima que metaboliza drogas de fase II, mas também age como um regulador das MAPKs, como resultado de uma atividade não-enzimática (Moyer et al, 2008).

Em função de seus múltiplos papéis, mecanismos de regulação gênica de GSTP-1 estão sendo extensivamente estudados, particularmente dois

polimorfismos não-sinônimos muito comuns e o perfil de metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora do gene.

GSTP-1 apresenta dois polimorfismos de base única (SNPs) não sinônimos, que resultam nos haplótipos Ile105Val e Ala114Val. Esses SNPs estão sendo associados com uma variação no risco de câncer e na resposta clínica à terapia com agentes anti-neoplásicos. A substituição Val105 resulta numa diminuição do sítio H da enzima e, como consequência, essa variante só consegue se ligar a substratos menos volumosos do que a variante Ile105 e dessa forma, sua especificidade envolve substratos diferentes daqueles relacionados à proteína selvagem. Uma outra diferença entre os haplótipos é a estabilidade térmica. Essas características podem, em parte, ser responsáveis, pela associação observada entre as variantes e o processo de carcinogênese e pelas diferenças na resposta à drogas anti-neoplásicas (Moyer et al, 2008).

1.4 GENE TP 53

O conceito de transformação neoplásica inclui dois tipos de origem genética do câncer que levam ao mesmo resultado final. Juntamente com a perda de regulação gênica em células somáticas, uma susceptibilidade determinada geneticamente é levada em conta. A predisposição ao câncer resulta da herança de genes cujos alelos se encontram alterados; freqüentemente esses genes são supressores tumorais (Biros et al, 2002).

O gene TP53 representa um dos supressores tumorais mais estudados em biologia. Seu produto é a proteína p53, conhecida como “guardiã do genoma”, e representa um regulador chave do controle do crescimento celular. P53 é uma fosfoproteína de 53 kDa, codificada por 393 aminoácidos, formando cinco regiões altamente conservadas e quatro domínios funcionais. Em resposta a sinais de stress, como stress genotóxico, hipoxia e ativação de oncogenes, a proteína p53 é estabilizada após a transcrição. Esta estabilidade pode guiá-la por diferentes cascatas, dependendo da origem da célula ou do contexto celular, incluindo bloqueio do ciclo celular, senescência ou apoptose (Pietsch et al, 2006).

TP53 é o gene supressor tumoral mais freqüentemente mutado nos cânceres humanos, encontrando-se inativado em 50% dos tumores. Em gliomas, TP53 apresenta mutações em 25% dos casos. Mutações somáticas ocorrem principalmente em astrocitomas e são menos comuns em tumores cerebrais não astrocíticos (Biros et al, 2002).

É possível que a existência de variantes naturais de p53 possa estar relacionada com o desenvolvimento de doenças específicas, por exemplo, por diferenças na atividade dessas proteínas variantes em suas cascatas. Variantes naturais de p53 são estudadas na tentativa de entender suas diferenças inter-individuais no risco de câncer e resposta a terapias.

Uma região crítica de p53 para sinalização de apoptose, localizada entre os códons 64 e 92, codifica uma região do gene rica em prolina, na qual existe um polimorfismo comum no códon 72, éxon 4, em que uma prolina (CCC) ou uma arginina (CGC) originam três genótipos distintos: homozigoto para arginina (Arg/Arg), homozigoto para prolina (Pro/Pro) e heterozigoto (Arg/Pro). Este polimorfismo de base única (SNP) parece afetar funções da proteína. O alelo polimórfico arginina apresenta um aumento na capacidade de induzir apoptose quando comparado ao alelo prolina.

Este grande potencial apoptótico da variante Arg parece estar relacionado à sua localização na mitocôndria (Leite et al, 2006; Hadhri-guiga et al, 2007). Foi observado que em homozigose, o alelo Arg apresenta uma capacidade de induzir apoptose 15 vezes maior do que o alelo Pro. Estudos que testam a funcionalidade de alelos polimórficos servem de base para que outros pesquisadores possam testar o impacto dessas variantes no risco e progressão dos tumores. Muitos resultados indicam que o alelo Pro, com menor eficácia apoptótica, está associado com um risco maior de desenvolvimento de tumores (Hishida et al, 2004).

Considerando-se fator de risco ao câncer e prognóstico, existem muitas controvérsias em relação a este polimorfismo. Alguns estudos mostram que há influência do polimorfismo TP53 códon 72 no risco de câncer e outros indicam que não há influência. Um recente estudo sugeriu uma possível associação entre este polimorfismo e a susceptibilidade a astrocitomas de alto grau adulto e pediátrico (Idbaih et al, 2007). Importantes grupos de pesquisa observaram associação entre a variante Arg e o aumento do risco para câncer gástrico, mama, esôfago, pele, pulmão, e bexiga. Em contrapartida, outros estudos demonstraram relação entre o alelo Pro (menos apoptose) e o aumento do risco para outros tipos de tumores, como tireóide, próstata e nasofaringe (Hadhri-guiga et al, 2007).

Mais recentemente, outro polimorfismo, no códon 47 do mesmo éxon 4 de TP53 também demonstrou uma significativa diminuição na capacidade de induzir apoptose. O códon 47 codifica prolina (CCG) em p53 selvagem, mas, em um pequeno número de indivíduos, ele pode codificar serina (TCG). A variante polimórfica serina 47, que substitui a prolina necessária ao reconhecimento por quinases direcionadas à prolina, é de fato um substrato muito pobre para a fosforilação por p38MAPK (Leite et al, 2006). Estudos indicam que a variante Ser é menos eficaz para servir como substrato à fosforilação por p38MAPK; conseqüentemente, apresenta de 2 a 5 vezes menos capacidade para induzir apoptose *in vivo*. Em contraste, estudos mostram que não existe diferença em sua eficiência para se ligar ao DNA, induzir bloqueio do ciclo em G1 ou sua localização na mitocôndria quando comparada à p53 selvagem (Li et al, 2005).

1.5 GENE WRN (WERNER)

A Síndrome de Werner é uma rara doença autossômica recessiva, caracterizada por sintomas associados à idade avançada, sendo provocada por mutações no gene WRN. Esta síndrome tem atraído interesse devido ao seu amplo arranjo de fenótipos, incluindo aterosclerose, diabetes, osteoporose, catarata e diversos tipos de cânceres. A estimativa de vida de portadores da Síndrome de Werner é de 46 a 48 anos (Bohr et al, 2004). Raramente os sintomas da Síndrome de Werner surgem antes da puberdade e a morte, que ocorre geralmente antes dos 50 anos, na maioria das vezes é devida ao aparecimento de cânceres ou infarto do miocárdio.

O gene WRN, um membro da família RECQ de helicases, é composto por 35 éxons e sua seqüência genômica abrange mais de 200 Kb do braço curto do cromossomo 8, na região 8p12-p11.2. Seu produto gênico pode atuar em diversas funções do DNA, como replicação, reparo, recombinação, transcrição e segregação cromossômica (Castro et al, 1999).

Estudos realizados em linhagens celulares de pacientes com SW demonstram um encurtamento da fase G1 e prolongamento da fase S do ciclo celular (Takeuchi et al., 1982; Poot et al., 1992), rearranjos cromossômicos (Thweatt e Goldstein, 1993), elevadas taxas de mutação (particularmente deleções) (Opresko et al., 2003), além de proliferação reduzida quando submetidas à recombinação mitótica (Prince et al., 2001). Dessa forma, o gene WRN parece estar envolvido tanto no mecanismo de proliferação celular quanto na manutenção da integridade genômica (Blank et al., 2004).

Levando-se em conta o fato de que portadores da SW desenvolvem uma grande variedade de tumores, incluindo os de sistema nervoso, foi proposto que o gene WRN faz parte da classe dos supressores tumorais. A classificação dentro deste grupo é apoiada por uma alta taxa de perda de heterozigose no *locus* cromossômico WRN em muitas neoplasias, como coloretal e mama (Armes et al, 2004). Foi observado recentemente, que a inativação do gene pode ocorrer também por hipermetilação das ilhas CpG de sua região promotora (Agrelo et al, 2006).

Evidências indicam que as células somáticas de pacientes com Síndrome de Werner são geneticamente instáveis; esta pode ser a provável razão para o fato dos portadores desenvolverem uma variedade de neoplasias. Ocorre também uma associação da instabilidade genômica com complicações cardiovasculares e estudos

demonstraram a atuação de polimorfismos bialélicos na resistência ou susceptibilidade a infarto do miocárdio em populações japonesas (Castro et al, 1999).

Um polimorfismo particular, Cys (TTG)/ Arg (CTG) no aminoácido 1367, próximo ao sinal de localização nuclear, parece estar relacionado a problemas cardiovasculares, onde o alelo Arg se encontra associado com a resistência a infarto do miocárdio. Estudos em populações japonesas indicam que indivíduos homozigotos para Cys têm 2,78% mais chance de apresentar infarto e aterosclerose coronária. Assim, pode ser que este polimorfismo influencie na saúde a longo prazo, estando relacionado ao desenvolvimento de desordens da idade avançada (Bohr et al, 2004).

1.6 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por PCR-RFLP, a associação dos SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg, *EGF*+61 e *GSTP-1* Ile105Val na suscetibilidade ao desenvolvimento e/ou progressão de tumores extra-axiais do sistema nervoso. Comparar os genótipos entre as populações caso e controle para identificar relações entre os polimorfismos e a gênese tumoral e ainda, comparar e relacionar os genótipos dos pacientes com variáveis como idade, sexo, grau e subtipo tumoral e resposta a tratamentos. E por fim, avaliar a influência dos genótipos analisados sobre a taxa de sobrevida dos pacientes.

2. MATERIAIS E

MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Foram estudadas 90 amostras de tumores extra-axiais do sistema nervoso (meningiomas, schwannomas e metástases), obtidas de pacientes submetidos à cirurgia, no Departamento de Neurocirurgia da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, sem tratamento prévio. Após a remoção, os fragmentos tumorais foram imediatamente colocados em meio de cultura estéril (HAM-F10), contendo antibiótico e antimicótico, e transportados para o Laboratório de Oncogenética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde foram processadas.

Para a composição do grupo controle, foram recrutados 100 indivíduos, residentes na cidade de Ribeirão Preto, de ambos os sexos, maiores de 18 anos e que não relataram casos de câncer na família.

As coletas de amostras de ambos os grupos e o acompanhamento dos pacientes foram realizados no período de agosto de 2003 a agosto de 2006. As amostras tumorais foram colhidas na ocasião das cirurgias, e não exclusivamente para a pesquisa, fato que anulou qualquer incômodo desnecessário aos pacientes. Todos os pacientes ou seus responsáveis, assim como os sujeitos do grupo controle, foram devidamente informados sobre a pesquisa e ao concordarem em participar, assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização de suas amostras.

2.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

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

No dia seguinte, foram adicionados 5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). A mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para sua completa homogeneização. A solução foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um outro tubo de centrifuga, onde foram adicionados 5

mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este tubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL, o volume da amostra foi medido e acrescentou-se 1/10 deste volume de acetato de amônio 7.5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado.

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

Para extração do DNA do sangue periférico dos controles, foram adicionados 5 mL sangue total em tubo de 15 mL; acrescentou-se solução salina (9 g/L de NaCl) até 14 mL e esta mistura foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se tampão de lise de hemácia (5 mmol/L de MgCl₂, 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,8) até 14 mL; esta mistura também foi submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 5 mL de tampão de lise de leucócitos foi adicionado ao precipitado (0,2 mol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris-HCl, PH 7,8), além de 500 µL de SDS a 10% e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). Esta mistura foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente. No final deste período, foi acrescentado 1 volume de fenol, agitou-se por 10 minutos, com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Neste tubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isopropílico (24:1), agitou-se por 10 minutos com posterior centrifugação (3.000 rpm/10 minutos) e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 2,5 vezes o volume de álcool isopropílico e a mistura foi agitada por inversão até a precipitação do DNA, que foi transferido para um novo tubo, onde permaneceu secando por toda a noite. Passado esse período, foram adicionados de 700 a 1.000 µL de água estéril e, após sua dissolução completa, o DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C até as análises

2.3 DESENHO DOS PRIMERS

Os *primers* foram construídos a partir das seqüências genômicas das regiões polimórficas dos genes em questão, obtidas no banco de dados de *SNP* (dbSNP) do

NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/SNP>). Para se evitar a construção dos *primers* dentro de outras regiões polimórficas, foi utilizado o banco de dados do Ensembl e do SNP500Cancer (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/>), onde são apontados, de forma gráfica, outros SNPs que circundam os de interesse. De posse das seqüências alvo, os *primers* foram construídos com o auxílio do programa *Gene Runner* (Versão 3.05, *Hasting Software, Inc.*), de modo a flanquear os SNPs de interesse e evitar as demais bases polimórficas evidenciadas no procedimento anterior.

A Tabela 1 lista os *primers* construídos para os SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg, *EGF* + 61 e *GSTP-1* Ile105Val com os tamanhos dos seus respectivos produtos após a PCR. A diferença observada nos diferentes produtos esperados na PCR do SNP *TP53* Pro47Ser é devida à existência de um polimorfismo de inserção/deleção de 16 pb no segmento amplificado.

Tabela 1: Seqüência dos *primers* para a amplificação dos SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, EGF+61, *GSTP-1* Ile105Val e *WRN* Cys1367Arg .

Gene	Primer	Seqüência (5' – 3')	Tamanho (pb)	Produto PCR (pb)
<i>TP53</i>	Pro47Ser-F	CTG GTA AGG ACA AGG GTT GG	20	201 e
	Pro47Ser-R	TCA TCT GGA CCT GGG TCT TC	20	185
	Arg72Pro-F	GAA GAC CCA GGT CCA GAT GA	20	152
	Arg72Pro-R	CTG CCC TGG TAG GTT TTC TG	20	
<i>GSTP</i>	Ile105Val-F	CCT GCT CCC CTC CAC CCA AC	20	180
	Ile105Val-R	GCC CCT TTC TTT GTT CAG C	19	
<i>WRN</i>	Cys1367Arg-F	GAC ACG TAC CTT ATC CAC ATG G	22	119
	Cys1367Arg-R	GAA CAG ATC TCT TCA GAA CCG G	22	
<i>EGF</i>	F	GAG AAA CTG TTG GGA GAG GAA	21	175
	R	GCA GGG CTG TTA AAC TCT GTG A	22	

pb (pares de base), **F** (forward), **R** (reverse)

2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As condições da PCR das regiões polimórficas de interesse, para um volume total de 25 μ L foram: 50 ng de DNA, tampão 1x (*Biotoools*, Madri, Espanha), 2 mM de $MgCl_2$ (*Biotoools*, Madri, Espanha), 0,4 μ M de cada *primer* (*Invitrogen*, Estados Unidos), 50 μ M de cada dNTP (*Amersham Biosciences*), 0,5 U de *Taq* polimerase (*Biotoools*, Madri, Espanha) e água Milli-Q (*Millipore, Inc.*). A PCR foi realizada em termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf, Inc.*) de acordo com os programas listados na Tabela 2.

Tabela 2: Programas de PCR para amplificação dos SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg, EGF+61 e *GSTP-1* Ile105Val.

Gene	Passos	Programa		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
<i>TP53</i> Pro47Ser e <i>TP53</i> Arg72Pro	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	54 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
<i>GSTP</i> Ile105Val	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	60 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
<i>WRN</i> Cys1367Arg	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	58 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez
EGF+61	Desnaturação Inicial	95 °C	3 min	1 vez
	Desnaturação	95 °C	30 sec	
	Anelamento	55 °C	30 sec	35 vezes
	Extensão	72 °C	30 sec	
	Extensão Final	72 °C	3 min	1 vez

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (*Amersham Biosciences*) e corados com brometo de etídio, na concentração de 2%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com corrente de 150 V e os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador (modelo FBDLT-88, *Fisher Scientific*) com fonte de luz ultravioleta.

