

**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

## 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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

