

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

DANIEL DE ARAÚJO VIANA

POLIMORFISMOS DO GENE TP53 NO LINFOMA DE HODGKIN

FORTALEZA

2007

DANIEL DE ARAÚJO VIANA

POLIMORFISMOS DO GENE TP53 NO LINFOMA DE HODGKIN

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

FORTALEZA

2007

V667p Viana, Daniel de Araújo
Polimorfismos do gene TP53 no linfoma de Hodgkin /
Daniel de Araújo Viana. – Fortaleza, 2007.
84 f. : Il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza-Ce, 2007

1. Doença de Hodgkin 2. Genes p53 3. Polimorfismo genético
I. Rocha Filho, Francisco Dário (Orient.) II. Título

CDD: 616.99446

DANIEL DE ARAÚJO VIANA

POLIMORFISMOS DO GENE TP53 NO LINFOMA DE HODGKIN

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em ____/09/2007.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará

Ao progresso da Ciência na Oncologia e Genética, trabalhando juntas para desvendar os mistérios da progressão tumoral e contribuir para a sobrevivência de milhares de pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Deus, antes de tudo, pela vida, saúde e inteligência.

À minha mãe, Regina Lúcia de Araújo Viana, pela força e amor gratuito que apresenta por mim e apesar de tudo continua fazendo o que pode de melhor por seus filhos.

Aos meus avós, Antônio Soares de Araújo e Antônia Gomes de Araújo, pelo exemplo de força, luta e amor incondicional que eles têm por seus familiares.

À toda a minha família pelo apoio constante e amor.

À Coordenação do Mestrado em Patologia bem como ao Departamento de Patologia e Medicina Legal e Universidade Federal do Ceará, por terem tornado possível a realização de mais esse objetivo de vida.

Aos coordenadores do Mestrado em Patologia – Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho e Prof. Dr. Talapala Naidu, pela constante presença e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho, por ter me aceito para orientação, pelos conhecimentos tão valiosos, pela confiança depositada e pela vivacidade sempre presente em tentar melhorar como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira, pelos momentos dispensados para orientar essa realização.

À Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira, orientadora e amiga há sete anos, exemplo profissional e de vida, que exige sempre que demos o melhor de nós. Conviver com você faz nossa cabeça fervilhar de idéias e termos a certeza que jamais ficaremos cristalizados.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito tão prontamente participar deste momento: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho, Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira e Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira. Ao seu modo cada um deu contribuição valiosa para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do NUGEN, em especial a Michely Correia Diniz, pelo companheirismo e amizade, pelo apoio e dedicação para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Geraldo de Sousa Tomé, por ter me iniciado no belo mundo da Patologia.

À Dra. Deborah Nunes de Melo Braga, pelo constante incentivo e formação dada, além do carinho sempre presente.

À Dra. Teresa Neuma Albuquerque Gomes pelo incentivo em iniciar esse processo e pelos ensinamentos e amizade constante.

À Secretária do Mestrado em Patologia Sra. Paula Palácio, pela presença e apoio durante todo o processo.

Aos meus colegas de turma do Mestrado pelo carinho, amizade e companheirismo durante todo o curso e em especial a Tatiana Paschoalette Bachur e Sérgio Beltrão Lima, novos amigos verdadeiros que apareceram durante esse processo.

À Cristóvão Lacerda Cronje, pelo carinho e paciência eterna com meus altos e baixos emocionais, pela presença mesmo à distância, pelo cuidado, atenção e companhia que espero ter para o resto da vida.

À Ana Carolina Landim Pacheco, minha crachá! Para você não preciso de palavras, um simples olhar é suficiente para demonstrar a grande amizade, carinho e cumplicidade que existe entre nós.

Aos meus amigos do coração Tiago Passos, Robério e Daniele Fiúza, Wendell Goiana, Carina Holanda, Rodrigo Macambira, Gustavo e Charliene Coser, grande incentivo de continuar vivendo, pois amizades verdadeiras são como encontros de almas gêmeas em pequenos relances dessa vida efêmera que temos.

Aos meus novos irmãos da casa engraçada, Lidiane Castro, Mônica Saraiva, Fernanda Rondon, Tatiana Raulino e Tiago Passos, pelo apoio nos últimos momentos e por terem me aceito pra formar essa nova família.

Aos meus colegas e amigos da Clínica Veterinária Vetmed pela paciência dispensada e compreensão pela minha ausência.

O meu muito obrigado!

RESUMO

O Linfoma de Hodgkin é uma hemopatia linfóide que pode ocorrer em qualquer faixa etária; no entanto, é mais comum na idade adulta jovem, dos 15 aos 40 anos. O TP53 é um gene de 20kb de comprimento que possui 11 éxons situado no cromossomo 17 e codifica a proteína p53, uma proteína cuja principal função está relacionada à preservação da integridade do código genético, e, durante o ciclo celular faz verificação quanto à eventual ocorrência de uma mutação na seqüência do código genético. Na presença dessas mutações, impede que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular. A maioria dos cânceres apresenta mutações pontuais na seqüência do TP53. A análise dos padrões dessas mutações é de grande valia uma vez que o conhecimento dessas mutações leva a um melhor entendimento das funções dos vários domínios da proteína p53 e seu envolvimento com o mecanismo de supressão tumoral, além de permitir que essas mutações sejam utilizadas como biomarcadores para desvendar a oncogênese humana. Na literatura vigente, poucos trabalhos abordam a identificação dessas mutações em relação ao linfoma de Hodgkin - forma clássica. Dessa forma, este trabalho se propõe a investigar quantitativa e qualitativamente os padrões de polimorfismos existentes nesta forma do linfoma de Hodgkin. A primeira etapa do nosso experimento constou da seleção de 42 casos de linfonodos diagnosticados como linfoma de Hodgkin entre os anos de 2000 e 2006, arquivados em blocos de parafina. Os casos foram selecionados de pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin, sem predileção por idade, sexo ou raça. Em seguida, o DNA foi extraído das amostras selecionadas para reação de PCR, realizada para isolar e amplificar, o fragmento de 137pb correspondente ao éxon 8 do gene TP53, através de primers exclusivos desenhados para o experimento: PFW8 e PRV8. Após a reação, os produtos de PCR foram purificados para reação de Seqüenciamento de DNA, utilizando o seqüenciador automático de DNA da marca ABI Prism® 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems). A última etapa aconteceu em laboratório de bioinformática - dry lab, onde as seqüências de DNA obtidas foram analisadas qualitativa- e quantitativamente. Os processos de extração do DNA genômico, amplificação do éxon 8, purificação do produto de PCR foram realizadas com sucesso em todas as amostras obtidas de material parafinado. No seqüenciamento do DNA parafinado foi possível determinar, com segurança e confiabilidades previstas em parâmetros convencionais, a seqüência de pelo menos 32 amostras; contudo, não se obteve distinção suficiente dos picos de eletroferogramas para a determinação de eventuais polimorfismos na região analisada. Não foi possível portanto, verificar com margem de segurança razoável, a presença ou ausência de SNPs nas amostras seqüenciadas. Houve, contudo, uma qualificação e competência laboratorial instalada localmente (em Fortaleza), a partir da experiência desenvolvida com o esforço deste trabalho, para continuar a investigação molecular em prol da determinação, em futuro breve, da ocorrência ou não de SNPs no éxon 8 do TP53 em linfoma de Hodgkin.

Palavras-chave: Linfoma de Hodgkin. TP53. Polimorfismos.

ABSTRACT

Hodgkin lymphoma is a hematologic B neoplasm occurring at patients within any age, however more likely to affect those from 15 to 40 years-old. The TP53 gene is 20kb length gene with 11 exons that encodes the p53 protein, which main function is related to the conservation and integrity of the genetic code. Most cancers show point mutations in the TP53 sequence. The analysis of these mutations allows a better understanding of the function of the diverse domains of the protein and its relationship to tumor suppression. There is only a few data about TP53 polymorphisms and Hodgkin lymphoma. In this manner, in our study we try to detect polymorphisms within the codons 272,273, 278, 282, 306 of the exon 8 of the TP53 gene in Hodgkin lymphoma. In our survey we analyzed 42 paraffin-embedded tissues from 2000 to 2006. These samples were prepared for DNA extraction, PCR isolation and amplification of the 137bp fragment of the exon 8 of the TP53 gene, using exclusive primers specially designed to our experiment: PFW8 e PRV8. After PCR amplification, the products of the reaction were purified to the Sequencing reaction. The last part of the experiment encoded the bioinformatics analysis of sequences. DNA extraction and PCR amplification were successfully obtained in our study in all the samples. However, the DNA sequencing was only obtained in 32 samples, but there was no characteristic electropherogram of the analyzed region of the gene. Therefore, it was not possible to determine the presence or absence of SNPs in the TP53 exon 8.

Key words: Hodgkin lymphoma. TP53. Polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Célula de Reed-Sternberg - HE - 1000X.....	22
Figura 2 – Células Linfócito e Histiócito (L&H) (no círculo), com núcleos em forma de “pipoca” - HE - 100X.....	25
Figura 3 – LH Clássico Subtipo Esclerose Nodular. A. Padrão nodular evidenciado pela presença de bandas do colágeno - HE - 40X.....	26
Figura 4 – LH Clássico Subtipo Esclerose Nodular. Células gigantes variante lacunar (setas) - HE - 1000X.....	27
Figura 5 – LH Clássico Subtipo Celularidade Mista - HE - 100X.....	28
Figura 6 – Esquema representando o mapa cromossômico de um ser humano do sexo masculino, com evidência para o cromossomo 17 (círculo) (localização do gene TP53). O quadro mostra em detalhe o cromossomo 17 e a localização exata do gene TP53 (17p13.1).....	30
Figura 7 – Agentes oncogênicos relacionados a suas perspectivas fontes, estrutura físico-química, adutor do DNA e mutação respectiva.....	35
Figura 8 – Seqüenciador Automático de DNA ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems).....	48
Figura 9 – Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 13 (sete) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares de Linfoma de Hodgkin logo após a extração.....	50
Figura 10 – Fotografia de eletroforese em gel de agarose para visualização de bandas contendo os produtos de PCR relativos ao éxon 8 do gene TP53 nas amostras de Linfoma de Hodgkin. A canaleta 1 (à esquerda), apresenta o padrão molecular de DNA (DNA Ladder, 1KB – 0.5-10kb contendo 11 bandas, SIGMA®), enquanto nas demais canaletas são separadas as respectivas bandas para as 15 amostras corridas neste ensaio.....	55
Figura 11 – Exemplo de um eletroferograma visualizado pelo aplicativo Chromas® (da Applied Biosystems) em uma interface gráfica para melhor visualização de picos e posições.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais mutações descritas para o gene TP53 evidenciando o códon mutado, o resíduo de aminoácido alterado com seu respectivo mutante e efeitos na estrutura tridimensional na proteína p53.....	34
Tabela 2 – Quantidade (valor de 260), pureza (valor da relação 260/280) e concentração do DNA obtidos a partir da extração para os casos de Linfoma de Hodgkin (n=20).....	53

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Classificação da OMS para o LH.....	24
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Prevalência de mutações do gene TP53 em tumores de diversas localizações anatômicas.....	33
Gráfico 2 – Correlação entre presença de mutações do gene TP53 e proporção de sobrevida em pacientes com câncer de mama.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CH: Células de Hodgkin

CM: Linfoma de Hodgkin Clássico padrão Celularidade Mista

ddNTPs: dideoxynucleotídeos

DNA: Desoxiribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

DH: Doença de Hodgkin

DPML: Departamento de Patologia e Medicina Legal

EMA: Antígeno de Membrana Epitelial

EM: Linfoma de Hodgkin clássico padrão Esclerose Nodular

EUA: Estados Unidos da América

FAVET: Faculdade de Veterinária

HCC: Hospital do Câncer do Ceará

HE: Hematoxilina-Eosina

HIV: Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agência Nacional de Pesquisa para o Câncer)