2.5 DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Após amplificação das regiões de interesse dos SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, EGF+61, *GSTP-1* Ile105Val e *WRN* Cys1367Arg, os produtos da reação foram submetidos ao procedimento de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*), incubados na presença das enzimas Msp I, BstU I, Alu I, BsmA I e Pml I (*New England, BioLabs, Inc.*), respectivamente, de acordo com as condições listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições para a digestão enzimática dos produtos de PCR contendo os SNPs *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, EGF+61, *GSTP-1* Ile105Val e *WRN* Cys1367Arg.

	Polimorfismo				
	<i>TP53</i> Pro47Ser	<i>TP53</i> Arg72Pro	<i>WRN</i> Cys1367Arg	EGF+61	<i>GSTP</i> Ile105Val
Enzima	0,2 µL de Msp I (4 U)	0,2 µL de BstU I (2 U)	0,2 µL de Pml I (4 U)	0,2 µL de Alu I (10 U)	0,2 µL de BSMA I (10 U)
Tampão	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
BSA	----	----	0,15 µL	----	----
Produto PCR	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
Água	10,3 µL	10,3 µL	10,15 µL	10,3 µL	10,3 µL
Total	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Temperatura e Tempo de Incubação	37 °C por 4 horas	60 °C por 4 horas	37 °C por 4 horas	37 °C por 16 horas	55 °C por 5 horas
Temperatura e Tempo de Inativação	65 °C por 20 min.	----	65 °C por 20 min.	65 °C por 20 min	80 °C por 20 min

Na presença do alelo Pro47 do SNP *TP53* Pro47Ser, a enzima Msp I reconhece um sítio de restrição (Figura 1a) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes (156 pb e 45 pb), enquanto que o alelo Ser47 permanece com 201 pb. Da mesma forma, o alelo Arg72 do SNP *TP53* Arg72Pro possui um sítio de

restrição reconhecido pela enzima BstU I (Figura 1b) que, após a digestão enzimática, gera dois fragmentos de tamanhos diferentes (52 pb e 100 pb), enquanto que o alelo Pro72 permanece com 152 pb. Já no SNP, *WRN* Cys1367Arg é o alelo Arg1367 que possui um sítio de restrição para a enzima Pml I (Figura 1c), que após digestão enzimática produz um fragmento de 49 pb e outro de 70 pb, enquanto que o alelo Cys1367 permanece com 119 pb. No polimorfismo EGF+61, a presença do alelo A61 faz com que a enzima Alu I (figura 1d) clive a seqüência em dois fragmentos (70 e 105 pb) e na presença do alelo G61, a enzima não reconhece seu sítio de ligação e ocorre apenas um fragmento de 180 pb. Para analisar o polimorfismo GSTP-1, foi utilizada a enzima de restrição BsmA I (figura 1e), a qual contém um sítio de clivagem para a variante alélica Val105, clivando o genótipo homozigoto Val/Val em dois fragmentos de 115 pb e 65 pb respectivamente. O alelo selvagem Ile/Ile não é clivado e seu fragmento apresenta 180 pb. O heterozigoto Ile/Val apresenta três fragmentos (180, 115 e 65 pb).

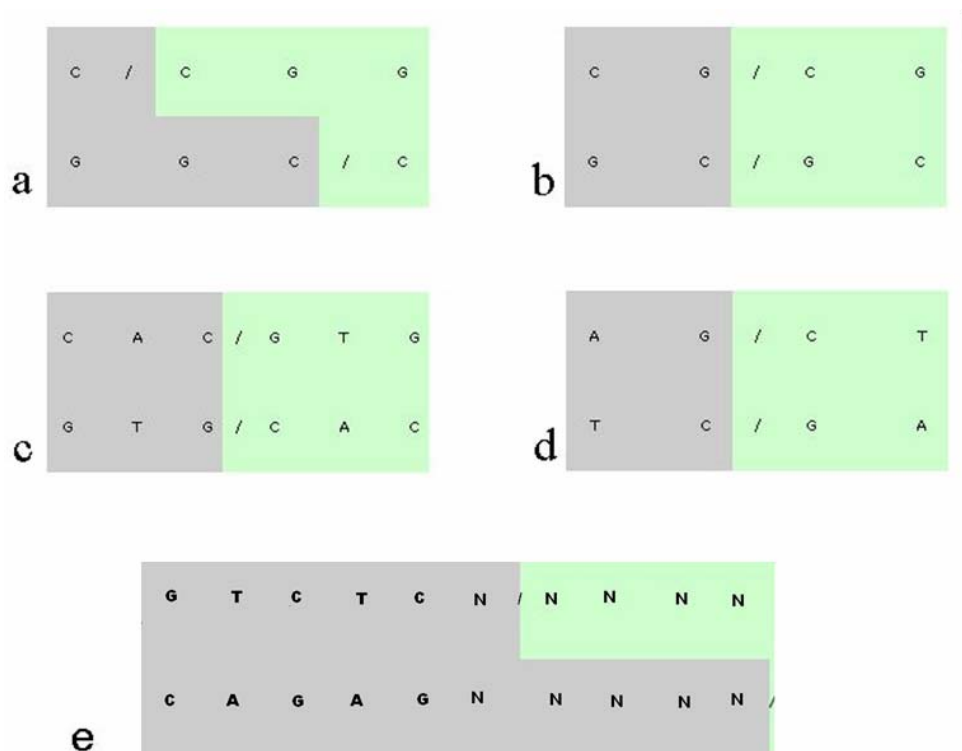


Figura 1 – Sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas Msp I (a), BstU I (b), Pml I (c), Alu I (d) e BsmA I (e).

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

2.6 SEQUENCIAMENTO

Para o controle do processo de digestão enzimática, algumas amostras foram submetidas ao seqüenciamento. Inicialmente o produto de PCR foi submetido à purificação com a utilização do kit ExoSAP-IT (USB – *Amersham Biosciences*), utilizando-se 5µl do produto da PCR e 2µl da enzima ExoSAP. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min e a ativação da enzima se deu a 80°C durante 15 min. O produto purificado foi visualizado em gel de agarose para a confirmação de banda única. Em seguida realizou-se a reação de seqüenciamento utilizando-se o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (*Amersham Biosciences*), onde se acrescentou 1µl da amostra, 5µl do kit de seqüenciamento, 1µl de *primer* e 3µl de água. O preparado foi submetido a uma reação de precipitação, onde foram utilizadas 1µl de acetato de sódio (1,5M de acetato de sódio + 259mM de EDTA) e 40µl de etanol 100% gelado; o preparado foi reservado em local escuro à temperatura ambiente por 20 minutos; em seguida, centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 30 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se novamente. As amostras passaram por um processo de secagem a 60°C durante 15 minutos e foram levadas ao seqüenciador (modelo ABI PRISM Big Dye).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As populações caso e controle foram testadas quando ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg, utilizando-se o programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997). Para verificar se a distribuição dos genótipos dos SNPs é semelhante entre as duas populações e se a distribuição de idade, sexo, status vital, grau e subtipo tumoral é semelhante entre a população de pacientes foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher (F), quando necessário.

Para avaliar a influência dos genótipos dos SNPs na taxa de sobrevida dos pacientes, foram construídas curvas de Kaplan-Meier para cada uma das categorias das variáveis. A comparação para verificar se uma ou outra categoria aumenta ou não a chance de sobrevida foi realizada pelo teste de Log-Rank.

3. RESULTADOS

A tabela 4 refere-se aos pacientes avaliados neste trabalho. Foram estudados 35 homens e 55 mulheres (relação M/F de 0,63), com idade variando entre 01 e 80 anos. Os exames histopatológicos, realizados na Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, revelaram 48 meningiomas, 23 schwannomas e 19 metástases; destes, 68 foram classificados como benignos (Graus I e II) e 22 como malignos (graus III e IV). Foram avaliados 5 polimorfismos de base única (TP53 Pro47Ser, Arg72Pro, WRN Cys1367Arg, EGF+61 e GSTP-1 Ile105Val).

Na análise do polimorfismo TP53 Pro47Ser, foram observados 66 pacientes homozigotos Pro/Pro e 33 heterozigotos Pro/Ser e não ocorreu nenhum paciente homozigoto Ser/Ser. Para o polimorfismo TP53 Arg72Pro foram observados 22 homozigotos Pro/Pro, 49 heterozigotos Arg/Pro e 19 homozigotos Arg/Arg. Em EGF+61 foram observados 67 homozigotos GG, 21 heterozigotos AG e 2 homozigotos AA. Analisando-se o gene WRN Cys1367Arg, obteve-se 59 homozigotos Cys/Cys e 20 heterozigotos Arg/Cys. Em relação ao polimorfismos do gene GSTP-1, foram encontrados 48 indivíduos homozigotos Ile/Ile, 37 heterozigotos Ile/Val e 5 homozigotos Val/Val. A figura 2 ilustra os polimorfismos analisados em gel de poliacrilamida e as figuras 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam as reações de seqüenciamento para cada um dos polimorfismos estudados.

A tabela 5 descreve os dados dos indivíduos do grupo controle incluídos no estudo. Este grupo foi composto de 63 homens e 37 mulheres (relação M/F de 1,7) com idades variando entre 18 e 72 anos (média de 45 anos).

Tabela 4: Análise dos polimorfismos de base única *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser, Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e *EGF+61* no grupo tumoral

<i>ID</i>	<i>GSTP-1</i>	<i>TP53 (47)</i>	<i>TP53 (72)</i>	<i>WRN</i>	<i>EGF + 61</i>
SN15	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN17	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN19	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN23	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SN31	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SN32	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SN33	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
SN39	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SN43	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN46	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SN54	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN57	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SN71	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	A/G
SN72	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNA03	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNA06	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNA08	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB02	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB03	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB05	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB06	Ile/Val	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB09	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB10	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
SNB11	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB23	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB26	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB27	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB29	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB32	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB33	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB36	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB38	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB43	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB44	Ile/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB45	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Arg	A/G
SNB48	Val/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB53	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Cys	A/G
SNB54	Ile/Val	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
SNB55	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB58	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
SNB61	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
SNB66	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB71	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB73	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB75	Ile/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB79	Val/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB81	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB82	Ile/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
SNB85	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB87	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB88	Ile/Ile	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB94	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB101	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB102	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
SNB110	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
SNB111	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB112	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G

SNB119	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB120	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB124	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
SNB128	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	A/A
SNB136	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
SNB137	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
SNB144	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB146	Val/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB147	Ile/Val	Pro/ser	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
SNB152	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB153	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
SNB155	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB169	Ile/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB179	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
SNB183	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB184	Val/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
SNB187	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB188	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB203	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB206	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
SNB207	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
SNB211	Ile/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB212	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB213	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB215	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB221	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB223	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB224	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB226	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
SNB227	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB231	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB232	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
SNB234	Val/Val	Pro/ser	Arg/pro	Cys/Cys	A/G

Continuação da tabela 4

Tabela 5: Análise dos polimorfismos de base única *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61 no grupo controle.

<i>ID</i>	<i>GSTP-1</i>	<i>TP53 (47)</i>	<i>TP53 (72)</i>	<i>WRN</i>	<i>EGF</i>
1	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
2	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
3	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
4	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
5	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
6	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
7	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
8	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
9	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
10	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/A
11	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	A/G
12	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
13	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
14	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
15	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
16	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	A/G
17	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
18	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Arg/Agr	G/G
19	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
20	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
21	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
22	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
23	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/A
24	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
25	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
26	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	A/A
27	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
28	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
29	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
30	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
31	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
32	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
33	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
34	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
35	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
36	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
37	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
38	Ile/Ile	Pro/ser	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
39	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/A
40	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
41	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
42	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
43	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Arg/Arg	A/A
44	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
45	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
46	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
47	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
48	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
49	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
50	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
51	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
52	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
53	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
54	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
55	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
56	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
57	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G

58	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
59	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
60	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
61	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
62	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/A
63	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
64	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
65	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
66	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
67	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
68	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
69	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Arg/Arg	A/G
70	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
71	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
72	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/A
73	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
74	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
75	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/A
76	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
77	Ile/Val	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
78	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
79	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A
80	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	G/G
81	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	G/G
82	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
83	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	A/G
84	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
85	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	A/A
86	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	G/G
87	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
88	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	A/G
89	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
90	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
91	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Arg	A/G
92	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/G
93	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
94	Ile/Ile	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	G/G
95	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	A/G
96	Ile/Val	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Arg	G/G
97	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Cys	A/G
98	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/arg	Cys/Cys	A/G
99	Ile/Val	Pro/pro	Pro/pro	Cys/Arg	G/G
100	Ile/Ile	Pro/pro	Arg/pro	Cys/Cys	A/A

Continuação da tabela 5

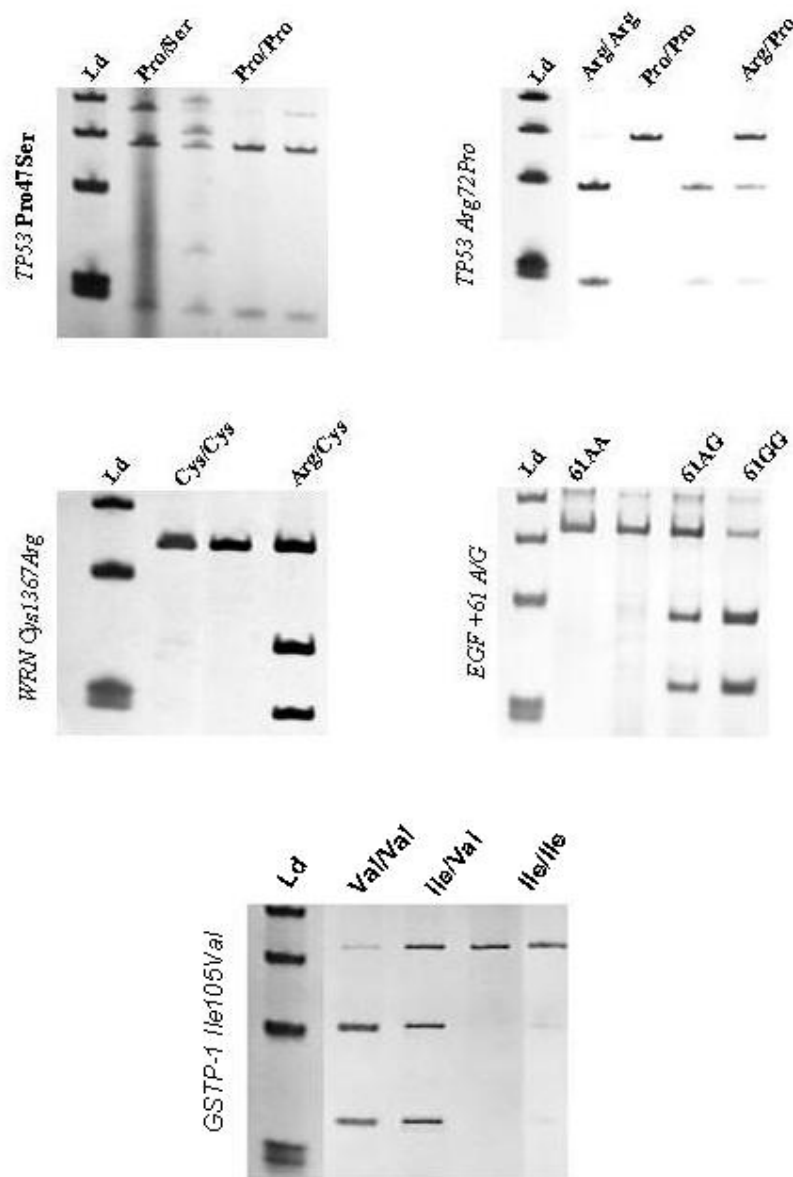


Figura 2: Análise dos polimorfismos TP53 Pro47Ser, Arg72Pro, WRN Cys1367Arg, EGF+61 e GSTP-1 Ile105Val em gel de poliácridamida. **Ld** (Ladder – marcador molecular), **Pro/Ser** (heterozigoto prolina/serina), **Pro/Pro** (homozigoto prolina), **Arg/Arg** (homozigoto arginina), **Cys/Cys** (homozigoto cisteína), **Arg/Cys** (heterozigoto arginina/cisteína), **61AA** (homozigoto para a base adenina), **61AG** (heterozigoto – bases adenina e guanina), **61GG** (homozigoto para a base guanina), **Ile/Ile** (homozigoto isoleucina), **Ile/Val** (heterozigoto isoleucina/valina) e **Val/Val** (homozigoto valina).

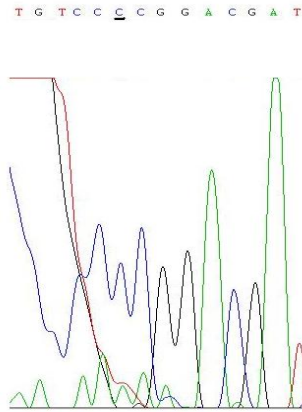


Figura 3: Reação de seqüenciamento. Cromatograma obtido a partir do polimorfismo TP53 Pro47Ser, destacando em preto a presença do alelo C, responsável pela codificação de Pro.

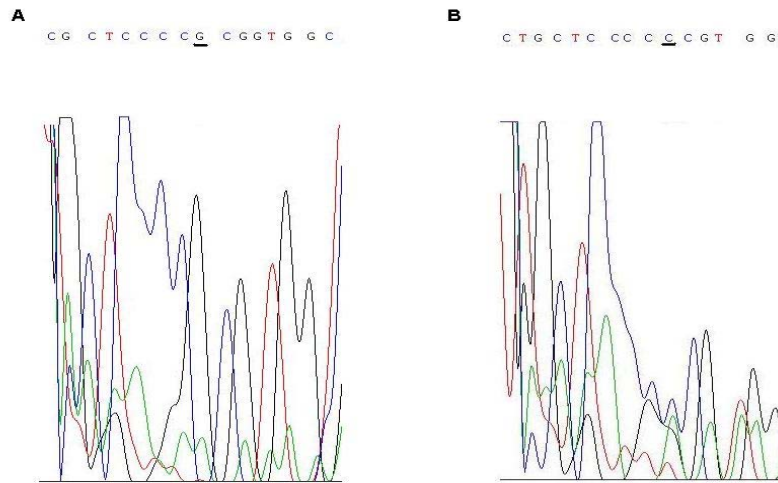


Figura 4: Reação de seqüenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo TP53 Arg72Pro, em **A** ocorre a presença do alelo G que codifica Pro e em **B**, o alelo C que codifica Arg.

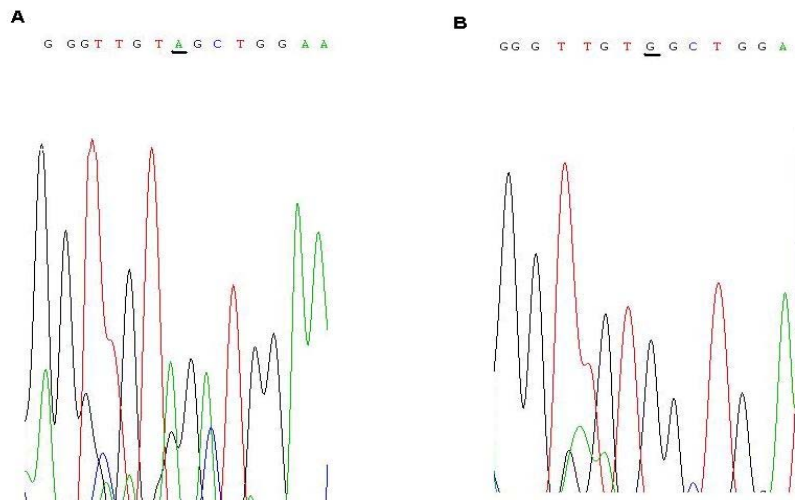


Figura 5: Reação de seqüenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo EGF + 61, em **A** ocorre a presença do alelo A e em **B** ocorre a presença do alelo G.

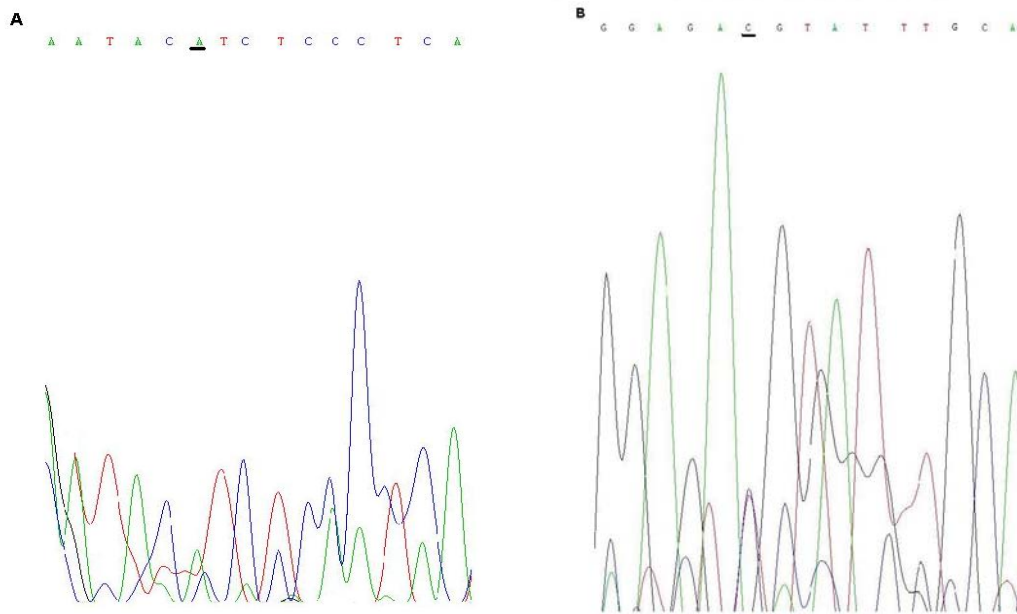


Figura 6: Reação de seqüenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo GSTP-1 Ile105Val, **A** (fita sense) ocorre a presença do alelo A (Ile) e em **B** (fita antisense) ocorre a presença dos alelos C e G indicando o heterozigoto Ile/Val.

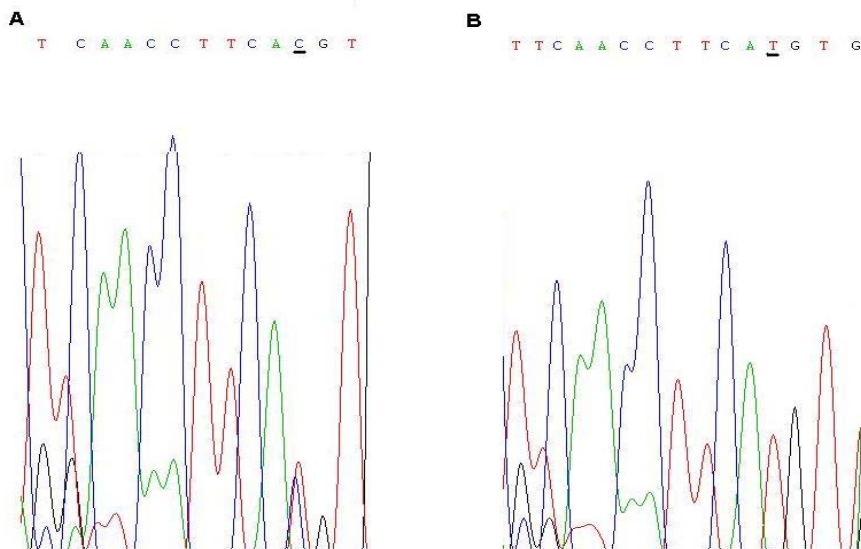


Figura 7: Reação de seqüenciamento. Cromatogramas obtidos a partir do polimorfismo WRN Cys1367Arg, em **A** ocorre a presença dos alelos C e T indicando o heterozigoto Cys/Arg e em **B** ocorre a presença do alelo T que representa Cys.

As freqüências dos genótipos observados, tanto do grupo de pacientes quanto do grupo controle, encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61 em controles e pacientes estão apresentadas na tabela 6. Em relação ao polimorfismo *TP53* Pro47Ser, as freqüências de pro/pro e pro/ser entre os controles foi de 98% e 2%, enquanto nos pacientes, as freqüências foram de 73,3% e 23,7% respectivamente, não havendo diferenças significativas entre essas freqüências ($p=0,068$), porém, quando analisamos a freqüência apenas do alelo Ser47, podemos observar uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controles (0,26 e 0,01 respectivamente; $p<0,001$). Em relação ao polimorfismo *TP53* Arg72Pro, as diferenças entre as freqüências do alelo Pro72 não foram significativas entre casos e controles e as freqüências dos genótipos arg/arg, arg/pro e pro/pro foram de 48%, 42% e 10% respectivamente entre o grupo controle, enquanto que nos pacientes foram de 22,2% para arg/arg, 53,3% para arg/pro e 24,5% para pro/pro ($p=0,826$).

Quando analisamos os resultados obtidos para as freqüências genóticas do gene *GSTP-1*, observamos diferenças entre os grupos caso e controle ($p<0,0001$), sendo que as freqüências de Ile/Ile, Ile/Val e Val/Val foram de 53,3%, 41,1% e 5,6% entre o grupo de pacientes e de 87% e 13% nos controles, sendo que nesses não observamos o aparecimento do genótipo Val/Val; sendo assim, quando analisamos as freqüências alélicas para a variante Val105, também observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,037$), uma vez que, entre o grupo de pacientes a freqüência foi de 0,26 e entre os controles foi de 0,07.

As freqüências genóticas obtidas para o polimorfismo *WRN* Cys1367Arg foram de 75,5% (Cys/Cys), e 24,5% (Cys/Arg) em pacientes e 59% (Cys/Cys), 38% (Cys/Arg) e 3% (Arg/Arg) em controles ($p=0,224$). Da mesma forma ocorrida no gene *GSTP*, a variante Arg/Arg não estava presente entre um dos grupos estudados, porém, nenhuma diferença foi observada quando analisamos as freqüências alélicas dos genótipos ($p=0,353$). Finalmente, em relação ao polimorfismo EGF + 61, as freqüências genóticas observadas foram de 74,4%, 23,3% e 2,3% entre os genótipos G/G, G/A e A/A respectivamente em pacientes, e no grupo controle as freqüências foram de 32%, 45% e 23%; nesse caso pudemos observar uma diferença entre as freqüências genóticas ($p<0,0001$) relacionada à alta freqüência do genótipo G/G encontrada entre

os pacientes estudados. Não observamos diferenças entre as frequências alélicas analisadas ($p=0,153$).

Tabela 6: Frequências alélicas e genótípicas dos grupos de pacientes e controle.

<i>SNP</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Grupo caso</i> n (%)	<i>Grupo controle</i> n (%)	P-value
TP53 Pro47Ser	Pro/Pro	66 (73,3)	98 (98)	0,068
	Pro/Ser	24 (26,7)	2 (2)	
	Ser47 (frequência alélica)	0,26	0,01	<0,001
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	20 (22,2)	48 (48)	0,826
	Arg/Pro	48 (53,3)	42 (42)	
	Pro/Pro	22 (24,5)	10 (10)	
	Pro72 (frequência alélica)	0,5	0,31	0,385
GSTP-1 Ile105Val	Ile/Ile	48 (53,3)	87 (87)	<0,0001
	Ile/Val	37 (41,1)	13 (13)	
	Val/val	5 (5,6)	0 (0)	
	Val105 (Frequência alélica)	0,26	0,07	0,037
WRN Cys1367Arg	Cys/Cys	68 (75,5)	59 (59)	0,224
	Cys/Arg	22 (24,5)	38 (38)	
	Arg/Arg	0 (0)	3 (3)	
	Arg1367 (frequência alélica)	0,12	0,22	0,353
EGF+61	A/A	2 (2,3)	23 (23)	<0,0001
	G/A	21 (23,3)	45 (45)	
	G/G	67 (74,4)	32 (32)	
	Frequência de G	0,86	0,54	0,153

A tabela 7 apresenta a comparação entre o sexo dos pacientes estudados e os genótipos observados para os polimorfismos *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61. Pudemos observar a associação entre a presença do alelo Cys e o sexo feminino para o polimorfismo *WRN* Cys1367Arg ($p=0,0007$) e também entre a presença do alelo G e o sexo feminino para o polimorfismo EGF + 61 ($p=0,021$).

Tabela 7: Comparação entre os genótipos estudados e o sexo dos pacientes.

		<i>Pacientes</i>				
		Masculino		Feminino		<i>p-value</i>
		N	%	N	%	
TP53 Pro47Ser	Pro/Pro	29	82,8	37	67,3	0,143
	Pro/Ser	6	17,2	18	32,7	
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	7	20	13	23,6	0,535
	Arg/Pro	18	51,4	30	54,5	
	Pro/Pro	10	28,6	12	21,9	
GSTP Ile105Val	Ile/Ile	19	54,2	29	52,7	0,423
	Ile/Val	15	43	22	40	
	Val/Val	1	2,8	4	7,3	
WRN Cys1367Arg	Cys/Cys	20	57,1	44	80	0,0007
	Cys/Arg	15	42,9	11	20	
EGF+61	G/G	23	65,7	44	80	0,021
	A/G	10	28,6	11	20	
	A/A	2	5,7	0	0	

No presente trabalho, buscamos observar também se há alguma correlação entre os genótipos estudados e a idade dos pacientes em questão. Para tanto, dividimos o grupo de estudo em duas classes, de acordo com suas faixas etárias: um grupo de pacientes com idade até 50 anos e o segundo grupo acima de 50 anos (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação entre os genótipos estudados e a faixa etária dos pacientes.

<i>Pacientes</i>						
		Até 50 anos		Acima de 50 anos		<i>p-value</i>
		N	%	N	%	
TP53 Pro47Ser	Pro/Pro	34	72,3	32	74,4	1,000
	Pro/Ser	13	27,7	11	25,6	
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	14	29,8	6	14	0,011
	Arg/Pro	21	44,7	27	62,8	
	Pro/Pro	12	25,5	10	23,2	
GSTP Ile105Val	Ile/Ile	27	57,4	21	48,8	0,313
	Ile/Val	16	34	20	46,5	
	Val/Val	2	4,6	3	5,7	
WRN Cys1367Arg	Cys/Cys	32	68	32	74,4	0,436
	Cys/Arg	15	32	11	25,6	
EGF+61	G/G	32	68,1	35	81,4	0,129
	A/G	14	29,8	7	16,3	
	A/A	1	2,1	1	2,3	

Com base nas frequências observadas na tabela 8, pudemos inferir que não houve nenhuma associação significativa entre os genótipos estudados e a faixa etária dos pacientes em questão, exceto para o polimorfismo TP53 Arg72Pro, onde o alelo Pro72 aparece com maior frequência entre os indivíduos com idade superior a 50 anos ($p=0,011$).