ICC: Instituto do Câncer do Ceará

Ig: Imunoglobulina

LLCB: Leucemia linfocítica crônica de células B

L&H: Células Linfócito e Histiócito

LH: Linfoma de Hodgkin

LHNPL: Linfoma de Hodgkin Nodular com predomínio de linfócitos

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LPLP: Laboratório de Patologia Professor Livino Pinheiro

mRNA: RNA mensageiro

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: Open Reading Frame (Quadro Aberto de Leitura)

pb: pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

%: Percentual

rpm: rotações por minuto

RS: células Reed-Sternberg

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)

TA: temperatura ambiente

UECE: Universidade Estadual do Ceará

UFC: Universidade Federal do Ceará

vs.: Versus

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Antecedentes e Abordagem Molecular em Linfoma de Hodgkin.....	18
1.2 Justificativa do Estudo.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Linfoma de Hodgkin.....	22
2.2 TP53 e seu papel na imunossupressão tumoral hematológica.....	29
2.3 Polimorfismo de nucleotídeo único – SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)....	31
2.4 Polimorfismos e TP53.....	32
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Tipo de Estudo.....	41
4.2 Locus do Estudo.....	41
4.3 Delineamento Geral do Estudo.....	41
4.4 População do Estudo.....	42
4.5 <i>Wet Lab</i>	42
4.5.1 Preparação das amostras para extração de DNA.....	42
4.5.2 Extração do DNA.....	43
4.5.3 Quantificação do DNA.....	44
4.5.4 Desenho dos <i>primers</i>	45
4.5.5 Reação de PCR.....	45
4.5.6 Purificação dos produtos de PCR.....	46
4.5.7 Seqüenciamento do produto de PCR.....	47
4.6 <i>Dry Lab</i>	48
4.6.1 Análise bioinformática.....	48
4.7 Análise Estatística.....	49
4.8 Aspectos Éticos.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Recuperação do DNA Parafinizado (Extração, Separação e Visualização de DNA Genômico Total)	50

5.2	Quantificação do DNA Genômico Total.....	52
5.3	Reação de PCR.....	54
5.4	Reação de Seqüenciamento dos produtos de PCR do gene TP53 em tumores de linfoma de Hodgkin e visualização dos eletroferogramas.....	56
5.5	Busca e análise de polimorfismos nas seqüências do gene TP53 em tumores de linfoma de Hodgkin.....	57
6	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A - Termo de compromisso e utilização dos dados.....	73
	ANEXO A - Documento de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará - CEP - ICC.....	74
	ANEXO B - Anais Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2007(capa)	75
	ANEXO C - Anais Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia – HEMO 2007(contra-capa).....	76
	ANEXO D - Resumo da dissertação publicada nos Anais Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia – HEMO 2007	77
	ANEXO E - Certificado de Apresentação do Resumo de Dissertação no Anais Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2007.....	79
	ANEXO F - Tp53 - Sequência Genética.....	80
	ANEXO G - Site da International Agency for Reserch On Cancer (IARC)	82
	ANEXO H - Soluções utilizadas neste experimento.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antecedentes e Abordagem Molecular em Linfoma de Hodgkin

As neoplasias malignas do sistema linfocítico, tradicionalmente denominados linfomas malignos, têm sido mais recentemente melhor definidas como neoplasias do sistema imune. Podem acometer vários locais no organismo, uma vez que as células do sistema linfático estão presentes em todo o corpo. Desta forma, os linfomas constituem um grupo heterogêneo de entidades linfoproliferativas malignas, caracterizadas pela proliferação extramedular de células linforreticulares. De acordo com suas características são subdivididos em dois grandes grupos: linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH).

O LH é uma forma de câncer que se origina nos linfonodos do sistema linfático. Ele é caracterizado histopatologicamente pela presença de células tumorais gigantes, chamadas de Reed Sternberg (RS), rodeadas por células inflamatórias benignas, compostas por linfócitos, histiócitos e granulócitos, incluindo eosinófilos, células plasmáticas e fibroblastos (BANKS, 1995). O diagnóstico depende da presença das células RS e de suas variantes chamadas de células de Hodgkin (CH). Apesar de não existir anticorpo monoclonal específico para células RS e suas variantes, a imunohistoquímica com utilização de anticorpos monoclonais (tais como anticorpo anti células T (CD3), Leu M1 (CD15), Pan B (CD20), BerH2 (CD30), antígeno comum leucocitário (CD45) e antígeno de membrana epitelial (EMA)) auxiliam na confirmação diagnóstica e diagnóstico diferencial com neoplasias e doenças inflamatórias que apresentam células RS similares (STEIN et al., 2001).

Este tipo de neoplasia pode ocorrer em qualquer faixa etária; no entanto, é mais comum na idade adulta jovem, dos 15 aos 40 anos, atingindo maior frequência entre 25 a 30 anos. Indivíduos com sistema imune comprometido, como consequência de doenças genéticas hereditárias, infecção pelo HIV, uso de drogas imunossupressoras, têm risco um pouco maior de desenvolver Linfoma de Hodgkin, assim como membros de famílias nas quais uma ou mais pessoas tiveram diagnóstico da doença.

A incidência de novos casos tem permanecido estável nas últimas cinco décadas, enquanto a mortalidade foi reduzida em mais de 60% desde o início dos

anos 70 devido aos avanços no tratamento. Cerca de 80% dos pacientes com LH na Europa e Estados Unidos podem ser curados com o tratamento quimioterápico atual. No Brasil, entretanto, este índice deve ser bem mais baixo em consequência do diagnóstico tardio.

O advento de técnicas revolucionárias em biologia molecular, tais como a reação da polimerase em cadeia (PCR) propiciam novas possibilidades de acesso ao material genético (manipulação, controle e interferência no DNA e RNA) que aproximam cada vez mais a patologia tradicional às novas: patologia genética molecular e patogenômica (a fusão da ciência genômica com a patologia). Muitas variações na seqüência de DNA (polimorfismos) já foram identificadas em populações humanas e relacionadas com uma vasta quantidade de genes e suas condições fisiológicas ou patológicas. A maioria dos polimorfismos genéticos está localizada nos introns, que são as regiões não traduzidas dos genes eucariotos (possuidores, portanto, de éxons e introns) e mais variáveis. As consequências das variações intrônicas ainda não são claras, embora sejam alvo de intensa pesquisa científica mundial. Considerado como o “guardião do genoma”, o gene TP53 dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de oncogênese, é o de maior importância. Conhecer seus mecanismos de ação representa uma etapa fundamental para todo aquele que deseja compreender os aspectos da biologia molecular relacionados ao câncer (YAMAGUCHI et al., 1997). Teoricamente, os mecanismos pelos quais os polimorfismos intrônicos poderiam afetar a função da proteína p53 (produto do gene TP53) incluem mutabilidade devido a seqüências de DNA alteradas, aumento dos eventos de splicing ou mesmo estabilidade de transcrição alterada ou expressão tecidual específica (LOZANO; LEVINE, 1991; MATTICK, 1994).

Apenas dois polimorfismos, de prolina (Pro) para serina (Ser) no resíduo 47 e arginina (Arg) para Pro no resíduo 72, alteram a seqüência de aminoácidos da proteína p53. A variação Ser47 é um tipo raro de polimorfismo que afeta um códon conservado na evolução. O resíduo 72, embora não conservado, está localizado dentro de uma região rica em prolina e pode afetar o domínio de ligação – SH3. Diferenças étnicas nas freqüências alélicas do códon 72 já foram observadas (BECKMAN et al., 1994; JIN et al., 1995).

Muitos estudos têm investigado a associação dos polimorfismos do TP53 com um maior risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer. O Códon 72

(Arg/Pro), íntron 6 (G>A) e a duplicação do íntron 3 são mais estudados. No câncer de pulmão, por exemplo, o códon 72 Pro/Pro está associado com um risco mais elevado de desenvolvimento de câncer (KAWAJIRI et al., 1993; WU et al., 2002).

Recentemente, o íntron 3 foi associado com um maior risco de câncer colo-retal em um estudo caso-controle e também foi correlacionado com níveis reduzidos de TP53 mRNA em células de linhagem linfoblástica (GEMIGNANI et al., 2004). Em outro estudo, os haplótipos (Codon 72 Arg/Pro, intron 6 G>A e intron 3 duplicado) estão associados com um maior risco de câncer de pulmão e altos índices de apoptose e capacidade de reparo do DNA em células linfoblásticas (WU et al., 2002). Tais dados experimentais sugerem que esses polimorfismos podem afetar a função da proteína p53.

1.2 Justificativa do Estudo

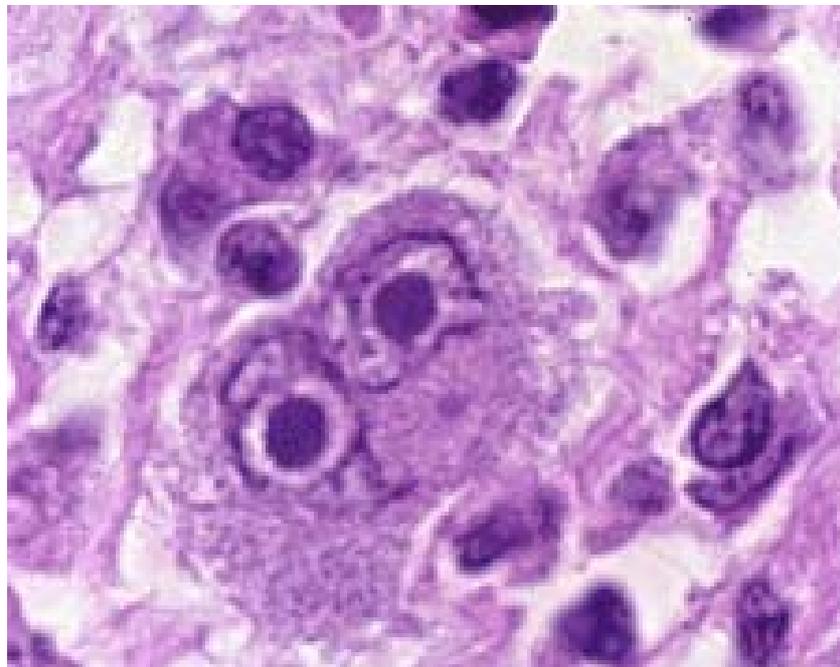
A tendência que se observa nas duas últimas décadas é o gradual e constante aperfeiçoamento de métodos de diagnóstico de neoplasias, cuja trajetória pode ser ilustrada pela marcante evolução de abordagens diagnósticas: desde a clássica histopatologia convencional, passando pelas imunohistoquímica e hibridização *in situ*, avançando pela biologia molecular com técnicas de PCR (*polimerase chain reaction* ou reação da polimerase em cadeia) e suas variantes, e, finalmente, atingindo a era pós-genômica com toda a gama de refinadas tecnologias possibilitadas pelo seqüenciamento do genoma humano (concluído de fato em 2003). Assim, com a disponibilidade do mapeamento completo dos genes humanos, tornou-se viável o estudo detalhado da expressão gênica e de uma série de alterações correlatas, inclusive no tocante aos oncogenes e suas implicações na gênese das neoplasias humanas. À luz do conhecimento atual, não são encontradas, entretanto, referências publicadas sobre o padrão qualitativo ou quantitativo de polimorfismos do gene TP53 no linfoma de Hodgkin (LH), com a única exceção do trabalho de Nunes e Medeiros (2004). A carência de informações específicas sobre estes padrões nos diversos grupos populacionais afetados representa um desafio emergente e um estímulo adicional para a realização de estudos como o presente, que objetiva contribuir, sobretudo, para a padronização do uso do DNA parafinado (obtido diretamente de fragmentos armazenados em

blocos/cassetes histológicos de rotina) como amostra viável para ensaios baseados em PCR e seqüenciamento genético. Outrossim, tal iniciativa visa adicionar conhecimento para a melhoria dos métodos de detecção precoce do LH (em desenvolvimento silencioso ou não), em última instância levando, inclusive, ao favorecimento de um eventual aumento da sobrevida de pacientes acometidos por essa neoplasia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin (LH), assim chamado porque foi descrito pela primeira vez, em 1832, por Thomas Hodgkin, define-se como uma neoplasia do tecido linfóide caracterizada pela presença de células de **Reed-Sternberg (RS)** e células de Hodgkin, inseridas num contexto inflamatório característico, constituído por estroma, linfócitos, histiócitos, eosinófilos e monócitos (POPPEMA et al., 2005). Geralmente ocorre em tecido ganglionar ou, mais raramente, em tecido extra-ganglionar, nomeadamente a medula óssea, pulmão ou osso. As células RS constituem apenas 1 a 2% da população total de células no linfoma (HORNING, 2001). São células linfóides, que apresentam um núcleo multilobulado, com nucléolos eosinofílicos exuberantes (Figura 1). Ao contrário, as células de Hodgkin apresentam um núcleo unilobulado.