A tabela 9 apresenta os dados obtidos através da comparação dos genótipos com os diferentes tipos de tumores analisados (meningiomas, schwannomas e metástases). Para esta associação foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os genes GSTP-1 e EGF onde os meningiomas apresentaram maiores frequências do alelo Val105 ($p=0,042$) e da variante A ($p=0,026$) respectivamente.

Tabela 9: Comparação entre os genótipos estudados e os subtipos tumorais.

		Subtipo						p-value
		Meningioma		Schwanoma		Metástase		
		N	%	N	%	N	%	
TP53 Pro47Ser	Pro/Pro	38	79,2	14	60,8	14	73,7	0,264
	Pro/Ser	10	20,8	9	39,2	5	26,3	
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	12	25	4	17,4	4	21	0,595
	Arg/Pro	26	54,2	12	52,2	10	52,6	
	Pro/Pro	10	20,8	7	30,4	5	26,4	
GSTP Ile105Val	Ile/Ile	24	50	12	52,2	12	63,1	0,042
	Ile/Val	20	41,7	10	43,5	7	36,9	
	Val/Val	4	8,3	1	4,3	0	0	
WRN Cys1367Arg	Cys/Cys	35	73	15	65,2	14	73,7	0,454
	Cys/Arg	13	27	8	34,8	5	26,3	
EGF+61	G/G	36	75	18	78,3	13	68,4	0,026
	A/G	10	20,8	5	21,7	6	31,6	
	A/A	2	4,2	0	0	0	0	

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 aos genótipos observados nos polimorfismos *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 10. Nesse agrupamento também não observamos nenhuma diferença significativa, exceto para o polimorfismo EGF + 61, onde a presença do alelo G é mais freqüente entre os portadores de tumores de baixo grau (p=0,001).

Tabela 10: Comparação entre os genótipos e os graus tumorais agrupados.

		<i>Grau tumoral</i>				<i>p-value</i>
		Baixo		Alto		
		N	%	N	%	
TP53 Pro47Ser	Pro/Pro	48	72,7	18	75	0,748
	Pro/Ser	18	27,3	6	25	
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	14	21,2	6	25	0,641
	Arg/Pro	35	53	13	54,2	
	Pro/Pro	17	25,8	5	20,8	
GSTP Ile105Val	Ile/Ile	35	53	13	54,2	0,637
	Ile/Val	28	42,4	9	37,5	
	Val/Val	3	4,6	2	8,3	
WRN Cys1367Arg	Cys/Cys	45	68,2	19	79,2	0,108
	Cys/Arg	21	31,8	5	20,8	
EGF+61	G/G	50	75,8	13	54,2	0,001
	A/G	14	21,2	7	29,1	
	A/A	2	3	4	16,7	

Análises de regressão logística foram realizadas na tentativa de associar os haplótipos dos diferentes polimorfismos estudados com o risco de desenvolvimento dos tumores extra-axiais do sistema nervoso. A tabela 11 apresenta os resultados obtidos. Quando comparamos o genótipo Arg/Arg, o genótipo mais comum (selvagem) do polimorfismo TP53 Arg72Pro, com o alelo Pro72 na população estudada, podemos observar que a presença do alelo Pro revela um risco aumentado para o desenvolvimento tumoral (OR=3,23; IC, 1,71 – 6,08; p=0,003). Em relação ao polimorfismo TP53 Pro47Ser, nós observamos um aumento sutil no risco de desenvolvimento tumoral para a presença do alelo Ser47 (OR=1,28; IC, 0,03 – 2,10; p=0,01). Em relação ao polimorfismo GSTP-1 Ile105Val, podemos observar um risco maior para o desenvolvimento de tumores extra-axiais na presença da variante Val (OR=5,93; IC, 2,93 – 11,98; p<0,0001). Análises estatísticas relacionadas ao gene WRN não apresentaram diferenças significativas entre os alelos Cys e Arg e o risco de câncer. Para o gene EFG, pudemos observar também que a presença do alelo polimórfico G está fortemente relacionada a um aumento do risco de desenvolvimento de tumores extra-axiais do sistema nervoso (OR=13,14; IC, 3,00 – 27,56; p<0,0001) e que o homocigoto GG pode aumentar o risco de câncer em cerca de 24 vezes (p<0,0001).

Tabela 11: Associação dos polimorfismos *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61 com o risco de câncer.

<i>SNP</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Caso/Controle</i>	<i>OR (95%CI)</i>	<i>P-value</i>
<i>TP53</i> Pro47Ser	Pro/Pro	66/99	1,0	
	Pro/Ser	24/1	1,28 (0,03-2,10)	0,01
<i>TP53</i> Arg72Pro	Arg/Arg	20/48	1,0	
	Arg/Pro	48/42	3,55 (1,82-6,94)	0,03
	Pro/Pro	22/10	2,08 (0,85-5,08)	0,005
	Pro/Pro + Arg/Pro	70/52	3,23 (1,71-6,08)	0,003
<i>GSTP</i> Ile105Val	Ile/Ile	48/87	1,0	
	Ile/Val	37/13	0,19 (0,09-0,39)	<0,0001
	Val/Val	5/0	0,05 (0,002-0,93)	0,006
	Val/Val + Ile/Val	42/13	5,93 (2,93-11,98)	<0,0001
<i>WRN</i> Cys1367Arg	Cys/Cys	64/59	1,0	
	Cys/Arg	26/38	1,58 (0,86-2,92)	0,165
	Arg/Arg	0/3	7,58 (0,38-15,37)	0,116
	Arg/Arg + Cys/Arg	26/41	0,58 (0,31-1,07)	0,095
<i>EGF</i>+61	A/A	2/23	1,0	
	A/G	21/45	0,18 (0,04-0,86)	0,02
	G/G	67/32	24,07 (5,34-32,50)	<0,0001
	G/G + A/G	88/77	13,14 (3,00-27,56)	<0,0001

Para avaliar a influência dos polimorfismos estudados sobre a taxa de sobrevivência dos pacientes, foram construídas curvas de Kaplan-Meier. A comparação para verificar se os haplótipos observados podem diminuir ou aumentar a chance de sobrevivência foi realizada pelo teste de log-Rank. As figuras 8, 9, 10, 11 e 12, juntamente com os resultados dos testes estão apresentadas abaixo.

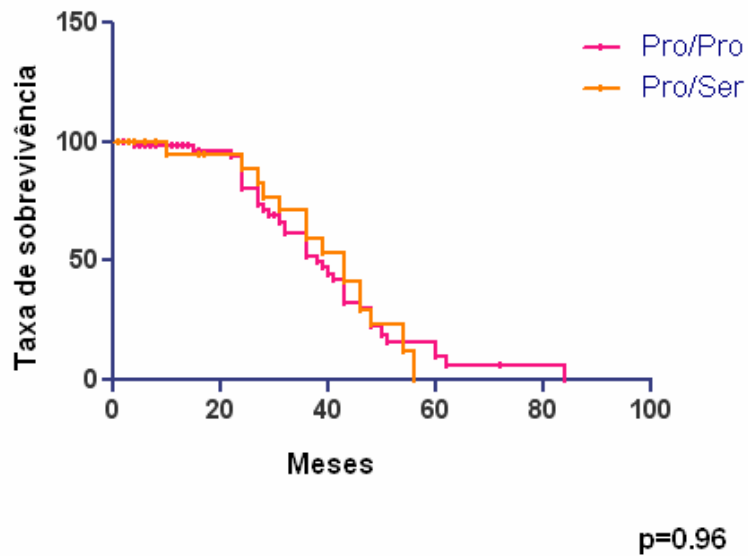


Figura 8: Curva de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo TP53 Pro47Ser.

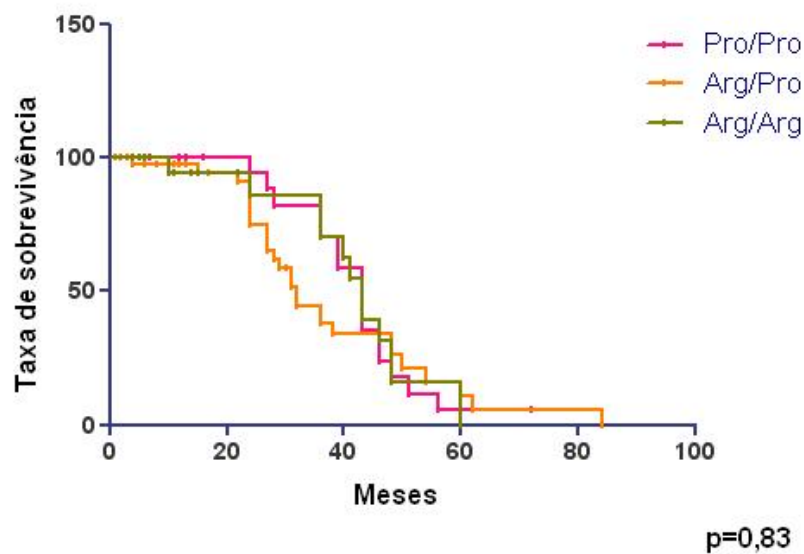


Figura 9: Curva de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo TP53 Arg72Pro.

As comparações das taxas de sobrevida dos pacientes com os polimorfismos TP53 Pro47Ser e Arg72Pro não revelaram nenhuma diferença significativa ($p=0,96$ e $p=0,83$ respectivamente). Para o polimorfismo TP53 Arg72 Pro, a sobrevivência média dos pacientes portadores dos alelos Arg/Arg e Pro/Pro foi de 43 meses, enquanto que dos portadores do heterozigoto Arg/Pro foi de 32 meses. A curva de sobrevida referente ao polimorfismo TP53 Pro47Ser demonstrou que os pacientes heterozigotos (Pro/Ser) apresentaram uma média de sobrevivência de cerca de 43 meses, enquanto para os homozigotos Pro/Pro a média observada foi de 38 meses.

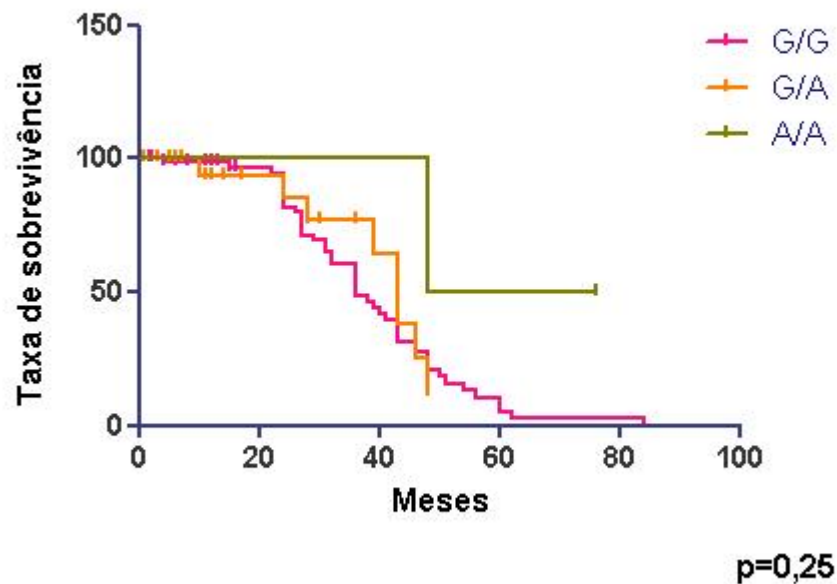


Figura 10: Curva de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo EGF + 61.

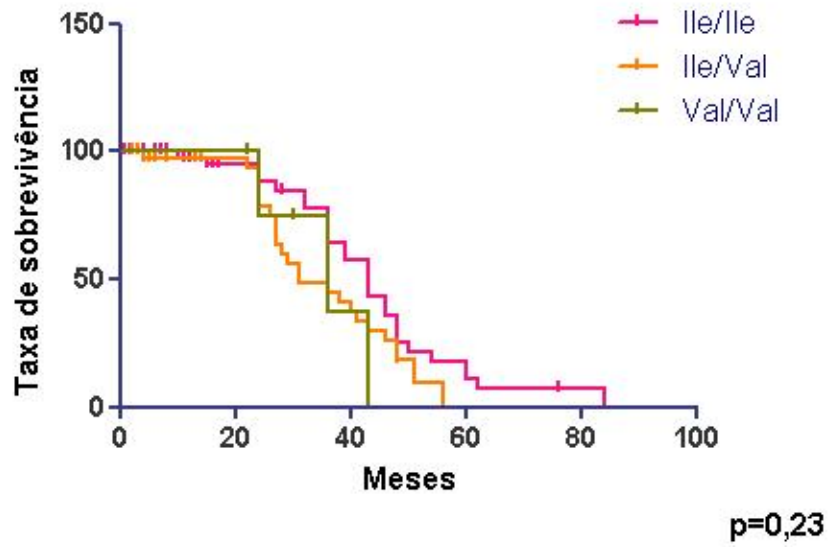


Figura 11: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo GSTP-1 Ile105Val.

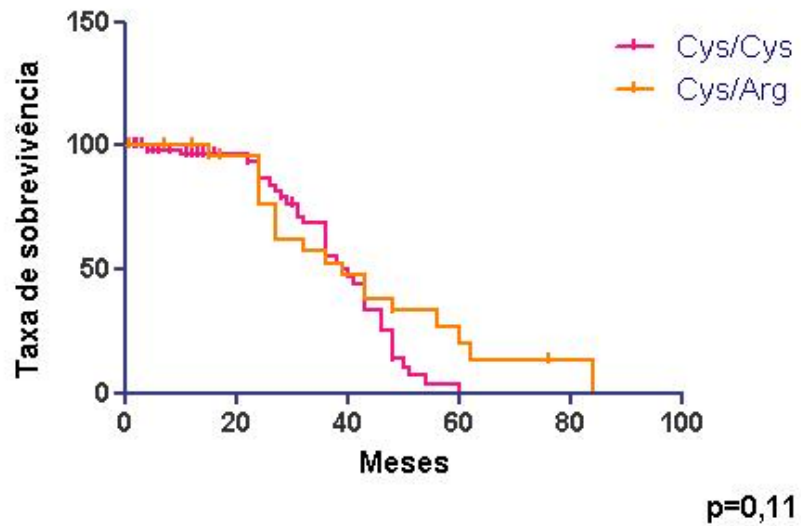


Figura 12: Curva de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier obtida para o polimorfismo EGF + 61.

Análises das curvas de sobrevida construídas para os polimorfismos GSTP-1 Ile105Val, WRN Cys1367Arg e EFG A61G não revelaram nenhuma diferença nas taxas de sobrevivência entre os diferentes genótipos. Para o gene GSTP-1, as médias de sobrevida foram de aproximadamente 43 meses para indivíduos portadores do genótipo Ile/Ile, 31 meses para o genótipo Ile/Val e 36 meses para o genótipo Val/Val. Para o gene WRN, a sobrevivência média foi de 39 meses para os pacientes portadores de ambos os genótipos (Cys/Cys e Cys/Arg). Finalmente, em relação ao polimorfismo do gene EGF, a taxa de sobrevivência foi de 36 meses para o genótipo G/G, 43 meses para G/A e 66 meses para indivíduos A/A.

4. DISCUSSÃO

Os genes envolvidos no processo de tumorigênese são considerados marcadores moleculares em potencial, associados com a susceptibilidade ao câncer. A predisposição a importantes tipos de cânceres humanos têm sido associada atualmente também aos polimorfismos genéticos, que podem apresentar, juntamente com outras alterações genéticas, importantes contribuições na origem e desenvolvimento do câncer e no comportamento tumoral (Costa et al, 2008).

Os polimorfismos de base única (SNPs) são as variações encontradas em maior abundância no genoma humano e os métodos utilizados na análise dessas variações são rápidos, precisos e baratos; por esses motivos, pesquisas relacionadas a polimorfismos têm adquirido crescente popularidade, principalmente aquelas relacionadas ao estudo genético de diferentes tipos de doenças. A identificação de SNPs como fatores de risco para diferentes tipos de câncer pode ser relevante para sua prevenção, diagnóstico e prognóstico (Kirk et al, 2002).

Nós buscamos neste trabalho, através de um estudo caso-controle, investigar a relação dos polimorfismos de base única *GSTP-1* Ile105Val, *TP53* Pro47Ser e Arg72Pro, *WRN* Cys1367Arg e EGF+61 com a susceptibilidade a tumores extra-axiais do sistema nervoso (meningiomas, schwannomas e metástases).

A proteína p53 inibe a proliferação de células com danos no DNA de duas maneiras: promovendo a parada do ciclo celular ou induzindo a célula ao processo de apoptose, garantindo uma resposta biológica eficaz ao dano no DNA. Desta maneira, ou a integridade genômica é restaurada por reparo do DNA e as células retornam ao ciclo, ou, quando o dano persiste, elas são eliminadas por apoptose. Esta importante função exercida por p53 explica o fato de que o gene TP53 é um dos maiores alvos de mutação em câncer. Mais de 50% dos tumores humanos apresentam mutações em TP53 (Bonafe et al, 2002).

Um dos polimorfismos mais comuns do gene TP53 está localizado no códon 72 no éxon 4, e refere-se à substituição de uma arginina (CGC) para uma prolina (CCC). É proposto que a variante polimórfica do códon 72 apresenta uma potencial susceptibilidade para o desenvolvimento de cânceres. A diferença funcional descrita para esse polimorfismo é que o genótipo Arg/Arg induz apoptose com maior eficiência do que o genótipo Pro/Pro (Murata et al, 1996; Kuroda et al, 2003). Importantes grupos de pesquisa têm encontrado uma associação entre a variante Arg72 e o aumento do risco para câncer gástrico, mama, esôfago, pele, pulmão e bexiga. Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado associações entre a variante Pro72 (menos apoptótica) e o

aumento do risco para outros tipos de cânceres, como tireóide, próstata e nasofaringe. Existem ainda outros estudos que não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo TP53 Arg72Pro e o risco de câncer (Hadhri-Guiga et al, 2007).

Nós observamos, neste estudo caso-controle, que o alelo Pro72 apareceu com maior frequência entre indivíduos da população que apresentou câncer (frequência de 0,5) do que entre a população controle (0,31); análises estatísticas sugeriram que a presença do genótipo Pro72 pode aumentar o risco de desenvolvimento de tumores extra-axiais do sistema nervoso (OR=3,23; IC, 1,71 – 6,08; p=0,003), fato que pode ser explicado pela redução da capacidade de induzir apoptose que o alelo Pro apresenta em comparação ao alelo Arg. Biro et al (2002) analisaram o polimorfismo Tp53 Arg72Pro em meningiomas e astrocitomas, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada com referência à distribuição das frequências genóticas entre as populações caso e controle. Idbaih et al (2007) estudaram a influência do SNP arg72Pro de TP53 sobre o risco do desenvolvimento de tumores oligodendrogliais. Eles analisaram um grupo de 275 pacientes e observaram que as frequências alélicas e genóticas do códon 72 foram muito similares entre pacientes e controles, sugerindo uma ausência de relação entre esse SNP e os oligodendrogliomas.

Por outro lado, muitos pesquisadores encontraram correlações entre o alelo Pro72 e o aumento do risco de câncer. Hadhi-guiga et al (2007) analisaram amostras de carcinoma de nasofaringe e observaram uma associação significativa entre esse tipo de tumor e o polimorfismo TP53 Arg72Pro, em que portadores do genótipo homozigoto Pro/Pro apresentaram maior risco de desenvolverem carcinomas de nasofaringe. Em um estudo sobre câncer colorretal, Zhu et al (2007) encontraram evidências de que a variante Pro72 pode contribuir para a etiologia desse tumor. O alelo Pro72 foi observado com maior frequência em pacientes do que em controles (p<0,001) e portadores do alelo Pro tiveram um risco significativamente maior de desenvolver câncer colorretal.

Existem poucos estudos que fazem referência ao polimorfismo TP53 Pro47Ser e a susceptibilidade ao câncer. Felley-Bosco et al (1993) foram o primeiro grupo de pesquisadores a demonstrar uma diminuição significativa na habilidade do alelo Ser induzir apoptose. Pinto et al (2008) investigaram a associação entre o polimorfismo TP53 Pro47Ser e a susceptibilidade ao desenvolvimento de gliomas, e não observaram nenhuma associação entre eles. Nós obtivemos resultados diferentes em nosso trabalho; pudemos observar uma diferença significativa na frequência do alelo Ser47 entre os grupos caso e controle (0,26 e 0,01 respectivamente, p<0,001) e observamos também

um sutil aumento do risco de desenvolvimento de tumores extra-axiais do sistema nervoso entre os portadores do alelo Ser47 (OR=1,28; IC, 0,03 – 2,10; p=0,01). O processo de apoptose é essencial para a manutenção do equilíbrio entre nascimento e morte celular em tecidos que estão em fase de renovação, e a resistência à apoptose é uma das características mais importantes entre as células cancerosas, porque lhes confere um grande poder de sobrevivência e multiplicação.

A Síndrome de Werner é uma desordem autossômica recessiva que afeta indivíduos de forma prematura, fazendo com que estes exibam patologias relacionadas à idade, assim como uma alta predisposição ao desenvolvimento de cânceres. O gene alterado, chamado WRN, codifica para uma proteína nuclear que é membro da família RecQ de DNA helicases e possui duas atividades enzimáticas: uma dependente de ATP, que auxilia no relaxamento da molécula de DNA na forquilha de replicação e uma atividade exonuclease em sua região amino-terminal (Pirzio et al, 2008).

Portadores da Síndrome de Werner exibem características fenotípicas como flacidez cutânea, cabelos grisalhos, osteoporose, catarata, diabetes e arteriosclerose. O produto gênico de WRN desempenha importantes funções na manutenção da estabilidade genômica e em mecanismos de reparo do DNA. Estudos têm correlacionado a Síndrome com um defeito no reparo de danos oxidativos no DNA, característica que pode contribuir diretamente para o fenótipo prematuro desenvolvido pelos portadores (Muftuoglu et al, 2008). Entre os indivíduos que apresentam a síndrome, infarto do miocárdio e câncer são as principais causas de morte, que ocorrem ao redor de 48 anos de idade. Uma das primeiras evidências que ligam o gene WRN às características citadas é o polimorfismo Cys1367Arg e alguns estudos têm sugerido que o alelo Cys está associado com o aumento do risco de infarto, enquanto a variante Arg está relacionada ao aparecimento de estenose coronária. Entretanto, a presença da variante Arg parece proteger contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Castro et al, 2008).

Existem poucos estudos que tentam relacionar o polimorfismo WRN Cys1367Arg com a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores; a maioria dos trabalhos associa este polimorfismo a doenças coronarianas, diabetes, osteoporose e doença de Alzheimer. Kuningas et al (2006) analisaram a relação entre o polimorfismo e o risco de infarto e outros problemas cardíacos e observaram que pacientes portadores do alelo Arg1367 apresentaram maior risco de desenvolver doenças cardíacas do que os portadores do alelo Cys1367. Em contrapartida, Ye et al (1997) observaram que a

presença do alelo selvagem Cys, principalmente em homozigose, aumenta em três vezes o risco de infarto na população japonesa. No Brasil, um dos trabalhos relacionados ao polimorfismo WRN Cys1367Arg foi realizado por Payao et al (2004), e buscava relações entre o polimorfismo e o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Foi observado que as frequências genóticas foram muito próximas entre os grupos caso e controle e nenhuma relação foi estabelecida entre os genótipos e a doença de Alzheimer.

Em relação à associação do polimorfismo WRN Cys1367Arg com o risco de câncer, Khayat et al (2005) analisando a relação entre o polimorfismo e a susceptibilidade ao câncer gástrico, obtiveram frequências alélicas de Cys = 0,73 e Arg = 0,27 e observaram que esses valores foram próximos aos obtidos para o grupo controle; porém, observaram uma frequência mais alta do genótipo Arg/Arg entre os portadores de câncer gástrico.

Estudos realizados por Ding et al (2007) em câncer de mama avaliaram a associação entre o polimorfismo WRN Cys1367Arg e o risco de desenvolvimento desse tipo de tumor e foi observada uma forte correlação entre alelo Arg1367 e o câncer de mama ($p=0,002$). Resultados semelhantes foram obtidos por Wirtenberger et al (2006), onde foram observadas fortes relações entre o alelo Arg1367 com o câncer de mama familiar e o câncer de mama de alto risco.

Em nosso estudo, não observamos nenhuma correlação entre o polimorfismo WRN Cys1367Arg e a susceptibilidade aos tumores extra-axiais do sistema nervoso, sendo que as frequências do alelo Arg1367 foram próximas entre as populações caso e controle (0,12 e 0,22 respectivamente). Quando analisamos a relação da frequência genotípica entre os sexos masculino e feminino, observamos que o genótipo Cys/Cys é mais comum entre mulheres ($p=0,0007$). Em relação aos tumores de sistema nervoso, Pinto et al (2008) realizaram um estudo caso-controle a para avaliar a relação deste polimorfismo com o risco de gliomas e, assim como em nosso trabalho, não observaram nenhuma associação significativa; as frequências observadas para o alelo Arg1367 ficaram muito próximas, 0,26 entre os pacientes e 0,22 entre o grupo controle.

As glutatona S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas que atuam principalmente em processos de desintoxicação, catalizando a conjugação de muitos componentes hidrofóbicos e eletrofilicos através de reações de redução da glutatona. Com base em suas propriedades bioquímicas, imunológicas e estruturais, as GSTs são agrupadas em quatro classes: GSTA, GSTM, GSTP e GSTT. Os membros da família de GSTs são conhecidos por apresentarem vários polimorfismos funcionais; variantes

polimórficas de GSTP-1, por exemplo, provocam alterações relacionadas ao metabolismo de xenobióticos e estão envolvidas na susceptibilidade a diversos tipos de câncer e outras doenças.

GSTP-1 é o membro da família de GSTs cujo produto gênico se encontra fortemente expresso no cérebro. Ele apresenta um polimorfismo de base única muito estudado atualmente em cânceres, a substituição A313G, que resulta na mudança do aminoácido Ile em Val na posição 105. Essa variante não é muito comum entre indivíduos caucasinos. Em populações saudáveis, 51% dos indivíduos são homocigotos para o alelo selvagem Ile/Ile, 43% são heterocigotos Ile/Val e apenas 6% são homocigotos para o alelo polimórfico Val/Val. A substituição GSTP-1 Ile105Val está localizada próxima ao sítio de ligação ao substrato, podendo provocar uma redução da atividade enzimática de GSTP-1 (Morales et al, 2008).

Em nosso estudo, as frequências genótípicas observadas entre os pacientes foram muito próximas às apresentadas acima: 53,3% Ile/Ile, 41,1% Ile/Val e 5,6% Val/Val, porém encontramos diferenças significativas quando comparamos essas frequências com as obtidas para o grupo controle: 87% Ile/Ile e 13% Ile/Val ($p < 0,0001$), sendo que a ocorrência da variante polimórfica Val/Val não foi observada entre os controles. Também observamos diferenças entre as frequências alélicas; a frequência de Val105 foi de 0,26 entre os pacientes e 0,07 entre os controles ($p = 0,037$), sugerindo que o alelo polimórfico Val105 pode estar envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de meningiomas, schwannomas e metástases.

Vários outros estudos também encontraram essa relação do alelo Val105 com o risco de cânceres. Reszka et al (2007) analisaram a influência desse polimorfismo no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Eles observaram um grande acúmulo de agentes oxidantes no sangue de indivíduos que possuíam a variante Arg105 e encontraram também maiores frequências genéticas de Arg/Arg entre pacientes com câncer de pulmão do que no grupo controle. Saxena et al (2008) realizaram um estudo caso-controle em indivíduos da população do norte da Índia, na tentativa de avaliar a relação entre o polimorfismo GSTP-1 Ile105 Val e o risco de câncer de mama. Foi observada uma chance 2,6 vezes maior de desenvolvimento desse tipo de câncer nos indivíduos portadores do genótipo Arg/Arg. Kadouri et al (2008) analisaram a influência do polimorfismo Ile105Val em pacientes com câncer de mama que também apresentavam mutações no gene BRCA e observaram um risco 3,2 vezes maior entre os portadores do alelo Arg105, sugerindo que a presença da variante Arg105 pode estar

associada com o desenvolvimento do câncer de mama. Nossos resultados concordam com os anteriores, pois observamos um aumento de quase 6 vezes do risco de câncer entre os portadores do alelo Val105 (IC, 2,93 – 11,98; $p < 0,0001$).

Ye et al (2006), realizaram um estudo envolvendo 23.000 indivíduos portadores de pulmão e 30.000 controles e não observaram nenhuma correlação entre o polimorfismo GSTP-1 Ile/Val e o risco de câncer de pulmão. Wideroff et al (2007) também não encontraram nenhuma relação entre o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e a presença da variante polimórfica Val105 do gene GSTP-1.

Existem poucos estudos que relacionam o polimorfismo GSTP-1 Ile105Val ao risco de tumores do sistema nervoso e os resultados obtidos nesses estudos são controversos. De Roos et al (2003) analisaram 422 portadores de gliomas, 172 portadores de meningiomas e 79 de schwannomas e observaram que a presença do genótipo Val/Val estava associada com o aumento da incidência de gliomas e schwannomas, sendo que esse risco aumentava de acordo com o número de alelos Val (1,3 vezes em Ile/Val e 2,1 vezes em Va/Val). Schwartzbaum et al (2007) analisaram 329 casos de glioblastomas e 546 meningiomas e não encontraram associações entre o risco de tumores de sistema nervoso e a presença do polimorfismo GSTP-1 Ile105Val. Em nosso trabalho, pudemos observar que a presença do alelo Val105 está relacionada principalmente com os meningiomas ($p=0,042$), mas não apresentou relação com schwannomas e metástases, discordando dos trabalhos acima. Esta falta de relação pode ser devido ao baixo número de schwannomas e metástases estudadas por nós.

O gene EGF juntamente com TGF α , epiregulinas, betacelulinas e anfiregulinas constituem a superfamília EGF de fatores de crescimento. Essa classe de genes está envolvida com a síntese de DNA, proliferação celular e estímulos mitogênicos nos tecidos epidermais. O produto gênico de EGF atua como um sinal mitogênico na célula, que ativa a síntese de DNA e a proliferação celular. Dessa forma, a hiperexpressão de EGF pode levar a um aumento dos níveis de diferenciação e proliferação, inibir apoptose e acentuar a capacidade de invasão de células cancerosas em muitos tipos de tumores, incluindo tumores do sistema nervoso (Harari et al, 2007).

O polimorfismo mais bem estudado de EGF consiste da substituição de uma guanina (G) por adenina (A) na região 5' UTR do gene. Estudos indicam que esse polimorfismo está associado com o risco de desenvolvimento de alguns tipos de tumores, como melanoma, glioblastoma multiforme e câncer gástrico. Em melanoma foi observado que pacientes portadores do alelo G apresentaram um relativo aumento do

risco de câncer, quando comparados com a população normal. Em glioblastoma multiforme e câncer gástrico também foi observado que a presença do alelo G é um fator de risco para a carcinogênese (Kang et al, 2007).