Fonte: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion. 2004.

Figura 1 – Célula de Reed-Sternberg - HE - 1000X

O progenitor celular das células RS foi determinado quando o gene da imunoglobulina (Ig) foi amplificado de uma célula RS micromanipulada. Estudos moleculares das células RS mostram que essas células são de uma população clonal de linfócito B com imunoglobulina mutada no gene da região variável (*V genes*). As mutações somáticas são introduzidas dentro do rearranjo V de genes da célula B, participando da resposta imune dentro do centro germinativo transformado. As mutações somáticas no gene das imunoglobulinas seriam introduzidas durante o desenvolvimento das células B, confirmando, então, a origem B das células RS (BRÄUNINGER et al., 1999; THOMAS et al., 2004). Outros autores, baseados em resultados de novas técnicas de imunofenotipagem e biologia molecular, apóiam a tese da origem linfóide B das células RS (BASIC-JUKICI et al., 2001; HALUSKA et al., 1994; HUMMEL et al., 1995; WRIGHT et al., 1994). Em contrapartida, alguns estudos, como os conduzidos por Hansmann e Willenbrock (2002) e Seitz et al. (2000), relatam que, na forma clássica do LH, as células RS e variantes podem, em raros casos, ser derivadas de uma população clonal de células T.

O reconhecimento de que a célula RS é um linfócito B estabeleceu este processo, inicialmente chamado de Doença de Hodgkin (DH), como um linfoma de células B. Por este motivo, os patologistas que propuseram a classificação histopatológica da Organização Mundial da Saúde (OMS), mudaram a designação de doença para linfoma de Hodgkin. Entretanto, em uma reunião com o Comitê de Aconselhamento Clínico, houve manifestação de opinião contrária, pois segundo os clínicos as características do processo, bem como sua abordagem terapêutica, justificavam a manutenção do termo DH. Por conseguinte, ambas as formas permanecem em uso, mas há uma tendência a favor do termo LH (SPECTOR, 2004).

Aceita-se hoje para LH a classificação histológica da OMS de 2001 (PILERI et al., 2002) (Quadro 1), que é uma modificação da classificação de Rye, que divide o LH em dois grandes grupos: o **LH Nodular** de predomínio de Linfócitos e o **LH Clássico**. A principal modificação foi a identificação de um subtipo histopatológico que difere das outras formas de LH clássicas por sua morfologia, imunofenótipo, transcrição de imunoglobulinas das células neoplásicas e composição do infiltrado ao redor – o subtipo LH nodular com predomínio de linfócitos (LHNPL) (CHAN, 2001; EKSTRAND; HORMING, 2002; STEIN et al., 2001).

- Linfoma de Hodgkin Nodular com predomínio de linfócitos

- Linfoma de Hodgkin Clássico:
 - a. Esclerose nodular (tipo 1 e 2);
 - b. Celularidade Mista
 - c. Depleção Linfocitária
 - d. Linfoma de Hodgkin Clássico rico em linfócitos

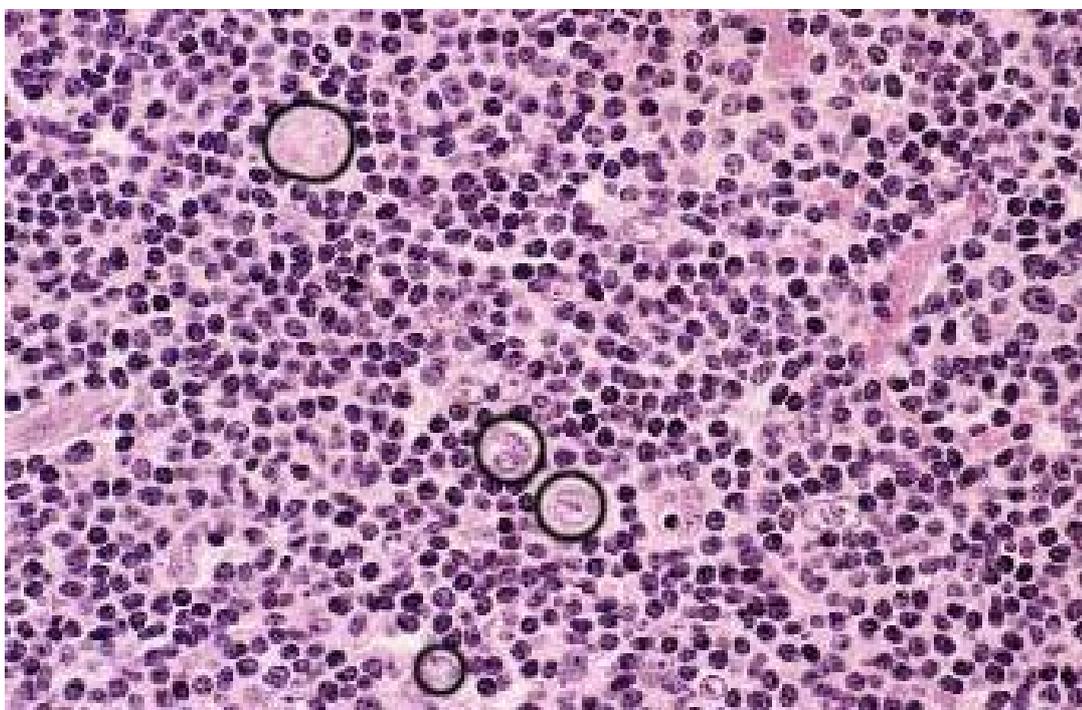
Fonte: IARC Press (2001).

Quadro 1 – Classificação da OMS para o LH

O LH Nodular de Predomínio de Linfócitos (LNPL) ocorre em cerca de 4-5% dos doentes (HARRIS, 1999). Os pacientes são predominantemente do sexo masculino e com idade entre 30 a 50 anos. A apresentação clínica mais comum é a linfadenopatia periférica localizada. Apenas 5 a 20% dos pacientes apresentam doença avançada. Neste subtipo predominam os linfócitos B benignos, com evidência de células gigantes diferentes das RS, as chamadas **Linfócito e Histiócito (L&H)**, que caracteristicamente apresentam núcleos multilobulados, classicamente descritos como tendo a forma de “pipoca” (Figura 2). Clinicamente é o tipo histológico de prognóstico mais favorável. De fato, cerca de 70% dos doentes apresentam-se no estágio I/II (HORNING, 2001) no momento do diagnóstico. A forma mais comum de apresentação é a de adenomegalias localizadas nas cadeias cervicais, axilares ou inguinais.

O LH clássico apresenta vários tipos histológicos. O tipo Esclerose Nodular (EN) é o mais freqüente, ocorrendo em dois terços dos doentes com LH (YUNG; LINCH, 2003), sendo mais freqüente em mulheres jovens (HORNING, 2001). Tem uma predileção pelo mediastino anterior, sendo este o tipo histológico

que condiciona frequentemente grandes alargamentos do mediastino, evidenciados por radiografia do tórax. A maioria dos doentes, cerca de 70%, apresenta-se com doença limitada. Histologicamente caracteriza-se por um padrão nodular, pela presença de bandas de colágeno e de fibrose capsular (Figura 3). As células gigantes são designadas de variante lacunar, pelo fato de ocorrer retração do citoplasma durante a fixação com formol (Figura 4). Pode dividir-se em dois subtipos: I e II (ou tipo sincicial), tendo o último uma muito maior proporção de células neoplásicas.

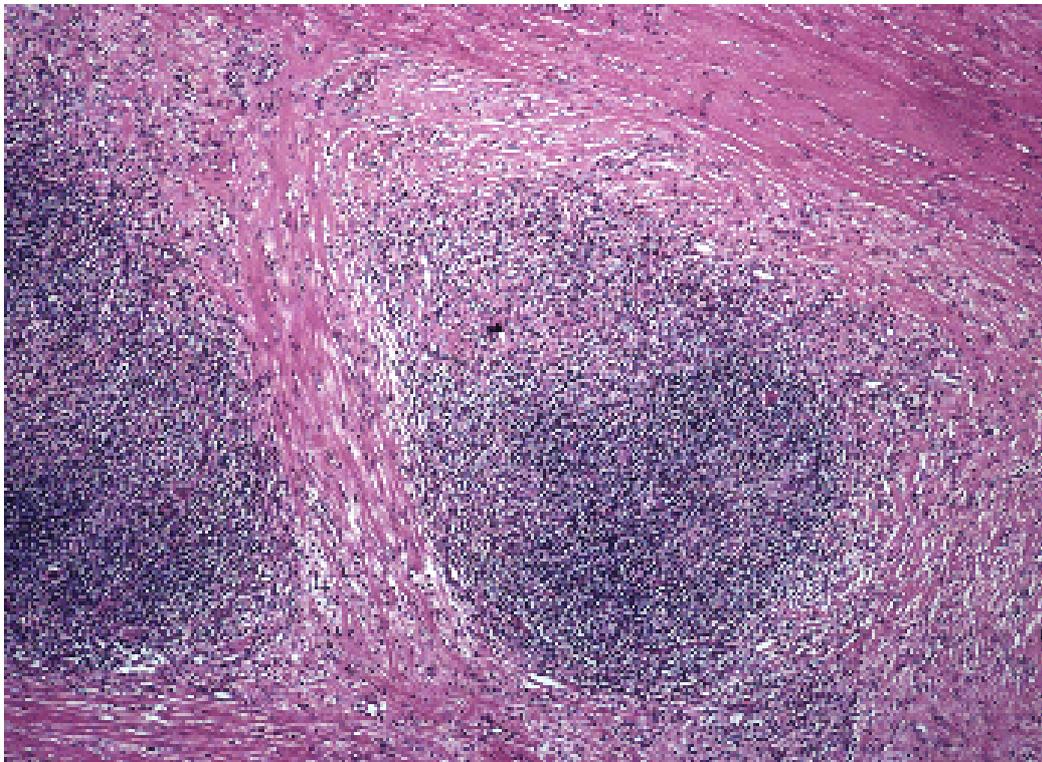


Fonte: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion, 2004.