Em nosso trabalho foi avaliada a relação entre o polimorfismo de EGF e o risco do desenvolvimento de tumores extra-axiais do sistema nervoso. Avaliamos um total de 90 pacientes e 100 controles e observamos diferenças nas frequências genótípicas entre os grupos analisados ($p < 0,0001$). Entre os pacientes, as frequências foram de 74,4% para G/G, 23,3% para G/A e 2,3% para A/A, e entre o grupo controle as frequências foram de 32% (G/G), 45% (G/A) e 23% (A/A), indicando que a presença do alelo G pode estar associada à formação desses tumores. Quando avaliamos a presença do alelo G e sua associação ao risco de câncer, observamos que portadores do alelo G apresentaram 13 vezes mais chance de desenvolverem câncer ($p < 0,0001$) e ainda, quando se trata do genótipo G/G, esses indivíduos apresentam uma chance ainda maior (OD=24,07; IC, 5,34 – 32,50; $p < 0,0001$). Pudemos observar também uma diferença significativa entre as variantes e o grau tumoral, onde o alelo G foi encontrado com maior frequência entre os pacientes portadores de tumores de baixo grau ($p = 0,001$) e este mesmo alelo foi encontrado em menor proporção em meningiomas ($p = 0,026$).

Concordando com os resultados obtidos nesse trabalho, Wu et al (2009) analisaram 157 pacientes portadores de câncer colorretal e observaram que a distribuição do genótipo homocigoto G/G foi mais frequente entre os pacientes do que entre o grupo controle (33,1% em paciente e 11,1% em controles), assim como a frequência alélica de G (51,3% em pacientes e 33,3% em controles) e, através desses dados, concluíram que o genótipo EGF + 61 G/G e a presença do alelo G estão significativamente relacionados ao câncer colorretal. Vishnoi et al (2008) analisaram a influência do polimorfismo EGF + 61 sobre o risco de câncer de bexiga em 126 pacientes e 190 indivíduos saudáveis. Eles observaram que o genótipo G/G estava fortemente associado ao câncer e observaram ainda que o risco foi maior no sexo feminino ($p = 0,003$). Entre os tumores de sistema nervoso, o polimorfismo EGF + 61 é bastante estudado em glioblastomas, porém, não existem trabalhos que relacionem este polimorfismo aos tumores extra-axiais. Vauleon et al (2007) avaliaram 209 pacientes com glioblastoma e 214 controles e observaram a presença de G/G em 21,1% dos pacientes e 14% dos controles. Costa et al (2007) avaliaram a associação entre o polimorfismo EGF + 61 e o risco de desenvolvimento de gliomas, seus resultados demonstraram que a presença do alelo G confere alto risco de desenvolvimento desse tipo de tumor e que a presença do genótipo

G/G aumenta em aproximadamente 1,50 vezes o risco de desenvolvimento de gliomas, glioblastomas e oligodentrogliomas.

Existem outros trabalhos que relacionam a presença da variante polimórfica A/A ao risco de cânceres. Upadhyay et al (2008) estudaram a influência do polimorfismo EGF + 61 em 174 pacientes portadores de câncer de esôfago e seus resultados mostraram que a presença do genótipo A/A estava significativamente associada à susceptibilidade a esse tipo de tumor, principalmente em indivíduos do sexo masculino. Outros trabalhos não encontram nenhuma associação entre esse polimorfismo e o risco de câncer. Gao et al (2008) analisaram 173 pacientes portadores de tumores de nasofaringe e não observaram nenhuma influência do polimorfismo EGF + 61 G/A no risco de câncer. Wang et al (2008) analisaram as relações entre o risco de câncer de mama em mulheres chinesas e a presença do polimorfismo EGF + 61 e não observaram nenhuma diferença significativa entre os grupos caso e controle, sugerindo que este polimorfismo não está relacionado com o risco de câncer de mama.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que somente o polimorfismo WRN Cys1367Arg não apresentou nenhuma associação com a formação e/ou progressão dos tumores extra-axiais do sistema nervoso, mas, observamos a associação entre o genótipo Cys/Cys e indivíduos do sexo feminino.

Analisando os polimorfismos Pro47Ser e Arg72Pro do gene TP53, pudemos perceber que a presença da variante polimórfica Ser47 está fortemente relacionada com os portadores de tumores extra-axiais e ainda que, tanto a presença da variante Ser47 como Pro72 aumentam o risco desses tumores.

Em relação ao gene GSTP-1, concluímos que o alelo Val105 foi mais freqüente entre os indivíduos com câncer e que a presença desse alelo na população estudada aumentou o risco de câncer em quase 6 vezes entre seus portadores.

Finalmente, observamos que a freqüência do genótipo selvagem G/G do polimorfismo EGF + 61 foi maior entre os pacientes (principalmente entre os portadores de tumores de baixo grau) do que entre o grupo controle e a presença desse alelo pode estar influenciando no risco de desenvolvimento de meningiomas, schwannomas e metástases nos indivíduos estudados.

IV. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M. R.; MOAVEN, O.; SIMA, H. R.; GHAFARZADEGAN, K.; A'RABI, A.; FORGHANI, M. N.; RAZIEE, H. R.; MASHHADINEJAD, A.; JAFARZADEH, M.; ESMAILI-SHANDIZ, E.; DADKHAH, E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.14, n.13, p.2055-60, Apr 7. 2008.

AGIRRE, X.; NOVO, F. J.; CALASANZ, M. J.; LARRAYOZ, M. J.; LAHORTIGA, I.; VALGANON, M.; GARCIA-DELGADO, M.; VIZMANOS, J. L. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. **Mol Carcinog**, v.38, n.4, p.201-8, Dec. 2003.

AGRELO, R.; CHENG, W. H.; SETIEN, F.; ROPERO, S.; ESPADA, J.; FRAGA, M. F.; HERRANZ, M.; PAZ, M. F.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; ARTIGA, M. J.; GUERRERO, D.; CASTELLS, A.; VON KOBBE, C.; BOHR, V. A.; ESTELLER, M. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.23, p.8822-7, Jun 6. 2006.

AKIYAMA, Y.; MAESAWA, C.; OGASAWARA, S.; TERASHIMA, M.; MASUDA, T. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. **Am J Pathol**, v.163, n.5, p.1911-9, Nov. 2003.

AL-MEHDI, A. B.; TOZAWA, K.; FISHER, A. B.; SHIENTAG, L.; LEE, A.; MUSCHEL, R. J. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. **Nat Med**, v.6, n.1, p.100-2, Jan. 2000.

AMATYA, V. J.; TAKESHIMA, Y.; INAI, K. Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. **Mod Pathol**, v.17, n.6, p.705-10, Jun. 2004.

ARAUJO, A.; RIBEIRO, R.; AZEVEDO, I.; COELHO, A.; SOARES, M.; SOUSA, B.; PINTO, D.; LOPES, C.; MEDEIROS, R.; SCAGLIOTTI, G. V. Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer--a review of the literature. **Oncologist**, v.12, n.2, p.201-10, Feb. 2007.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v.2 Suppl 1, p.S4-11, Dec. 2005.

BELINSKY, S. A.; NIKULA, K. J.; PALMISANO, W. A.; MICHELS, R.; SACCOMANNO, G.; GABRIELSON, E.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Aberrant

methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.20, p.11891-6, Sep 29. 1998.

BELLO, M. J.; MARTINEZ-GLEZ, V.; FRANCO-HERNANDEZ, C.; PEFLA-GRANERO, C.; DE CAMPOS, J. M.; ISLA, A.; LASSALETTA, L.; VAQUERO, J.; REY, J. A. DNA methylation pattern in 16 tumor-related genes in schwannomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v.172, n.1, p.84-6, Jan 1. 2007.

BELLO, M. J.; AMINOSO, C.; LOPEZ-MARIN, I.; ARJONA, D.; GONZALEZ-GOMEZ, P.; ALONSO, M. E.; LOMAS, J.; DE CAMPOS, J. M.; KUSAK, M. E.; VAQUERO, J.; ISLA, A.; GUTIERREZ, M.; SARASA, J. L.; REY, J. A. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. **Acta Neuropathol (Berl)**, v.108, n.5, p.413-21, Nov. 2004.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v.9, n.16, p.2395-402, Oct. 2000.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v.16, n.1, p.6-21, Jan 1. 2002.

BIRD, A.; TATE, P.; NAN, X.; CAMPOY, J.; MEEHAN, R.; CROSS, S.; TWEEEDIE, S.; CHARLTON, J.; MACLEOD, D. Studies of DNA methylation in animals. **J Cell Sci Suppl**, v.19, p.37-9. 1995.

BIROS, E.; KALINA, I.; KOHUT, A.; BOGYIOVA, E.; SALAGOVIC, J.; SULLA, I. Allelic and haplotype frequencies of the p53 polymorphisms in brain tumor patients. **Physiol Res**, v.51, n.1, p.59-64. 2002.

BLANK, A.; BOBOLA, M. S.; GOLD, B.; VARADARAJAN, S.; D, D. K.; MEADE, E. H.; RABINOVITCH, P. S.; LOEB, L. A.; SILBER, J. R. The Werner syndrome protein confers resistance to the DNA lesions N3-methyladenine and O6-methylguanine: implications for WRN function. **DNA Repair (Amst)**, v.3, n.6, p.629-38, Jun 3. 2004.

BOHR, V. A.; METTER, E. J.; HARRIGAN, J. A.; VON KOBBE, C.; LIU, J. L.; GRAY, M. D.; MAJUMDAR, A.; WILSON, D. M., 3RD; SEIDMAN, M. M. Werner syndrome protein 1367 variants and disposition towards coronary artery disease in Caucasian patients. **Mech Ageing Dev**, v.125, n.7, p.491-6, Jul. 2004.

BONAFE, M.; SALVIOLI, S.; BARBI, C.; MISHTO, M.; TRAPASSI, C.; GEMELLI, C.; STORCI, G.; OLIVIERI, F.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. p53 codon

72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.299, n.4, p.539-41, Dec 13. 2002.

BOSTROM, J.; MEYER-PUTTLITZ, B.; WOLTER, M.; BLASCHKE, B.; WEBER, R. G.; LICHTER, P.; ICHIMURA, K.; COLLINS, V. P.; REIFENBERGER, G. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. **Am J Pathol**, v.159, n.2, p.661-9, Aug. 2001.

BHOWMICK, D. A.; ZHUANG, Z.; WAIT, S. D.; WEIL, R. J. A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. **Cancer Res**, v.64, n.4, p.1220-3, Feb 15. 2004.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v.234, n.2, p.177-86, Jul 8. 1999.

BUCKNER, J. C.; BROWN, P. D.; O'NEILL, B. P.; MEYER, F. B.; WETMORE, C. J.; UHM, J. H. Central nervous system tumors. **Mayo Clin Proc**, v.82, n.10, p.1271-86, Oct. 2007.

CASTRO, E.; OGBURN, C. E.; HUNT, K. E.; TILVIS, R.; LOUHIJA, J.; PENTTINEN, R.; ERKKOLA, R.; PANDURO, A.; Riestra, R.; PIUSSAN, C.; DEEB, S. S.; WANG, L.; EDLAND, S. D.; MARTIN, G. M.; OSHIMA, J. Polymorphisms at the Werner locus: I. Newly identified polymorphisms, ethnic variability of 1367Cys/Arg, and its stability in a population of Finnish centenarians. **Am J Med Genet**, v.82, n.5, p.399-403, Feb 19. 1999.

CHEN, A. M.; JAHAN, T. M.; JABLONS, D. M.; GARCIA, J.; LARSON, D. A. Risk of cerebral metastases and neurological death after pathological complete response to neoadjuvant therapy for locally advanced nonsmall-cell lung cancer: clinical implications for the subsequent management of the brain. **Cancer**, v.109, n.8, p.1668-75, Apr 15. 2007.

COSTA, S.; PINTO, D.; PEREIRA, D.; RODRIGUES, H.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.; MEDEIROS, R.; SCHMITT, F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. **BMC Cancer**, v.8, p.32. 2008.

COSTA, B.M.; FERREIRA, P.; COSTA, S.; CANEDO, P.; OLIVEIRA, P.; SILVA, A.; PARDAL, F.; SURIANO, G.; MACHADO, J.C.; LOPES, J.M.; REIS, R.M. Association between functional EGF + 61 polymorphism and glioma risk. **Clin Cancer Res**, v.13, p.2621-2626, 2007.

COSTELLO, J. F.; PLASS, C. Methylation matters. **J Med Genet**, v.38, n.5, p.285-303, May. 2001.

CRAIG, M. J.; LOBERG, R. D. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. **Cancer Metastasis Rev**, v.25, n.4, p.611-9, Dec. 2006.

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA methylation and cancer. **J Clin Oncol**, v.22, n.22, p.4632-42, Nov 15. 2004.

DE ROOS, A. J.; ROTHMAN, N.; INSKIP, P. D.; LINET, M. S.; SHAPIRO, W. R.; SELKER, R. G.; FINE, H. A.; BLACK, P. M.; PITTMAN, G. S.; BELL, D. A. Genetic polymorphisms in GSTM1, -P1, -T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.12, n.1, p.14-22, Jan. 2003.

DENG, Y.; YAO, L.; CHAU, L.; NG, S. S.; PENG, Y.; LIU, X.; AU, W. S.; WANG, J.; LI, F.; JI, S.; HAN, H.; NIE, X.; LI, Q.; KUNG, H. F.; LEUNG, S. Y.; LIN, M. C. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. **Int J Cancer**, v.106, n.3, p.342-7, Sep 1. 2003.

DING, S. L.; YU, J. C.; CHEN, S. T.; HSU, G. C.; SHEN, C. Y. Genetic variation in the premature aging gene WRN: a case-control study on breast cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.16, n.2, p.263-9, Feb. 2007.

DOMANSKI, H. A.; AKERMAN, M.; ENGELLAU, J.; GUSTAFSON, P.; MERTENS, F.; RYDHOLM, A. Fine-needle aspiration of neurilemoma (schwannoma). A clinicocytopathologic study of 116 patients. **Diagn Cytopathol**, v.34, n.6, p.403-12, Jun. 2006.

DREVELEGAS, A. Extra-axial brain tumors. **Eur Radiol**, v.15, n.3, p.453-67, Mar. 2005.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v.429, n.6990, p.457-63, May 27. 2004.

ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. **Annu Rev Genet**, v.26, p.479-506. 1992.

ESTELLER, M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. **Curr Opin Oncol**, v.17, n.1, p.55-60, Jan. 2005a.

ESTELLER, M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. **J Pathol**, v.205, n.2, p.172-80, Jan. 2005b.

ESTELLER, M.; FRAGA, M. F.; PAZ, M. F.; CAMPO, E.; COLOMER, D.; NOVO, F. J.; CALASANZ, M. J.; GALM, O.; GUO, M.; BENITEZ, J.; HERMAN, J.

G. Cancer epigenetics and methylation. **Science**, v.297, n.5588, p.1807-8; discussion 1807-8, Sep 13. 2002.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol**, v.196, n.1, p.1-7, Jan. 2002.

ESTELLER, M.; CORN, P. G.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res**, v.61, n.8, p.3225-9, Apr 15. 2001.

ESTELLER, M.; CORN, P. G.; URENA, J. M.; GABRIELSON, E.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Res**, v.58, n.20, p.4515-8, Oct 15. 1998.

FAZZARI, M. J.; GREALLY, J. M. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nat Rev Genet**, v.5, n.6, p.446-55, Jun. 2004.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet**, v.7, n.1, p.21-33, Jan. 2006.

FEINBERG, A. P.; CUI, H.; OHLSSON, R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. **Semin Cancer Biol**, v.12, n.5, p.389-98, Oct. 2002.

FELLEY-BOSCO, E.; WESTON, A.; CAWLEY, H. M.; BENNETT, W. P.; HARRIS, C. C. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. **Am J Hum Genet**, v.53, n.3, p.752-9, Sep. 1993.

FRAGA, M. F.; HERRANZ, M.; ESPADA, J.; BALLESTAR, E.; PAZ, M. F.; ROPERO, S.; ERKEK, E.; BOZDOGAN, O.; PEINADO, H.; NIVELEAU, A.; MAO, J. H.; BALMAIN, A.; CANO, A.; ESTELLER, M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. **Cancer Res**, v.64, n.16, p.5527-34, Aug 15. 2004.

FRAGA, M. F.; BALLESTAR, E.; MONTOYA, G.; TAYSAVANG, P.; WADE, P. A.; ESTELLER, M. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.6, p.1765-74, Mar 15. 2003.

FRANCO-HERNANDEZ, C.; MARTINEZ-GLEZ, V.; DE CAMPOS, J. M.; ISLA, A.; VAQUERO, J.; REY, J. A. Detection of gene amplification and copy gains in brain metastases of solid tumors using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Cancer Genet Cytogenet**, v.182, n.1, p.61-2, Apr 1. 2008.

FRANCO-HERNANDEZ, C.; MARTINEZ-GLEZ, V.; ARJONA, D.; DE CAMPOS, J. M.; ISLA, A.; GUTIERREZ, M.; VAQUERO, J.; REY, J. A. EGFR sequence variations and real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of gene dosage in brain metastases of solid tumors. **Cancer Genet Cytogenet**, v.173, n.1, p.63-7, Feb. 2007.

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.5, p.1827-31, Mar 1. 1992.

FUJIWARA, S.; NOGUCHI, T.; TAKENO, S.; KIMURA, Y.; FUMOTO, S.; KAWAHARA, K. Hypermethylation of p16 gene promoter correlates with loss of p16 expression that results in poorer prognosis in esophageal squamous cell carcinomas. **Dis Esophagus**, v.21, n.2, p.125-31. 2008.

FUKS, F.; BURGERS, W. A.; GODIN, N.; KASAI, M.; KOUZARIDES, T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. **Embo J**, v.20, n.10, p.2536-44, May 15. 2001.

GAO, L. B.; WEI, Y. S.; ZHOU, B.; WANG, Y. Y.; LIANG, W. B.; LI, C.; LI, Y.; BAI, P.; FANG, W. L.; XUE, H.; ZHANG, L. No association between epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v.185, n.2, p.69-73, Sep. 2008.

GONZALEZ-GOMEZ, P.; BELLO, M. J.; ALONSO, M. E.; LOMAS, J.; ARJONA, D.; CAMPOS, J. M.; VAQUERO, J.; ISLA, A.; LASSALETTA, L.; GUTIERREZ, M.; SARASA, J. L.; REY, J. A. CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. **Clin Cancer Res**, v.9, n.15, p.5601-6, Nov 15. 2003.

GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B. O.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation in development and human disease. **Mutat Res**, v.647, n.1-2, p.30-8, Dec 1. 2008.

GORUNOVA, L.; DAWISKIBA, S.; ANDREN-SANDBERG, A.; HOGLUND, M.; JOHANSSON, B. Extensive cytogenetic heterogeneity in a benign retroperitoneal schwannoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v.127, n.2, p.148-54, Jun. 2001.

GOWHER, H.; LIEBERT, K.; HERMANN, A.; XU, G.; JELTSCH, A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-

(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. **J Biol Chem**, v.280, n.14, p.13341-8, Apr 8. 2005.

GURU, S. C.; MANICKAM, P.; CRABTREE, J. S.; OLUFEMI, S. E.; AGARWAL, S. K.; DEBELENKO, L. V. Identification and characterization of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. **J Intern Med**, v.243, n.6, p.433-9, Jun. 1998.

GUTMANN, D. H.; DONAHOE, J.; PERRY, A.; LEMKE, N.; GORSE, K.; KITTINIYOM, K.; REMPEL, S. A.; GUTIERREZ, J. A.; NEWSHAM, I. F. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. **Hum Mol Genet**, v.9, n.10, p.1495-500, Jun 12. 2000.

HADHRI-GUIGA, B.; TOUMI, N.; KHABIR, A.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; GHORBEL, A.; DAOUD, J.; FRIKHA, M.; GARGOURI, A.; MOKDAD-GARGOURI, R. Proline homozygosity in codon 72 of TP53 is a factor of susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in Tunisia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.178, n.2, p.89-93, Oct 15. 2007.

HANEMANN, C. O.; EVANS, D. G. News on the genetics, epidemiology, medical care and translational research of Schwannomas. **J Neurol**, v.253, n.12, p.1533-41, Dec. 2006.

HARARI, P. M.; ALLEN, G. W.; BONNER, J. A. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. **J Clin Oncol**, v.25, n.26, p.4057-65, Sep 10. 2007.

HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v.61, n.3, p.154-66, Sep. 2000.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.18, p.9821-6, Sep 3. 1996.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v.349, n.21, p.2042-54, Nov 20. 2003.

HERMANN, A.; GOYAL, R.; JELTSCH, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. **J Biol Chem**, v.279, n.46, p.48350-9, Nov 12. 2004.

HISHIDA, A.; MATSUO, K.; TAJIMA, K.; OGURA, M.; KAGAMI, Y.; TAJI, H.; MORISHIMA, Y.; EMI, N.; NAOE, T.; HAMAJIMA, N. Polymorphisms of p53

Arg72Pro, p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p21 Ser31Arg and the risk of non-Hodgkin's lymphoma in Japanese. **Leuk Lymphoma**, v.45, n.5, p.957-64, May. 2004.

HORIGUCHI, K.; TOMIZAWA, Y.; TOSAKA, M.; ISHIUCHI, S.; KURIHARA, H.; MORI, M.; SAITO, N. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. **Oncogene**, v.22, n.49, p.7862-5, Oct 30. 2003.

HURT, E. M.; THOMAS, S. B.; PENG, B.; FARRAR, W. L. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. **Cancer Biol Ther**, v.5, n.9, p.1154-60, Sep. 2006.

IDBAIH, A.; BOISSELIER, B.; MARIE, Y.; EL HALLANI, S.; SANSON, M.; CRINIERE, E.; RODERO, M.; CARPENTIER, C.; PARIS, S.; LAIGLE-DONADEY, F.; DUCRAY, F.; HOANG-XUAN, K.; DELATTRE, J. Y. TP53 codon 72 polymorphism, p53 expression, and 1p/19q status in oligodendroglial tumors. **Cancer Genet Cytogenet**, v.177, n.2, p.103-7, Sep. 2007.

IKEDA, T.; HASHIMOTO, S.; FUKUSHIGE, S.; OHMORI, H.; HORII, A. Comparative genomic hybridization and mutation analyses of sporadic schwannomas. **J Neurooncol**, v.72, n.3, p.225-30, May. 2005.

JAIR, K. W.; BACHMAN, K. E.; SUZUKI, H.; TING, A. H.; RHEE, I.; YEN, R. W.; BAYLIN, S. B.; SCHUEBEL, K. E. De novo CpG island methylation in human cancer cells. **Cancer Res**, v.66, n.2, p.682-92, Jan 15. 2006.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin**, v.57, n.1, p.43-66, Jan-Feb. 2007.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v.293, n.5532, p.1074-80, Aug 10. 2001.

JIANG, W.; ROEMER, M. E.; NEWSHAM, I. F. The tumor suppressor DAL-1/4.1B modulates protein arginine N-methyltransferase 5 activity in a substrate-specific manner. **Biochem Biophys Res Commun**, v.329, n.2, p.522-30, Apr 8. 2005.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v.3, n.6, p.415-28, Jun. 2002.

JONES, P. L.; VEENSTRA, G. J.; WADE, P. A.; VERMAAK, D.; KASS, S. U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, v.19, n.2, p.187-91, Jun. 1998.

KADOURI, L.; KOTE-JARAI, Z.; HUBERT, A.; BARAS, M.; ABELIOVICH, D.; HAMBURGER, T.; PERETZ, T.; EELES, R. A. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. **Br J Cancer**, v.98, n.12, p.2006-10, Jun 17. 2008.

KANG, S.; KIM, J. W.; PARK, N. H.; SONG, Y. S.; PARK, S. Y.; KANG, S. B.; LEE, H. P. Epidermal growth factor 61 A/G polymorphism and uterine cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v.17, n.2, p.492-6, Mar-Apr. 2007.

KANG, J. H.; KIM, S. J.; NOH, D. Y.; PARK, I. A.; CHOE, K. J.; YOO, O. J.; KANG, H. S. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. **Lab Invest**, v.81, n.4, p.573-9, Apr. 2001.

KASHIMA, T.; MAKINO, K.; SOEMANTRI, A.; ISHIDA, T. TP53 codon 72 polymorphism in 12 populations of insular Southeast Asia and Oceania. **J Hum Genet**, v.52, n.8, p.694-7. 2007.

KHAYAT, A. S.; LOBO GATTI, L.; MOURA LIMA, E.; DE ASSUMPCAO, P. P.; NASCIMENTO MOTTA, F. J.; HARADA, M. L.; CASARTELLI, C.; MARQUES PAYAO, S. L.; CARDOSO SMITH, M. A.; BURBANO, R. R. Polymorphisms of the TP53 codon 72 and WRN codon 1367 in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **Clin Exp Med**, v.5, n.4, p.161-8, Dec. 2005.

KELLY, T. L.; TRASLER, J. M. Reproductive epigenetics. **Clin Genet**, v.65, n.4, p.247-60, Apr. 2004.

KLEIHUES, P.; LOUIS, D. N.; SCHEITHAUER, B. W.; RORKE, L. B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P. C.; CAVENEE, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.61, n.3, p.215-25; discussion 226-9, Mar. 2002.

KIRK, B. W.; FEINSOD, M.; FAVIS, R.; KLIMAN, R. M.; BARANY, F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.15, p.3295-311, Aug 1. 2002.

KIRSCHNER, L. S.; SANDRINI, F.; MONBO, J.; LIN, J. P.; CARNEY, J. A.; STRATAKIS, C. A. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. **Hum Mol Genet**, v.9, n.20, p.3037-46, Dec 12. 2000.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**, Jan 3. 2006.

KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Hum Genet**, v.90, n.1-2, p.41-54, Sep-Oct. 1992.

KUNINGAS, M.; SLAGBOOM, P. E.; WESTENDORP, R. G.; VAN HEEMST, D. Impact of genetic variations in the WRN gene on age related pathologies and mortality. **Mech Ageing Dev**, v.127, n.3, p.307-13, Mar. 2006.

KURODA, Y.; TSUKINO, H.; NAKAO, H.; IMAI, H.; KATO, T. p53 Codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. **Cancer Lett**, v.189, n.1, p.77-83, Jan 10. 2003.

LAIRD, P. W. Cancer epigenetics. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, p.R65-76, Apr 15. 2005.

LAURENCE, D. J.; GUSTERSON, B. A. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. **Tumour Biol**, v.11, n.5, p.229-61. 1990.

LAZAR, L. M.; BLUM, M. Regional distribution and developmental expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α mRNA in mouse brain by a quantitative nuclease protection assay. **J Neurosci**, v.12, n.5, p.1688-97, May. 1992.

LEE, Y. Y.; KANG, S. H.; SEO, J. Y.; JUNG, C. W.; LEE, K. U.; CHOE, K. J.; KIM, B. K.; KIM, N. K.; KOEFFLER, H. P.; BANG, Y. J. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. **Cancer**, v.80, n.10, p.1889-96, Nov 15. 1997.

LEITE, J. L.; MANFRINATTO, J. A.; MAZZALI, M.; WARD, L. S. Polymorphisms at exon 4 of p53 and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients. **Transpl Int**, v.19, n.9, p.732-7, Sep. 2006.

LI, X.; DUMONT, P.; DELLA PIETRA, A.; SHETLER, C.; MURPHY, M. E. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. **J Biol Chem**, v.280, n.25, p.24245-51, Jun 24. 2005.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v.18, n.11, p.1427-31, Nov. 2002.

LIMA, E. M.; LEAL, M. F.; BURBANO, R. R.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPCAO, P. P.; BELLO, M. J.; REY, J. A.; SMITH, M. A.; CASARTELLI, C.

Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. **Braz J Med Biol Res**, v.41, n.6, p.539-43, Jun. 2008.

LIU, Y.; PANG, J. C.; DONG, S.; MAO, B.; POON, W. S.; NG, H. K. Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. **Hum Pathol**, v.36, n.4, p.416-25, Apr. 2005.

LOEB, L. A.; BIELAS, J. H.; BECKMAN, R. A. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. **Cancer Res**, v.68, n.10, p.3551-7; discussion 3557, May 15. 2008.

LOMAS, J.; AMINOSO, C.; GONZALEZ-GOMEZ, P.; EVA ALONSO, M.; ARJONA, D.; LOPEZ-MARIN, I.; DE CAMPOS, J. M.; ISLA, A.; VAQUERO, J.; GUTIERREZ, M.; SARASA, J. L.; JOSEFA BELLO, M.; REY, J. A. Methylation status of TP73 in meningiomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v.148, n.2, p.148-51, Jan 15. 2004.

LUSIS, E. A.; WATSON, M. A.; CHICOINE, M. R.; LYMAN, M.; ROERIG, P.; REIFENBERGER, G.; GUTMANN, D. H.; PERRY, A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. **Cancer Res**, v.65, n.16, p.7121-6, Aug 15. 2005.

LUSIS, E.; GUTMANN, D. H. Meningioma: an update. **Curr Opin Neurol**, v.17, n.6, p.687-92, Dec. 2004.

MAROSI, C.; HASSLER, M.; ROESSLER, K.; RENI, M.; SANT, M.; MAZZA, E.; VECHT, C. Meningioma. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.67, n.2, p.153-71, Aug. 2008.

MEEHAN, R. R.; LEWIS, J. D.; BIRD, A. P. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. **Nucleic Acids Res**, v.20, n.19, p.5085-92, Oct 11. 1992.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (Comprev) (2002). Atlas de Mortalidade por câncer no Brasil – 1979-1999. Rio de Janeiro: INCA, p.412. Os dados desta publicação estão disponíveis no site <http://www.inca.gov.br>.

MORALES, E.; SUNYER, J.; CASTRO-GINER, F.; ESTIVILL, X.; JULVEZ, J.; RIBAS-FITO, N.; TORRENT, M.; GRIMALT, J. O.; DE CID, R. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on cognitive functioning effects induced by p,p'-DDT among preschoolers. **Environ Health Perspect**, v.116, n.11, p.1581-5, Nov. 2008.

MOULDER, S. L.; YAKES, F. M.; MUTHUSWAMY, S. K.; BIANCO, R.; SIMPSON, J. F.; ARTEAGA, C. L. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v.61, n.24, p.8887-95, Dec 15. 2001.

MOYER, A. M.; SALAVAGGIONE, O. E.; WU, T. Y.; MOON, I.; ECKLOFF, B. W.; HILDEBRANDT, M. A.; SCHAID, D. J.; WIEBEN, E. D.; WEINSHILBOUM, R. M. Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. **Cancer Res**, v.68, n.12, p.4791-801, Jun 15. 2008.

MUFTUOGLU, M.; KUSUMOTO, R.; SPEINA, E.; BECK, G.; CHENG, W. H.; BOHR, V. A. Acetylation regulates WRN catalytic activities and affects base excision DNA repair. **PLoS ONE**, v.3, n.4, p.e1918. 2008.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. **Epigenetics**, v.3, n.4, p.210-5, Jul-Aug. 2008.