Figura 2 – Células Linfócito e Histiócito (L&H) (no círculo), com núcleos em forma de “pipoca” - HE - 100X

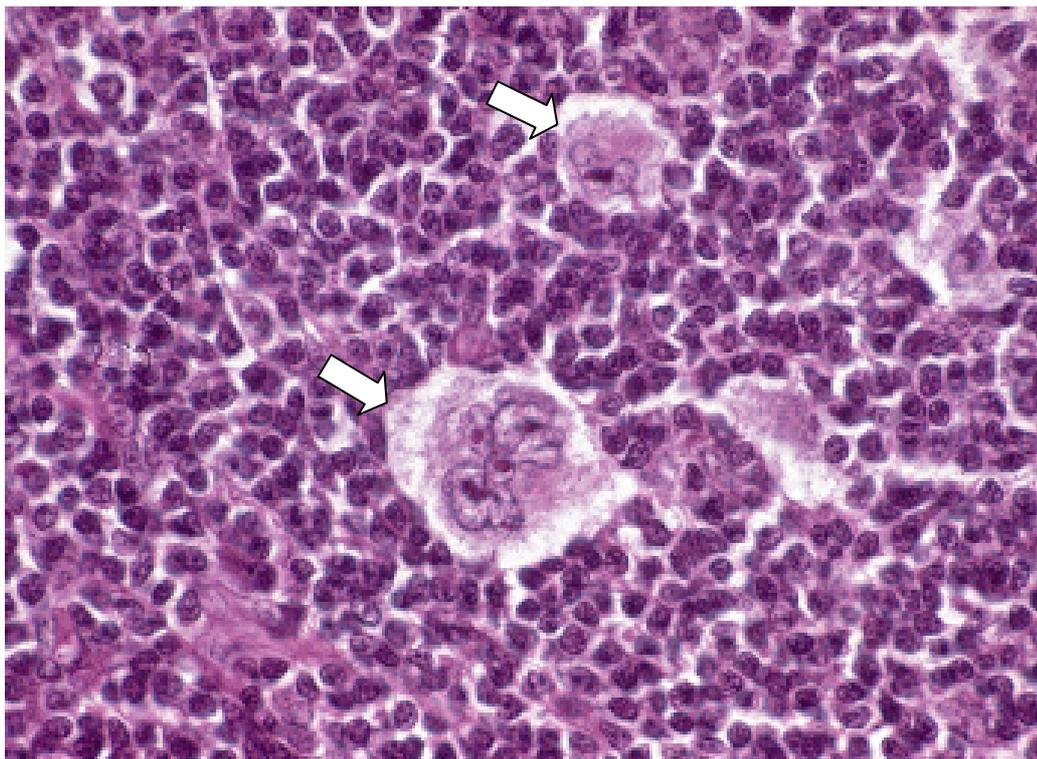
O subtipo Celularidade Mista (CM) é o segundo padrão histológico em frequência, ocorrendo em 20-25% dos doentes nos EUA (PILERI et al., 2002). Nas regiões subdesenvolvidas é o subtipo predominante (CHANG et al., 1993; LEVY, 1988). No Ceará esse aspecto também é observado (FERREIRA et al., 1977;

PITOMBEIRA et al., 1987). Abreu et al. (1987) demonstraram em seu estudo que, em crianças e adolescentes do estado do Ceará, o subtipo CM era a forma predominante e correspondia a 64,70% de todos os casos. Histologicamente, como o próprio nome indica, apresenta uma proporção intermédia de células neoplásicas e células reativas (Figura 5). Este padrão é mais freqüente nos grupos etários extremos e apresenta uma forte associação com o vírus de Epstein-Barr (VEB) (THOMAS et al., 2002). Também se associa ao vírus da imunodeficiência humana (GOEDERT et al., 1998).



Fonte: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion, 2004.

Figura 3 - LH Clássico Subtipo Esclerose Nodular. A. Padrão nodular evidenciado pela presença de bandas do colágeno - HE - 40X.

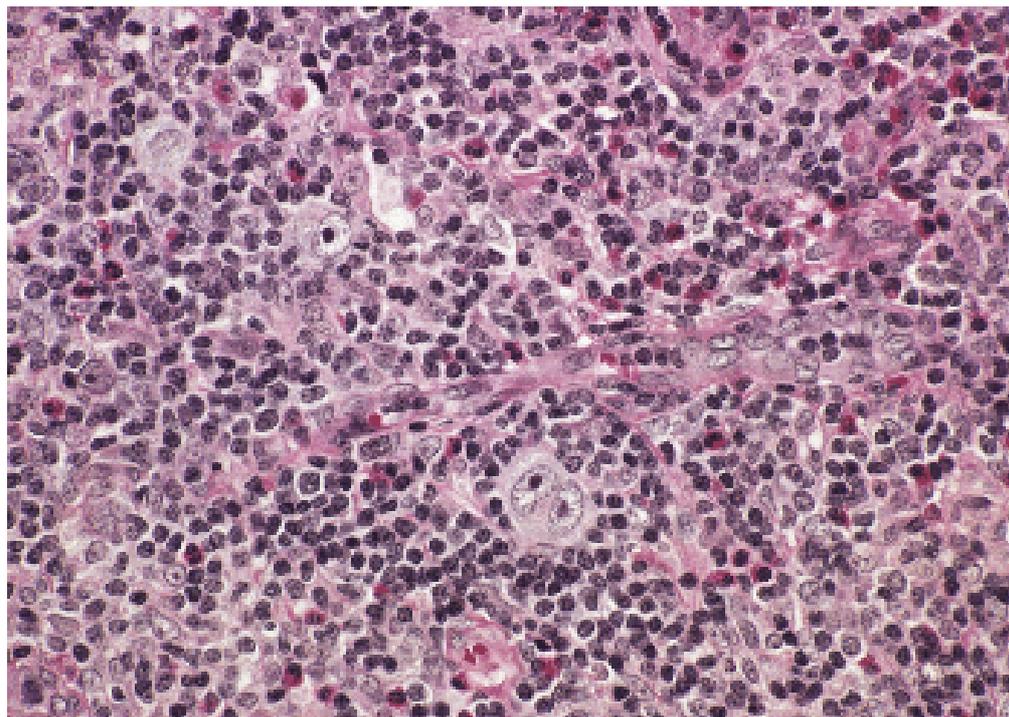


Fonte: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion, 2004.

Figura 4 - LH Clássico Subtipo Esclerose Nodular. Células gigantes variante lacunar (setas) - HE - 1000X.

Estudos recentes realizados em vários estados do Brasil demonstraram uma diminuição da frequência do subtipo CM e aumento dos casos de EN, conforme determinado por Pinto (2003) que encontrou, em seu estudo, 57,5% dos casos classificados como EN no estado do Ceará e Vassalo et al. (2005) que encontrou 69,2% de seus casos como EN.

O padrão rico em linfócitos microscopicamente é muito difícil de distinguir do LH nodular, sendo necessário utilizar estudos de imunohistoquímica. Também clinicamente os dois padrões têm um comportamento muito semelhante, embora este último tenda a ocorrer em indivíduos mais velhos (PILERI et al., 2002).



Fonte: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion, 2004.

Figura 5 - LH Clássico Subtipo Celularidade Mista - HE - 100X.

O padrão Depleção Linfocitária é muito raro, ocorrendo em menos de 1% dos doentes com LH (THOMAS et al., 2002). Clinicamente é o de prognóstico menos favorável, ocorrendo frequentemente em doentes idosos, com doença sintomática e extensa. Está também descrita uma associação à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (PILERI et al., 2002).

Por fim, consideram-se inclassificáveis os casos em que, por haver envolvimento ganglionar apenas parcial, por estarem disponíveis pequenas quantidades de tecido ou por localização extra-ganglionar, a classificação se torna difícil ou impossível. No passado, esses casos eram incluídos no subtipo celularidade mista, mas esta nova classificação confere maior homogeneidade aos subtipos (PILERI et al., 2002).

O padrão imunohistoquímico tem permitido a compreensão da etiologia das células malignas no LH, além da natureza, diagnóstico e classificação da doença. Por serem utilizados anticorpos inespecíficos recomenda-se o estudo dessa neoplasia através de um painel imunohistoquímico (VON WASIELEWSKI et al.,

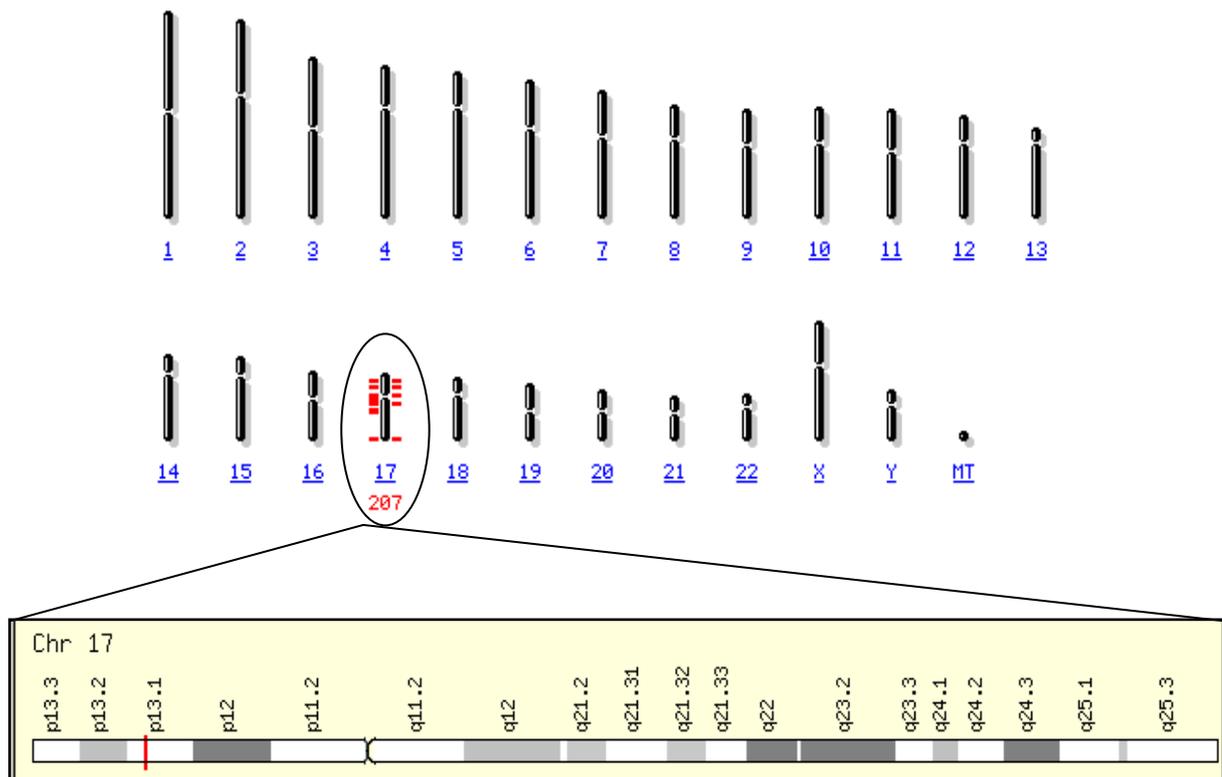
1997). Verificam-se grandes diferenças entre as células RS e as L&H. As primeiras geralmente não apresentam marcadores de linfócitos B como o CD20 ou o CD45. Pelo contrário, apresentam frequentemente marcadores de outras células, como o CD30 (existente em monócitos e linfócitos T) e o CD15 (existente em granulócitos). Dessa forma, os LH subtipo clássico têm imunofenótipo característico: CD15+, CD30+, CD20-, CD45- (HARRIS, 1999).

O LH tem incidência mundial de cerca de 62.000 casos por ano (PARKIN et al., 2005) e 7.400 casos por ano nos Estados Unidos (EUA) (JEMAL et al., 2005). Nos EUA é o tipo de neoplasia mais comum entre pacientes de 15 e 19 anos, o que perfaz 16% de todos os casos de neoplasia diagnosticados (HUDSON; DONALDSON, 1999).