MURATA, M.; TAGAWA, M.; KIMURA, M.; KIMURA, H.; WATANABE, S.; SAISHO, H. Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. **Carcinogenesis**, v.17, n.2, p.261-4, Feb. 1996.

MURRELL, A.; RAKYAN, V. K.; BECK, S. From genome to epigenome. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, p.R3-R10, Apr 15. 2005.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v.278, n.1-2, p.25-31, Oct 31. 2001.

NAKAYAMA, J.; RICE, J. C.; STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D.; GREWAL, S. I. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. **Science**, v.292, n.5514, p.110-3, Apr 6. 2001.

NOZAKI, M.; TADA, M.; KASHIWAZAKI, H.; HAMOU, M. F.; DISERENS, A. C.; SHINOHE, Y.; SAWAMURA, Y.; IWASAKI, Y.; DE TRIBOLET, N.; HEGI, M. E. p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay

but p73 expression increases with tumor grade. **Brain Pathol**, v.11, n.3, p.296-305, Jul. 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol**, v.109, n.1, p.93-108, Jan. 2005.

OPRESKO, P. L.; CHENG, W. H.; VON KOBBE, C.; HARRIGAN, J. A.; BOHR, V. A. Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. **Carcinogenesis**, v.24, n.5, p.791-802, May. 2003.

PATCHELL, R. A.; TIBBS, P. A.; WALSH, J. W.; DEMPSEY, R. J.; MARUYAMA, Y.; KRYSCIO, R. J.; MARKESBERY, W. R.; MACDONALD, J. S.; YOUNG, B. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. **N Engl J Med**, v.322, n.8, p.494-500, Feb 22. 1990.

PAYAO, S. L.; DE LABIO, R. W.; GATTI, L. L.; RIGOLIN, V. O.; BERTOLUCCI, P. H.; SMITH MDE, A. Werner helicase polymorphism is not associated with Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v.6, n.6, p.591-4; discussion 673-81, Dec. 2004.

PAZ, M. F.; FRAGA, M. F.; AVILA, S.; GUO, M.; POLLAN, M.; HERMAN, J. G.; ESTELLER, M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. **Cancer Res**, v.63, n.5, p.1114-21, Mar 1. 2003.

PIECHA, G.; CHUDEK, J.; WIECEK, A. Multiple Endocrine Neoplasia type 1. **Eur J Intern Med**, v.19, n.2, p.99-103, Mar. 2008.

PIETSCH, E. C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M. E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v.25, n.11, p.1602-11, Mar 13. 2006.

PINTO, G. R.; YOSHIOKA, F. K.; SILVA, R. L.; CLARA, C. A.; SANTOS, M. J.; ALMEIDA, J. R.; BURBANO, R. R.; REY, J. A.; CASARTELLI, C. Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. **Genet Mol Res**, v.7, n.1, p.207-16. 2008.

PINTO, G. R.; YOSHIOKA, F. K.; CLARA, C. A.; SANTOS, M. J.; ALMEIDA, J. R.; BURBANO, R. R.; REY, J. A.; CASARTELLI, C. WRN Cys1367Arg SNP is not associated with risk and prognosis of gliomas in Southeast Brazil. **J Neurooncol**, v.90, n.3, p.253-8, Dec. 2008.

PIRZIO, L. M.; PICHIERRI, P.; BIGNAMI, M.; FRANCHITTO, A. Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. **J Cell Biol**, v.180, n.2, p.305-14, Jan 28. 2008.

POOT, M.; HOEHN, H.; RUNGER, T. M.; MARTIN, G. M. Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines. **Exp Cell Res**, v.202, n.2, p.267-73, Oct. 1992.

PRADHAN, S.; ESTEVE, P. O. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. **Clin Immunol**, v.109, n.1, p.6-16, Oct. 2003.

PRADOS, M. D.; BERGER, M. S.; WILSON, C. B. Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. **CA Cancer J Clin**, v.48, n.6, p.331-60, 321, Nov-Dec. 1998.

PRINCE, P. R.; EMOND, M. J.; MONNAT, R. J., JR. Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. **Genes Dev**, v.15, n.8, p.933-8, Apr 15. 2001.

PUTTONEN, S.; KELTIKANGAS-JARVINEN, L.; ELOVAINIO, M.; KIVIMAKI, M.; RONTU, R.; LEHTIMAKI, T. Temperamental activity and epidermal growth factor A61G polymorphism in Finnish adults. **Neuropsychobiology**, v.56, n.4, p.208-12. 2007.

REDDY, M. C.; VASQUEZ, K. M. Repair of genome destabilizing lesions. **Radiat Res**, v.164, n.4 Pt 1, p.345-56, Oct. 2005.

RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J. Antioxidant defense markers modulated by glutathione S-transferase genetic polymorphism: results of lung cancer case-control study. **Genes Nutr**, v.2, n.3, p.287-94, Dec. 2007.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Cmaj**, v.174, n.3, p.341-8, Jan 31. 2006.

RONNEBERG, J. A.; TOST, J.; SOLVANG, H. K.; ALNAES, G. I.; JOHANSEN, F. E.; BREDEFORD, E. M.; YAKHINI, Z.; GUT, I. G.; LONNING, P. E.; BORRESEN-DALE, A. L.; GABRIELSEN, O. S.; KRISTENSEN, V. N. GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. **Cancer Res**, v.68, n.14, p.5562-71, Jul 15. 2008.

RUFINI, V.; SALVATORI, M.; FADDA, G.; PINNARELLI, L.; CASTALDI, P.; MAUSSI, M. L.; GALLI, G. Thyroid carcinomas with a variable insular component: prognostic significance of histopathologic patterns. **Cancer**, v.110, n.6, p.1209-17, Sep 15. 2007.

RYBERG, D.; SKAUG, V.; HEWER, A.; PHILLIPS, D. H.; HARRIES, L. W.; WOLF, C. R.; OGREID, D.; ULVIK, A.; VU, P.; HAUGEN, A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. **Carcinogenesis**, v.18, n.7, p.1285-9, Jul. 1997.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J. C.; MORTIMORE, B. J.; WILLEY, D. L.; HUNT, S. E.; COLE, C. G.; COGGILL, P. C.; RICE, C. M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D. R.; KWOK, P. Y.; MARDIS, E. R.; YEH, R. T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R. H.; MCPHERSON, J. D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; VAN ETTEN, W. J.; REICH, D.; HIGGINS, J.; DALY, M. J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGE-THOMANN, N.; ZODY, M. C.; LINTON, L.; LANDER, E. S.; ALTSHULER, D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v.409, n.6822, p.928-33, Feb 15. 2001.

SAXENA, A.; DHILLON, V. S.; RAISH, M.; ASIM, M.; REHMAN, S.; SHUKLA, N. K.; DEO, S. V.; ARA, A.; HUSAIN, S. A. Detection and relevance of germline genetic polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTs) in breast cancer patients from northern Indian population. **Breast Cancer Res Treat**, Jun 24. 2008.

SCARANO, M. I.; STRAZZULLO, M.; MATARAZZO, M. R.; D'ESPOSITO, M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. **J Cell Physiol**, v.204, n.1, p.21-35, Jul. 2005.

SCHWARTZBAUM, J. A.; AHLBOM, A.; LONN, S.; WARHOLM, M.; RANNUG, A.; AUVINEN, A.; CHRISTENSEN, H. C.; HENRIKSSON, R.; JOHANSEN, C.; LINDHOLM, C.; MALMER, B.; SALMINEN, T.; SCHOEMAKER, M. J.; SWERDLOW, A. J.; FEYCHTING, M. An international case-control study of glutathione transferase and functionally related polymorphisms and risk of primary adult brain tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.16, n.3, p.559-65, Mar. 2007.

SHAHBAZI, M.; PRAVICA, V.; NASREEN, N.; FAKHOURY, H.; FRYER, A. A.; STRANGE, R. C.; HUTCHINSON, P. E.; OSBORNE, J. E.; LEAR, J. T.; SMITH, A. G.; HUTCHINSON, I. V. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. **Lancet**, v.359, n.9304, p.397-401, Feb 2. 2002.

SIDHU, S.; MARTIN, E.; GICQUEL, C.; MELKI, J.; CLARK, S. J.; CAMPBELL, P.; MAGAREY, C. J.; SCHULTE, K. M.; ROHER, H. D.; DELBRIDGE, L.; ROBINSON, B. G. Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. **Eur J Surg Oncol**, v.31, n.5, p.549-54, Jun. 2005.

SMIGIELSKI, E. M.; SIROTKIN, K.; WARD, M.; SHERRY, S. T. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.1, p.352-5, Jan 1. 2000.

STAFFORD, L. J.; VAIDYA, K. S.; WELCH, D. R. Metastasis suppressors genes in cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, v.40, n.5, p.874-91. 2008.

STIRZAKER, C.; SONG, J. Z.; DAVIDSON, B.; CLARK, S. J. Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. **Cancer Res**, v.64, n.11, p.3871-7, Jun 1. 2004.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors. **Expert Opin Investig Drugs**, v.11, n.6, p.747-54, Jun. 2002.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutat Res**, v.573, n.1-2, p.41-53, Jun 3. 2005.

SUTHERLAND, J. E.; COSTA, M. Epigenetics and the environment. **Ann N Y Acad Sci**, v.983, p.151-60, Mar. 2003.

TAKEUCHI, F.; HANAOKA, F.; GOTO, M.; YAMADA, M.; MIYAMOTO, T. Prolongation of S phase and whole cell cycle in Werner's syndrome fibroblasts. **Exp Gerontol**, v.17, n.6, p.473-80. 1982.

TEPEL, M.; ROERIG, P.; WOLTER, M.; GUTMANN, D. H.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; RIEMENSCHNEIDER, M. J. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. **Int J Cancer**, v.123, n.9, p.2080-6, Nov 1. 2008.

THWEATT, R.; GOLDSTEIN, S. Werner syndrome and biological ageing: a molecular genetic hypothesis. **Bioessays**, v.15, n.6, p.421-6, Jun. 1993.

TSUJIUCHI, T.; MASAOKA, T.; SUGATA, E.; ONISHI, M.; FUJII, H.; SHIMIZU, K.; HONOKI, K. Hypermethylation of the Dal-1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. **Mol Carcinog**, v.46, n.10, p.819-23, Oct. 2007.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZINSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cell Mol Biol Lett**, v.10, n.4, p.631-47. 2005.

TURNER, B. M. Cellular memory and the histone code. **Cell**, v.111, n.3, p.285-91, Nov 1. 2002.

UPADHYAY, R.; JAIN, M.; KUMAR, S.; GHOSHAL, U. C.; MITTAL, B. Interaction of EGFR 497Arg>Lys with EGF +61A>G polymorphism: modulation of risk in esophageal cancer. **Oncol Res**, v.17, n.4, p.167-74. 2008.

VAULEON, E.; AUGER, N.; AMIEL, A.B.; DONADEY, F.L.; KALOSHI, G.; LEJEUNE, J.; DELATTRE, J.Y.; THILLET, J.; SANSON, M. The 61 A/G EGF polymorphism is functional but is neither a prognostic marker nor a risk factor for glioblastoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.172, p.33-37, 2007.

VISHNOI, M.; PANDEY, S.M.; MODI, D.R.; KUMAR, A.; MITTAL, B. Genetic susceptibility of epidermal growth factor β 1 509C>T gene polymorphisms with gallbladder cancer. **Human Immunology**, v.69, p.360-367, 2008.

WANG, Y.; TIAN, T.; HU, Z.; TANG, J.; WANG, S.; WANG, X.; QIN, J.; HUO, X.; GAO, J.; KE, Q.; JIN, G.; MA, H.; WANG, X.; SHEN, H. EGF promoter SNPs, plasma EGF levels and risk of breast cancer in Chinese women. **Breast Cancer Res Treat**, v.111, n.2, p.321-7, Sep. 2008.

WARREN, C.; JAMES, L. A.; RAMSDEN, R. T.; WALLACE, A.; BASER, M. E.; VARLEY, J. M.; EVANS, D. G. Identification of recurrent regions of chromosome loss and gain in vestibular schwannomas using comparative genomic hybridisation. **J Med Genet**, v.40, n.11, p.802-6, Nov. 2003.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v.254, n.5035, p.1138-46, Nov 22. 1991.

WEINHOLD, B. Epigenetics: the science of change. **Environ Health Perspect**, v.114, n.3, p.A160-7, Mar. 2006.

WELCH, D. R.; COOPER, C. R.; HURST, D. R.; LYNCH, C. C.; MARTIN, M. D.; VAIDYA, K. S.; VANSANUN, M. N.; MASTRO, A. M. Metastasis Research Society-American Association For Cancer Research Joint Conference on Metastasis. **Cancer Res**, v.68, n.23, p.9578-82, Dec 1. 2008.

WIDEROFF, L.; VAUGHAN, T. L.; FARIN, F. M.; GAMMON, M. D.; RISCH, H.; STANFORD, J. L.; CHOW, W. H. GST, NAT1, CYP1A1 polymorphisms

and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. **Cancer Detect Prev**, v.31, n.3, p.233-6. 2007.

WIRTENBERGER, M.; FRANK, B.; HEMMINKI, K.; KLAES, R.; SCHMUTZLER, R. K.; WAPPENSCHMIDT, B.; MEINDL, A.; KIECHLE, M.; ARNOLD, N.; WEBER, B. H.; NIEDERACHER, D.; BARTRAM, C. R.; BURWINKEL, B. Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer. **Carcinogenesis**, v.27, n.8, p.1655-60, Aug. 2006.

WROBEL, G.; ROERIG, P.; KOKOCINSKI, F.; NEBEN, K.; HAHN, M.; REIFENBERGER, G.; LICHTER, P. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. **Int J Cancer**, v.114, n.2, p.249-56, Mar 20. 2005.

WU, G. Y.; HASENBERG, T.; MAGDEBURG, R.; BONNINGHOFF, R.; STURM, J. W.; KEESE, M. Association Between EGF, TGF-beta1, VEGF Gene Polymorphism and Colorectal Cancer. **World J Surg**, v.33, n.1, p.124-9, Jan. 2009.

YE, Z.; SONG, H.; HIGGINS, J. P.; PHAROAH, P.; DANESH, J. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. **PLoS Med**, v.3, n.4, p.e91, Apr. 2006.

YE, L.; MIKI, T.; NAKURA, J.; OSHIMA, J.; KAMINO, K.; RAKUGI, H.; IKEGAMI, H.; HIGAKI, J.; EDLAND, S. D.; MARTIN, G. M.; OGIHARA, T. Association of a polymorphic variant of the Werner helicase gene with myocardial infarction in a Japanese population. **Am J Med Genet**, v.68, n.4, p.494-8, Feb 11. 1997.

YEANG, C. H.; MCCORMICK, F.; LEVINE, A. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. **Faseb J**, v.22, n.8, p.2605-22, Aug. 2008.

YI, C.; MCCARTY, J. H.; TROUTMAN, S. A.; ECKMAN, M. S.; BRONSON, R. T.; KISSIL, J. L. Loss of the putative tumor suppressor band 4.1B/Dal1 gene is dispensable for normal development and does not predispose to cancer. **Mol Cell Biol**, v.25, n.22, p.10052-9, Nov. 2005.

YIN, J. Q.; WAN, Y. RNA-mediated gene regulation system: now and the future (Review). **Int J Mol Med**, v.10, n.4, p.355-65, Oct. 2002.

YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet**, v.13, n.8, p.335-40, Aug. 1997.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.497-503, Mar. 2000.

ZHU, Z. Z.; WANG, A. Z.; JIA, H. R.; JIN, X. X.; HE, X. L.; HOU, L. F.; ZHU, G. Association of the TP53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in a Chinese population. **Jpn J Clin Oncol**, v.37, n.5, p.385-90, May. 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)