A distribuição da faixa etária é bimodal para o LH e varia conforme a região geográfica, situação econômica e etnia. Nos países desenvolvidos, o primeiro pico ocorre por volta dos 25 anos e o segundo pico após os 50 anos. Nos países em desenvolvimento o primeiro pico ocorre antes da adolescência (HUDSON; DONALDSON, 1999). Existe uma leve predominância de incidência no sexo masculino, especialmente entre crianças, e a presença dessa neoplasia em negros é rara. A incidência de novos casos permaneceu estável nas últimas cinco décadas, enquanto a mortalidade foi reduzida em mais de 60% desde o início dos anos 70 devido aos avanços terapêuticos (BIGNI, 2005). Apesar de ser considerada uma doença relativamente rara, o LH é uma das seis neoplasias mais comuns em adultos jovens (BEGG, et al., 2006).

2.2 TP53 e seu Papel na Imunossupressão Tumoral Hematológica

O gene TP53 humano localiza-se no cromossomo 17p13 (Figura 6) e é responsável pela codificação da proteína p53, uma molécula com propriedade de supressão tumoral, que foi descrita pela primeira vez em 1979, em células transformadas pelo vírus SV40, nas quais ela se associava com o antígeno T (LANE; CRAWFORD, 1979). O TP53 possui 20 kilobases (Kb) de comprimento distribuídas por 11 éxons que variam entre 22 e 1.268bp (LAMB; CRAWFORD, 1986). A seqüência completa do gene pode ser vista no Anexo F.



Fonte: Adaptado a partir de www.ncbi.nlm.nih.gov (2007)

Figura 6 - Esquema representando o mapa cromossômico de um ser humano do sexo masculino, com evidência para o cromossomo 17 (círculo) (localização do gene TP53). O quadro mostra em detalhe o cromossomo 17 e a localização exata do gene TP53 (17p13.1)

Considerado como o “guardião do genoma”, o gene TP53, dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de oncogênese, é o de maior importância e que mais tem sido investigado. Conhecer seus mecanismos de ação representa uma etapa fundamental para todo aquele que deseja compreender os aspectos da biologia molecular relacionados ao câncer (YAMAGUCHI et al., 1997). O gene é ativado em resposta a sinais de dano celular. Seu fator de transcrição interage com pelo menos outros seis genes. Por exemplo, liga-se ao promotor do gene p21, cujo produto protéico é um inibidor de quinase dependente de ciclina que bloqueia a inativação de pRb por CDK4. Esta atividade promove a parada do ciclo celular na fase G1, portanto, antes de ocorrer a duplicação do DNA (fase S), permitindo o reparo do DNA danificado. Uma alternativa de atuação da p53 a danos não reparados, caso a via com a proteína pRb não esteja intacta, é a indução da

apoptose (morte celular programada). Além disso, a p53 também promove uma checagem (*check point*) de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene. Portanto, quando a p53 sofre mutações, as células com danos no DNA, que, por um processo de seleção natural favorável, podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno (GAO; ZELENKA, 1997; NAKAMURA et al., 2002; ORR-WEAVER; WEINBERG, 1998; WEINERT, 1998).

2.3 Polimorfismo de Nucleotídeo Único- SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Polimorfismos genéticos surgem a partir de uma mutação em determinada localização de um gene. Estes, provavelmente, podem não alterar a estrutura do gene e sua função ou estar diretamente associados com mudanças no fenótipo (COLLINS et al., 1999). Diferentes classes polimórficas são geralmente nomeadas pela base ou tipo de mutação que resulta no polimorfismo (PALMER; COOKSON, 2001). A mais simples destas classes deriva da mutação de uma única base, que substitui um nucleotídeo por outro, e tem sido chamada de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Os SNPs são substituições de bases únicas que ocorrem dentro e fora de genes (COOPER; KRAWCZAK, 1995) e representam as fontes mais abundantes de variação genética entre os indivíduos de uma mesma espécie (JORDAN et al., 2002), o que fornece uma base compreensível para averiguação da diversidade genética (WILTSHIRE, 2003). Eles possuem um alto potencial para a classificação de genótipos e estão, inclusive, relacionados com várias alterações fenotípicas já caracterizadas como susceptibilidade ou resistência a doenças (COLLINS et al., 1997; LANDER, 1996), além de resposta a tratamento (KLEYN; VESELL, 1998; WEBER, 1997).

A natureza e organização de polimorfismos, ou diferenças entre indivíduos, são de grande interesse para a pesquisa porque estas variações podem ser associadas com, ou até fundamentar, traços fenotípicos derivados especialmente das formas alélicas de RNA mensageiro (mRNA) que podem advir desses SNPs.

Cooper e Krawczak (1995) e Shen et al. (1999) afirmaram que genes que contêm um ou mais SNPs podem dar origem a duas ou mais formas alélicas de mRNA e, a partir dessas variações, novas formas de interação com os componentes

celulares determinariam mudanças na síntese, maturação, transporte, tradução ou degradação desses mRNAs.

Vários projetos têm sido conduzidos para a identificação de SNPs, incluindo estudos sobre genes específicos (NICKERSON et al., 1998), cromossomos (DAWSON et al., 2001) e o papel dos genomas (ALTSHULER et al., 2000). A análise de SNPs tem sido feita por PCR e seqüenciamento de DNA, onde os *primers* são desenhados para amplificar regiões das seqüências que flanqueiam o SNP (TSUI et al., 2003). Algumas limitações durante a investigação de SNP são, por exemplo, a precisa associação genótipo-fenótipo nas doenças e a interação entre genética e fatores ambientais (PALMER; COOKSON, 2000; RISCH; MERIKANGAS, 1996).

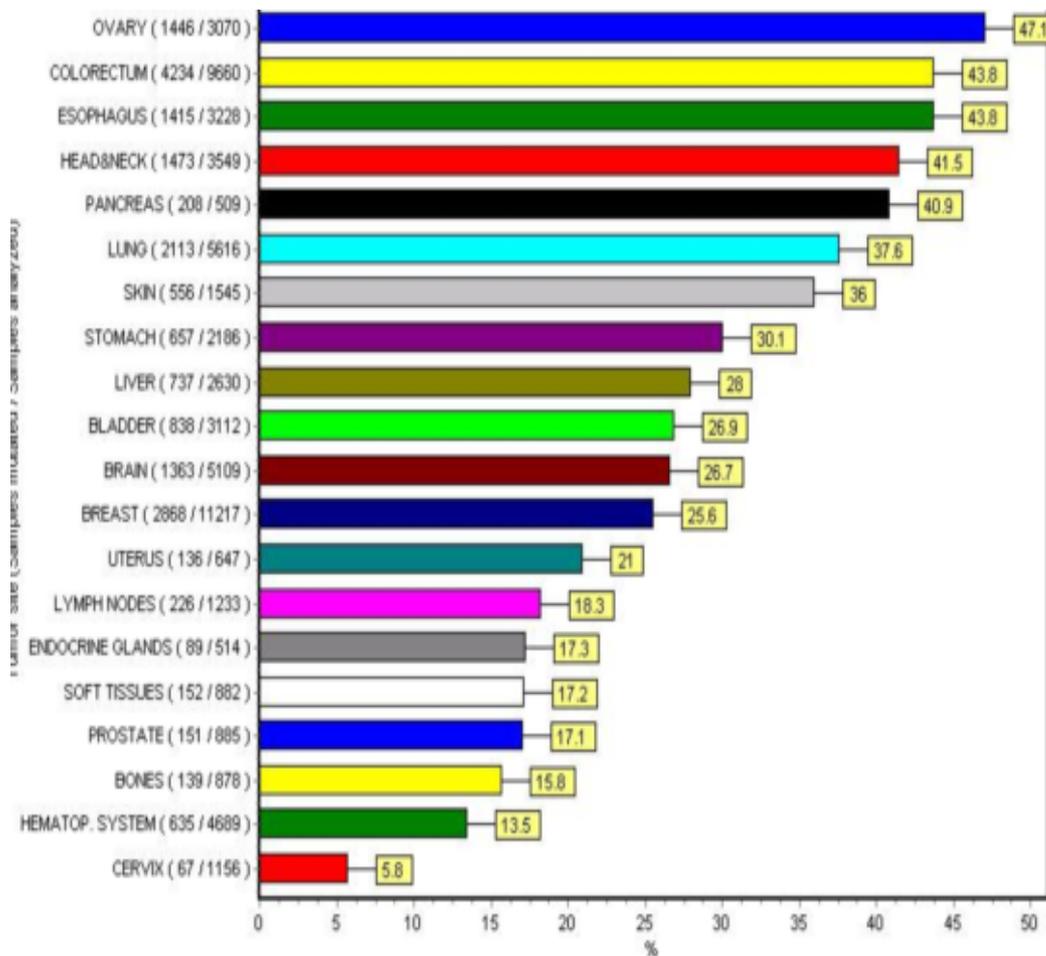
2.4 Polimorfismos e TP53

Embora seja considerado um gene supressor de tumor, porque a maioria das mutações leva à perda de função, o p53 quando sofre alguns tipos de mutações pode exercer um efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo mutado interage e inativa o alelo normal, induzindo o câncer e atuando, portanto, como um oncogene (LEVINE, 1997).

A análise dos padrões de mutação do TP53 é de grande valia uma vez que o conhecimento da posição dessas mutações leva a um melhor entendimento das funções dos vários domínios da proteína p53 e seu envolvimento com o mecanismo de supressão tumoral, que em grande parte das vezes está inativada no câncer. Ainda, os padrões de mutação podem variar de acordo com a natureza dos agentes incriminados como mutagênicos para os diversos cânceres, o que permitiria a utilização dessas mutações como biomarcadores para desvendar a oncogênese humana (GREENBLATT et al., 1994; HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000).

A maioria dos cânceres apresenta mutações pontuais na seqüência do TP53, que afetam praticamente mais de 200 códons distribuídos principalmente pela porção central do gene (HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000). O gráfico 1 mostra a prevalência percentual de mutações do TP53 nos tumores de diversos locais anatômicos.

Grande parte dessas mutações são conhecidas e estão compiladas em um banco de dados que engloba todas mutações do gene TP53 já publicadas para as mais diversas doenças, em especial o câncer, mantido pela Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) (<http://www-p53.iarc.fr/p53database.htm>), (OLIVIER et al., 2002). Na tabela 1, podemos observar os principais sítios de mutação descritas na literatura para os diversos códons do TP53 bem como a mutação provocada através da mudança do aminoácido e seu efeito sobre a proteína p53, com destaque para os códons 273 e 282, constituintes do éxon 8, frequentemente mutados em um grande número de neoplasias (LIU; BODMER, 2006). Essas mutações representam cerca de 20% de todas as mutações já observadas para o TP53.



Fonte: IARC TP53 Database, 2007.

Gráfico 1 - Prevalência de mutações do gene TP53 em tumores de diversas localizações anatômicas.

É interessante que algumas substâncias sabidamente carcinogênicas podem induzir mutações específicas em p53. Por exemplo, a ingestão dietética de aflatoxina, que pode resultar em câncer de fígado, está associada a uma mutação no códon 249, caracterizada pela troca da base nitrogenada G para uma base T, que promove a substituição de uma arginina por uma serina no produto protéico. Também a exposição ao benzopireno, potente mutagênico e carcinogênico encontrado no cigarro, produz mutações em três códons do gene que estão relacionadas ao aparecimento do câncer de pulmão (JORDE et al., 2000). A figura 07 ilustra os dois processos descritos acima e também demonstra a ação da radiação ultravioleta na geração de mutações e desenvolvimento do câncer.

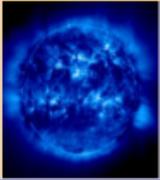
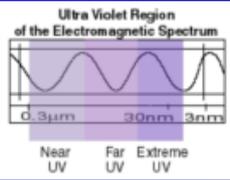
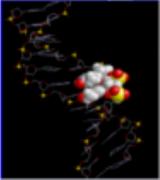
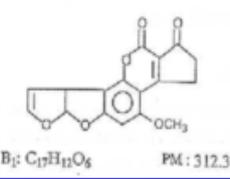
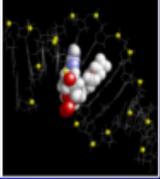
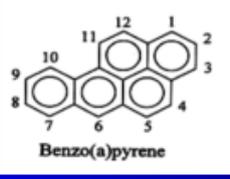
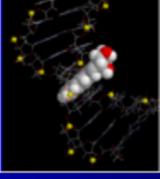
Tabela 1 - Principais mutações descritas para o gene TP53 evidenciando o códon mutado, o resíduo de aminoácido alterado com seu respectivo mutante e efeitos na estrutura tridimensional na proteína p53.

Códon	Resíduo	Mutante	Efeitos na estrutura da proteína p53
175	Arg	His	Quebra pontes de hidrogênio importantes levando a loop L2 e L3.
248	Arg	Gln	Quebra o contato principal com o DNA na depressão menor.
273	Arg	His	Quebra o contato principal com o DNA na depressão maior.
248	Arg	Trp	Quebra o contato principal com o DNA na depressão menor.
273	Arg	Cys	Quebra o contato principal com o DNA na depressão maior.
282	Arg	Trp	Desestabiliza a hélice H2 e a ligação do DNA na depressão maior, além de quebrar contato na β -hairpin.

Fonte: IARC TP53 Database, 2007

A resistência a múltiplas drogas pode ser induzida por vários estresses ambientais, incluindo quimioterápicos e raio X, e conta com a participação de genes

que codificam para fatores de crescimento. Além destes, mutações em p53 também podem aumentar a quimiorresistência, de acordo com a hipótese de que ele serve como marcador da resposta ao tratamento, o que já foi confirmado, inclusive, em câncer de pulmão e de cabeça e pescoço (BANDOHI et al., 2002; VOGT et al., 2002). Segundo Mori et al. (2002), o gene do fator 5 regulador do interferon (IRF-5) é um dos alvos diretos do p53 e pode mediar a resposta imune dependente deste gene. Também, condições de subnutrição são sabidamente reconhecidas por promover tal resistência em tumores sólidos. Contudo, estas condições não alteram a expressão do p53 (SAEKI et al., 2002).

	Fonte	Carcinógeno	Adutor	Mutação TP53
Radiação UV				CC → TT (diversos códons) Pele: 7% Outros: 0%
Aflatoxinas				G → T (Códon 249) Fígado: >50% Outros: <2%
Fumo				G → T (Códons 157, 158, 248, 273) Pulmão: 30% Outros: <10%

Fonte: IARC TP53 Database, 2007

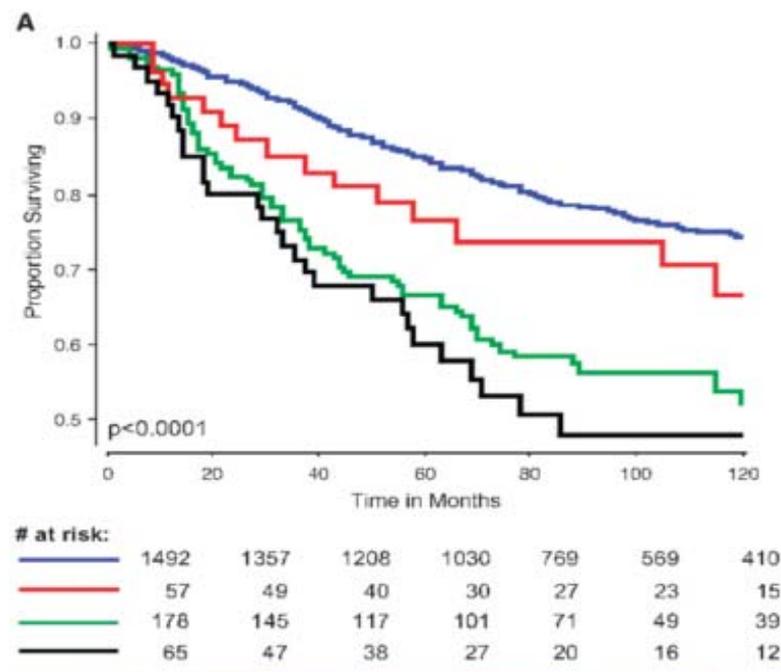
Figura 7 – Agentes oncogênicos relacionados a suas perspectivas fontes, estrutura físico-química, adutor do DNA e mutação respectiva.

Por outro lado, Liu et al. (2002) concluíram que a resposta inicial à quimioterapia em crianças com leucemias é variável e envolve tanto as vias que dependem da p53, quanto as que não dependem dela. Em seu estudo, Laytragoonlewin et al. (2002) não encontraram correlação entre a indução da apoptose e

expressão da p53 em leucemia linfocítica crônica de células B (LLC-B) e sugeriram que a apoptose em células leucêmicas pode ocorrer em G0/G1, antes da progressão do ciclo celular.

A relação entre mutações no p53 e clínica adversa já está bem estabelecida, o que reflete a importância de sua proteína na regulação e crescimento das células tumorais. Olivier et al. (2006) concluíram que mutações na seqüência do TP53 levaram a um pior prognóstico para pacientes do câncer de mama, como podemos visualizar no gráfico 02.

Para a leucemia mielóide crônica (LMC), embora o início da doença dependa da junção BCR/ABL, a progressão envolve alterações em p53 (MITANI, 2001). Em pacientes com LMC, alterações em p53 são encontradas em cerca de 30% dos casos, especialmente em crise blástica e os estudos moleculares têm indicado que em cerca de 25% dos casos em progressão, há inativação do p53 provocada por rearranjos ou mutações em ponto (GOLONI, 2000). Inclusive, o gene p51/p63, um novo membro da família do p53, mapeado em 3q27-9, quando mutado, pode atuar similarmente ao p53 e ser potencialmente responsável pela progressão da LMC (YAMAGUCHI et al., 2001).



Fonte: OLIVIER et al. 2006.

Gráfico 2 - Correlação entre presença de mutações do gene TP53 e proporção de sobrevida em pacientes com câncer de mama.

O p53 e o p14ARF, um outro potente supressor, estão funcionalmente ligados e relacionados à patogênese da leucemia mielóide aguda (LMA) (TSCHAN et al., 2001). Também em leucemia prolinfocítica B, uma doença rara e com prognóstico pobre, os pacientes com mutações no p53 têm uma evolução muito pior (HERCHER et al., 2001). Em LLC-B, anormalidades em 17p têm sido consideradas com um dos fatores prognósticos independentes mais importantes para identificar subgrupos de pacientes com progressão rápida e sobrevida curta. Além disto, deleções em 17p têm sido associadas com resistência à terapia com análogos da purina (GUMP et al., 2001; STILGENBAUER et al., 2000). Embora teoricamente seja possível que disfunções da proteína possam ocorrer por mecanismos não relacionados a alterações no gene, isto só foi demonstrado por Pettit et al. (2001). Os autores observaram disfunção da p53 em LLC-B, com p53 normal e que tal alteração está associada com mutações no gene ATM, responsável por uma quinase implicada na ativação da proteína p53. Apesar das mutações em p53 serem observadas principalmente em células somáticas, as que ocorrem em células germinativas são responsáveis pela Síndrome de Li-Fraumeni. Trata-se de uma síndrome rara de câncer hereditário, com padrão de herança autossômico dominante, que se caracteriza pela predisposição a tumor cerebral, sarcomas, leucemias e carcinoma adrenocortical em crianças e adultos jovens (LI et al., 1988).

O p53 mutado pode ser observado em cerca de 75% das famílias, cujos portadores apresentam aumento dos níveis da proteína p53 em tecidos normais e neoplásicos (HODGSON; MAHER, 1999). WU et al. (2002) sugeriram uma possível associação entre etnia e polimorfismos constitucionais do p53, que poderiam conferir um risco aumentado para câncer de pulmão, por poderem afetar a função da proteína p53.

Como pôde ser facilmente observado, um número imenso de publicações é encontrado de maneira crescente na literatura sobre o papel do gene p53 no funcionamento celular normal e neoplásico, praticamente envolvendo todos os tipos de células. Sua alteração em inúmeros tipos de câncer já foi relatada, desde em tumores adrenocorticais, leucemias, linfomas, tumores da mama, carcinomas de

pulmão, gastrointestinais, ósseos, até tumores de pele (DEVEREUX et al., 1996; HODGSON; MAHER, 1999; JONG et al., 2002; VARLEY et al., 1995; WAGNER et al., 1994; WANDS; BLUM, 1991).

Portanto, a importância médica deste gene é inegável, primeiro porque a detecção de mutações pode ser indicadora do diagnóstico e do prognóstico, segundo porque é um alvo perfeito para prevenção, o que estimula as abordagens de terapia gênica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar qualitativa e quantitativamente a proporção de polimorfismos do éxon 8 do gene TP53 no Linfoma de Hodgkin, procurando estabelecer padrões que associem essas mutações gênicas ao aparecimento, manutenção, desenvolvimento e prognóstico dessa neoplasia.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar localmente técnicas de extração e purificação de DNA a partir de material de arquivo histopatológico (tecidos embebidos em parafina);
- Padronizar localmente técnicas de análise de DNA danificado (*damaged* DNA; i.e, DNA parafinado, residual, antigo/ancestral, e/ou comprometido) para permitir ensaios de amplificação por PCR e/ou seqüenciamento genético;
- Analisar geneticamente o DNA de tumores de arquivo diagnosticados histologicamente como linfoma de Hodgkin a fim de detectar a presença ou não de polimorfismos no gene TP53 através de:
 - a) Seleção de regiões-alvo no gene TP53 (possuidor de 11 éxons) para posterior seqüenciamento automático de DNA;
 - b) Genotipagem do éxon 8 por amplificação (de amostras de DNA) baseada em PCR a partir de *primers forward* e *reverse* exclusivos, delineados neste trabalho, e posterior submissão à reação de seqüenciamento com *primers forward* convencionais;
 - c) Corrida em seqüenciador automático de DNA (Modelo ABI Prism 3100, Applied Biosystems, de 16 capilates) para obtenção de leituras (*reads*) na forma de eletroferogramas que permitam a análise nucleotídica da região-alvo.
- Verificar a presença ou ausência de SNPs nas amostras seqüenciadas e correlacioná-los a parâmetros relevantes na população estudada;

- Formar um conjunto de dados sobre os principais achados genotípicos encontrados neste estudo do éxon 8 do gene TP53 em linfomas de Hodgkin para ser adicionado ao repositório de dados IARC TP53;
- Correlacionar a morfologia histológica e imunofenotipagem do linfoma de Hodgkin com os eventuais padrões de SNPs encontrados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

- Estudo qualitativo e transversal.

4.2 Lócus do Estudo

- Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Ceará (UFC)
- Laboratório de Patologia Professor Livino Pinheiro (LPLP) do Hospital do Câncer do Ceará (HCC) vinculado ao Instituto do Câncer do Ceará (ICC)
- Núcleo Tarcísio Pimenta de Pesquisa Genômica e Bioinformática (NUGEN) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.3 Delineamento Geral do Estudo

O estudo foi dividido em três etapas. A primeira etapa constou da seleção dos casos diagnosticados como Linfoma de Hodgkin (LH) (blocos de parafina) do arquivo do DPML – CCS/UFC e do LPLP/ICC.

A segunda etapa foi realizada em bancada de laboratório de biologia molecular – *wet lab*, e incluiu a preparação dos blocos de parafina previamente selecionados, seguindo-se de extração, purificação, quantificação e verificação (por eletroforese) de DNA genômico; com posterior amplificação do DNA-alvo por reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), verificação dos produtos de PCR por eletroforese em agarose; culminando com termociclagem da reação de seqüenciamento para corrida em seqüenciador automático de DNA.

A terceira e última etapa aconteceu em laboratório de bioinformática – *dry lab*, onde as seqüências de DNA obtidas (*reads*) foram analisadas qualitativa- e quantitativamente. Estas duas últimas etapas foram realizadas no NUGEN.

4.4 População do Estudo

A partir de análise retrospectiva dos laudos de biopsia e imunohistoquímica dos arquivos do LPLP, foram selecionados 42 espécimes de biopsia cirúrgica de linfonodos de diversas regiões anatômicas, oriundos de pacientes com diagnóstico morfológico, de qualquer um dos subtipos, e/ou imunohistoquímico com positividade demonstrada, pelo menos, para CD15 e/ou CD30, de LH. Não houve preferência por grupo determinado entre os pacientes e, portanto, blocos de pacientes de qualquer idade, sexo ou raça com diagnóstico de LH entre os anos de 2000 e 2006 foram incluídos no experimento.

Em todos os casos o diagnóstico morfológico de LH e subtipo histológico foram emitidos por um hematopatologista de acordo com a classificação da OMS de 2001 para LH (STEIN et al., 2001).

Foram excluídos do experimento pacientes cujo bloco de parafina fosse insuficiente para o estudo ou que sua utilização comprometesse o armazenamento posterior e pacientes cujo tecido constituinte da biopsia não fosse linfonodo.

4.5 Wet Lab

4.5.1 Preparação das amostras para extração de DNA

Para isolamento do DNA genômico as amostras foram preparadas* segundo uma adaptação do método descrito por Mesquita et al. (2001) em utilização de cortes parafinizados para extração de DNA, o qual constou das seguintes etapas:

- a) Obtenção de 10 cortes de 10 μ m de tecido parafinado em um tubo de centrifugação – tubo Eppendorf de 1,5ml;
- b) Adição de 1,0ml de xilol a temperatura ambiente (TA);
- c) Agitação em vortex;
- d) Aquecimento a 65°C em banho-maria seco durante 10 minutos;
- e) Agitação em vortex;
- f) Centrifugação a 14.000rpm durante 5 minutos;

- g) Descarte do sobrenadante;
- h) Repetição dos passos “b, c, d, e, f e g” até a remoção completa da parafina;
- i) Adição 1,0ml de etanol absoluto a temperatura ambiente;
- j) Agitação em vortex;
- k) Repetição dos passos “f e g”;
- l) Incubação a -30° C por 15 minutos;
- m) Adição de 1,0ml de etanol a 95% em água Milli-Q a temperatura ambiente;
- n) Agitação em vortex;
- o) Repetição dos passos “f e g”;
- p) Adição de 1,0ml de etanol a 70% em água Milli-Q, TA;
- q) Homogeneização e repetição dos passos “f e g”;
- r) Lavagem do material em 1,0ml de Tris-HCl 10mM, pH 7.5;
- s) Agitação durante 5 minutos;
- t) Descarte do Tris-HCl antes de iniciar a extração de DNA propriamente dita.

4.5.2 Extração do DNA

O protocolo para a extração de DNA foi baseado no método de fenol-clorofórmio modificado a partir de Milligan et al. (1998) e consistia das seguintes etapas:

- a) Adição ao tubo anterior previamente preparado de 700 μ l de tampão de extração e proteinase K numa concentração final de 10mg/ml. Agitação por inversão;
- b) Incubação da mistura a 65° C por 2-3 horas, ou até digestão completa do tecido, com agitação ocasional (a cada 15 minutos) por inversão;
- c) Adição 350 μ l de fenol e 350 μ l de 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico e agitação por inversão durante 5 minutos;
- d) Centrifugação a 7.000g por 5 minutos, para separar a fase aquosa.
- e) Remoção de 600 μ l da fase aquosa (superior) para um minitubo limpo, sem perturbar a interface;

- f) Adição de 600µl de 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico e agitação por inversão durante 5 minutos;
- g) Centrifugação a 7000g por 5 minutos, para separar a fase aquosa.
- h) Remoção cuidadosa de 450µl da fase aquosa (superior) para um minitubo limpo;
- i) Adição de 1,0ml de etanol absoluto e 50µl (0.1x a fase aquosa) de acetato de sódio e incubação a -30° C por 15 minutos;
- j) Centrifugação o DNA a 10.000g por 15 minutos, a 4°C;
- k) Descarte do sobrenatante por inversão, tomando cuidado para não perder o 'pellet' (o qual muitas vezes não é visível);
- l) Lavagem da amostra com 500µl de etanol 70% gelado, invertendo algumas vezes e centrifugação a 10.000 g por 5 min.;
- m) Descarte do etanol cuidadosamente e secagem do 'pellet' invertendo o tubo sobre um papel toalha, deixando em repouso por 5 minutos. Se o tubo não estiver seco depois disso, realizar aquecimento e secagem do tubo em banho-maria seco a 65°C por 10 minutos, com a tampa aberta;
- n) Ressuspensão da amostra em 50µl de TE;
- o) Para facilitar a ressuspensão as amostras foram incubadas em banho-maria seco a 60°C por 10 minutos.

Após a extração, as amostras de DNA genômico foram tratadas com RNase A numa concentração final de 10µg/µl e, então, incubadas por 01 hora a 37°C e mantidas numa temperatura de armazenamento de -30°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (VOVTAS, 1998) para verificação da contaminação e da qualidade das amostras.

4.5.3 Quantificação do DNA

A quantificação das amostras foi feita através da leitura em espectrofotômetro (BioMate™3 Spectrophotometer – Thermo Electron Corporation®) em comprimento de onda 260nm e 280nm. As amostras que apresentaram um nível de qualidade aceitável foram padronizadas numa concentração final de 60ng/µl,

quantidade suficiente para a realização da reação de PCR. Para o seqüenciamento as amostras foram padronizadas numa concentração final de 10ng/ μ l de produto de PCR.

4.5.4 Desenho dos *primers*

O *primer* utilizado nesta pesquisa foi específico para o éxon 8 do gene TP53 humano*. O *primer* foi delineado a partir da seqüência nucleotídica do éxon 8, obtida no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) - um banco de dados de seqüências biológicas mantido no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov); realizou-se desenho dos *primers* utilizando o *software* livre *Primer3*, um programa amplamente utilizado para delineamento de primers, disponível publicamente no endereço <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi (ROZEN; SKALETSKY, 1998).

Foram desenhados dois *primers*: um *forward* (PFw8) (5' – CAAGGGTGGTTGGGAGTAGA – 3') e um *reverse* (PRv8) (5' – TAACTGCACCCTTGGTCTCC – 3'), específicos para permitir a amplificação do fragmento de aproximadamente 200bp correspondente ao éxon 8 do gene TP53 na reação de PCR.

4.5.5 Reação de PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme Innis e Gelfand (1999), foi realizada numa reação de volume final de 25 μ l contendo 1 μ l de DNA genômico numa concentração final de 60 ng, 1 μ l de cada primer: PFw8 (5' – CAAGGGTGGTTGGGAGTAGA – 3') e PRv8 (5' – TAACTGCACCCTTGGTCTCC – 3') (NUNES; MEDEIROS, 2004), armazenados numa concentração de 10 pM/ μ l, 2,5 μ l de tampão 10X, acrescido de 0,6 μ l de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 50 mM, 1,5 μ l dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) numa concentração de 10 mM cada, 0.05 unidades de Taq DNA Polymerase) e água para completar volume final da reação.

A reação de amplificação foi realizada num aparelho termociclador modelo Primus 96 Plus (MWG-Biotech), consistindo de desnaturação inicial de 1,5 min. a 95°C, seguido de 39 ciclos de 1 min. a 94°C, 1,5min a 52°C e 1,5min. a 72°C, finalizando com uma extensão de 10min. a 72°C (THORGURSDOTTIR et al., 1999). Após o PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio (0.5 µg/ml), e visualizados em aparelho transiluminador sob radiação de luz ultravioleta (Transiluminador modelo FBTI 88, Fischer Scientific).

4.5.6 Purificação dos produtos de PCR

Antes de proceder ao seqüenciamento do DNA, os produtos de PCR foram purificados pelo método de precipitação com etanol/isopropanol (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001) para a eliminação dos terminais não incorporados que, por ventura, pudessem ser detectados pelo seqüenciador, prejudicando a qualidade das seqüências. O processo de precipitação consistiu das seguintes etapas:

- a) Adição de 90µl de isopropanol 75% em cada amostra;
- b) Agitação em vórtex e incubação das amostras à temperatura ambiente por 20 minutos;
- c) Centrifugação por 25 minutos a 14000rpm;
- d) Descarte do sobrenadante, e dar um *spin* invertido;
- e) Adição de 200µl de etanol 70% em cada amostra e agitação;
- f) Centrifugação de 10 minutos a 14000rpm;
- g) Descarte do sobrenadante, e dar um *spin* invertido;
- h) Secagem das amostras realizada no aparelho termociclador Primus 96 Plus (MWG-Biotech) a 90°C por 01 minuto;

O produto da reação de PCR foi ressuscitado com a adição de 10 µL de água mili-Q autoclavada e incubação por 01 hora em temperatura ambiente.

4.5.7 Seqüenciamento do produto de PCR

O seqüenciamento de DNA (SANGER et al., 1977) foi realizado na fita complementar dos produtos de PCR, utilizando o seqüenciador automático de DNA da marca ABI Prism[®] 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems).

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o *primer* PFW8 e terminais fluorescentes ddNTPs (ABI Prism[®] Big Dye[™] terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit Version 3.0, Applied Biosystems), com 30 ciclos que consistiam em desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 04 minutos.

A precipitação dos produtos não incorporados da reação de seqüenciamento foi realizada pela adição de isopropanol/etanol (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001) que consistiram dos seguintes passos:

- a) Adição de 80 µl de isopropanol 80% em cada amostra;
- b) Incubação das amostras à temperatura ambiente por 15 minutos protegidas da luz;
- c) Centrifugação por 45 minutos a 4000rpm;
- d) Descarte do sobrenadante, e dar um *spin* invertido;
- e) Adição de 100µl de etanol 70% em cada amostra;
- f) Centrifugação de 15 minutos a 4000rpm;
- g) Descarte do sobrenadante, e dar um *spin* invertido;
- h) Secagem das amostras realizada no aparelho termociclador Primus 96 Plus (MWG-Biotech) a 90°C por 01 minuto;

Após a precipitação dos produtos não incorporados, as amostras foram, então, ressuspensas em 10µl de formamida e desnaturadas a 95°C por 3 min, seguido de imersão em gelo por 01 minuto para promover um choque térmico. Após este processo, as amostras foram, então, levadas ao seqüenciador automático de DNA ABI Prism[®] 3100 (Applied Biosystems) mostrado na **Figura 8**.



Figura 8 - Seqüenciador Automático de DNA ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems).

4.6 Dry Lab

4.6.1 Análise bioinformática

As seqüências geradas pelo ABI Prism 3100 foram salvas em arquivos do tipo *.ab1 (onde * é o nome da seqüência), contendo aproximadamente 200pb cada.

As seqüências obtidas foram, então, submetidas a uma ferramenta de alinhamento pareado, o BLAST (NCBI, 2004), para certificação da identidade das seqüências com o gene TP53 e cromossomo 17 humano. O BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) é um programa clássico em bioinformática que consiste numa serie de algoritmos heurísticos que fazem uma busca local (no banco de dados referenciado) de alinhamento de seqüências homólogas que compartilham regiões isoladas de similaridade (alinhamento local).

Após a identificação, a análise e busca dos polimorfismos foi realizada, conforme o método descrito por Cornuet et al. 1999, mediante a observação de picos simultâneos em eletroferogramas produzidos pelo software Sequence Analysis® e visualizado pelo aplicativo Chromas® do sequenciador ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer.

Na análise, a posição para cada códon do éxon 8 determinante de parâmetro (272, 273, 278, 282, 306) era observada e a ausência de picos simultâneos classificava o indivíduo como homozigoto, enquanto a presença de picos simultâneos em uma mesma posição levava a classificação de um heterozigoto.

4.7 Análise Estatística

Os dados foram descritos na forma de frequência gênica na população. As associações entre as frequências dos diferentes genótipos e das mutações nos diferentes códons foram determinadas através de teste de Qui- quadrado a 1% de significância (SAS, 1999).

4.8 Aspectos Éticos

O presente estudo foi oriundo de projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do ICC/HC (Anexo A).

A obtenção destes materiais biológicos foi de arquivo e sua utilização não ocasionou alteração na rotina de exame ou procedimento envolvido. As amostras foram mantidas anônimas, salvo que novas informações geradas podiam beneficiar diretamente ao próprio paciente.

Devido a impossibilidade de obtenção de Consentimento Informado de todos os pacientes dos quais foram consultados os prontuários para coleta de dados, foi utilizado um Termo de Compromisso de Utilização de Dados (Apêndice A), preenchido por todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na manipulação de dados. Todas as pessoas, pesquisadores ou colaboradores, terão compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes quando da divulgação dos resultados. Os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, que deverá ser submetido à apreciação e aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Recuperação do DNA Parafinizado (Extração, Separação e Visualização de DNA Genômico Total)

Subseqüente à realização do protocolo de extração do DNA genômico a partir das microseções parafinizadas, as amostras de DNA extraído em solução foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A Figura 9 constitui uma fotografia de corrida em gel contendo 13 (das 42) amostras trabalhadas e foi obtida sem tratamento com RNase. A fotografia confirma a presença de DNA genômico em todas as amostras, mesmo nas canaletas 9 e 10, cujas bandas estão menos fluorescentes mas, ainda assim, podem ser visualizadas.

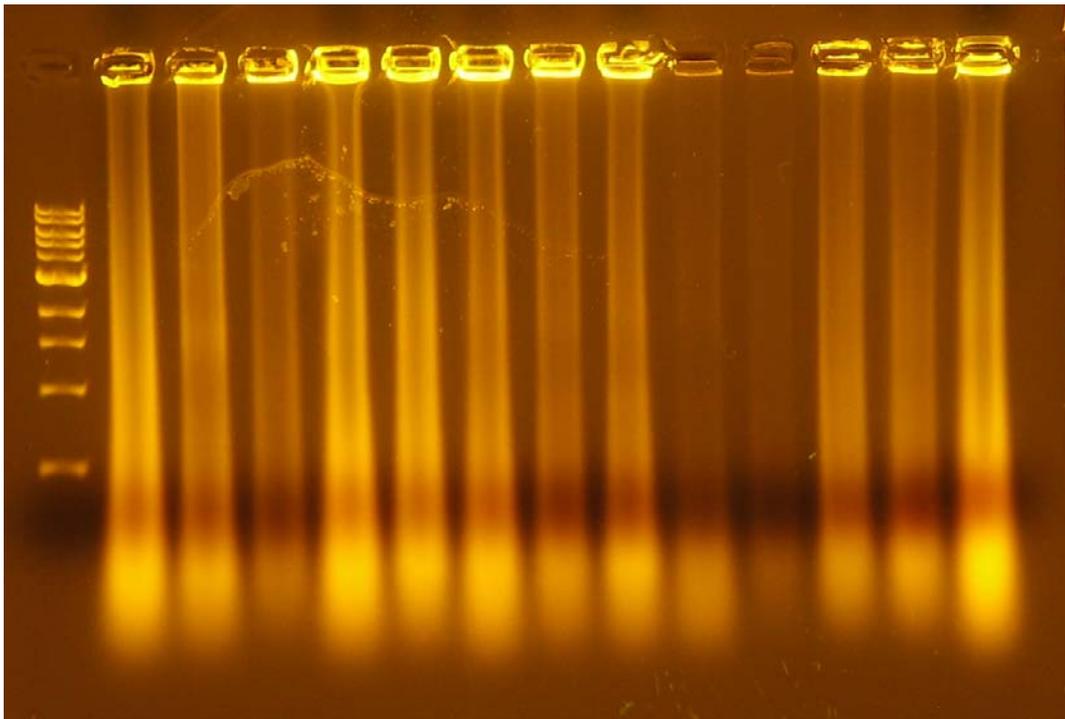


Figura 9 - Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 0,8% mostrando 13 (sete) canaletas contendo amostras de DNA genômico total de diferentes exemplares de Linfoma de Hodgkin logo após a extração.

As técnicas de otimização da extração de DNA para utilização na reação de PCR têm permitido a investigação de diferentes amostras biológicas mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades ou em qualidade duvidosa (p.ex., DNA ancestral ou fóssil). Vários campos da ciência são beneficiados com esse aperfeiçoamento, como a medicina forense, as investigações criminais, exclusão de paternidade, a busca de marcadores tumorais e de agentes infecciosos (BUENO, 2004).

A obtenção de DNA genômico pelos métodos convencionais inclui lise celular e procedimentos que tornam o DNA disponível para extração. Para isso, vários são os passos laboratoriais necessários, o que torna o procedimento longo e pode fazer com que o rendimento e a pureza do material nem sempre sejam adequados e que as concentrações inicialmente estimadas necessitem de reajustes para a seqüência do protocolo. Além disso, a excessiva manipulação da amostra pode degradar o DNA em vários níveis.

Arquivos de laboratórios de anatomia patológica no mundo inteiro contêm uma grande quantidade de tecidos (tumorais ou não) mantidos em blocos de parafina que constituem uma fonte extremamente rica de material biológico que pode permitir estudos retrospectivos para elucidar mecanismos patogénéticos de doenças a partir do estudo morfológico ou molecular dessas amostras.

A fixação de tecidos com formalina a 10% é um método prático e eficiente para a preservação arquitetural do tecido, sendo assim largamente utilizado em anatomia patológica. Porém, esse tipo de fixação por tempo prolongado resulta no enovelamento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA, assim como da fragmentação deste (ISOLA et al., 1994). Após a fixação, os processos de desidratação, diafanização com xilol e parafinização, sujeitando as amostras a altas temperaturas, também podem participar da degradação do DNA genômico. Assim sendo, para os estudos de biologia molecular, o tecido embebido em parafina e arquivado pode constituir um problema, uma vez que esse material pode ser inadequado para a maioria das técnicas moleculares que requerem grande quantidade de DNA genômico, pois a degradação deste DNA ocorre naturalmente com o tempo (LIBÓRIO et al., 2005).

Em nosso experimento, as 42 amostras provinham de arquivo entre os anos 2000 e 2006 (07 anos), um tempo não muito longo que poderia classificar

nossas amostras como inadequadas para análise. Isso corrobora com o estudo realizado por Libório et al. (2005), que conseguiram extrair com sucesso DNA genômico de material de até quarenta anos arquivado em parafina e que, mesmo degradado, o DNA antigo não impediu a amplificação pela reação de PCR. Isso também foi constatado por diversos outros autores (AKALU; REICHARDT, 1999; COATES et al., 1991; JACKSON et al., 1990; MIES, 1994; SHIBATA et al., 1988). Os resultados do presente trabalho, no qual todas as 42 amostras tiveram DNA devidamente recuperado, também corroboram os dados reportados na literatura.

Pavelic et al. (1996) afirmaram que a fixação em formalina causava danos irreversíveis ao DNA se as amostras fossem expostas a grandes períodos de fixação. Isso, porém, não representou um problema em nosso estudo, uma vez que o tempo de fixação das amostras testadas não ultrapassava 24 horas, já que nossas amostras eram previamente submetidas a diagnóstico morfológico e imunohistoquímico para classificação do linfoma de Hodgkin, e tempos superiores a esse de fixação poderiam prejudicar o processo de fenotipagem.

Um outro fator limitante, durante o processo de extração, poderia ser a quantidade de DNA genômico disponível para análise subsequente, uma vez que a dimensão das amostras fonte (microsecções de blocos de parafina) poderia restringir a quantidade recuperada de DNA. No entanto, isto não chegou a ser um problema considerável no presente trabalho, conforme descrito abaixo em termos dos resultados obtidos com os procedimentos para quantificação do DNA recuperado.

5.2 Quantificação do DNA Genômico Total

A quantificação das amostras foi feita através da leitura em espectrofotômetro (BioMate™3 Spectrophotometer – Thermo Electron Corporation®) em comprimento de onda de 260 a 280nm. Os resultados desta quantificação podem ser observados na Tabela 1. A quantidade de DNA presente em cada amostra foi utilizada como parâmetro para dosar a quantidade de ácido nucléico (concentração final de 60ng/μl) a ser adicionado à reação de PCR.

Tabela 2 - Quantidade (valor de 260), pureza (valor da relação 260/280) e concentração do DNA obtidos a partir da extração para os casos de Linfoma de Hodgkin (n=20).

Amostra (An)	OD* 260	OD* 280	Relação 260/280	Concentração de DNA (µg/ml)
A01	0,001	-0,003	-0,333	170,9
A02	0,093	0,052	1.788	397.8
A03	0,023	0,014	1.643	942.7
A04	0,033	0,017	1.941	1464
A05	0,038	0,025	1.520	1490
A06	0,047	0,028	1.679	1948
A07	0,030	0,011	2.727	1491
A08	0,051	0,028	1.821	2200
A09	0,071	0,038	1.868	3098
A10	0,028	0,010	2.800	1401
A11	0,031	0,019	1.632	1266
A12	0,064	0,036	1.778	2730
A13	0,032	0,019	1.684	1329
A14	0,030	0,018	1.667	1239
A15	0,024	0,016	1.500	933.6
A16	0,034	0,026	1.308	1203
A17	0,023	0,014	1.643	942.7
A18	0,028	0,019	1.474	1077
A19	0,025	0,017	1.471	960.5
A20	0,032	0,020	1.600	1293
A21	0,025	0,019	1.316	888.5
A22	0,022	0,015	1.467	843.8
A23	0,034	0,024	1.417	1275
A24	0,019	0,016	1.188	619.1
A25	0,021	0,014	1.500	816.9
A26	0,035	0,020	1.750	1482
A27	0,031	0,019	1.632	1266
A28	0,109	0,073	1.493	4228

A29	0,049	0,033	1.485	1894
A30	0,105	0,067	1.567	4193
A31	0,064	0,045	1.422	2406
A32	0,045	0,031	1.452	1714
A33	0,034	0,022	1.545	1347
A34	0,036	0,024	1.500	1400
A35	0,031	0,017	1.824	1338
A36	0,038	0,022	1.727	1598
A37	0,023	0,010	2.300	1087
A38	0,026	0,009	2.889	1311
A39	0,022	0,007	3.143	1132
A40	0,068	0,040	1.700	2837
A41	0,067	0,039	1.718	2810
A42	0,032	0,022	1.455	1221

*Densidade óptica

5.3 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada para isolar, a partir do DNA genômico total, e amplificar especificamente o fragmento de 137pb do quadro aberto de leitura (ou ORF, *open reading frame*) do éxon 8 do gene TP53, utilizando os *primers* que flanqueiam o fragmento determinado (PFw8 – *foward* e PRv8 – *reverse*) e amplificam o trecho alvo.

Ao término da reação de PCR, as amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel de agarose (agora realizada numa concentração de 1%) para verificação do tamanho e qualidade dos produtos de PCR, que devem ser de aproximadamente 137pb, como observado na Figura 10. O gel exibido nesta figura confirma indiscutivelmente a consistência da amplificação bem sucedida em todas as amostras testadas (nesta figura estão dispostas apenas 15 amostras, mas o padrão satisfatório da reação foi evidenciado nos 42 exemplares).

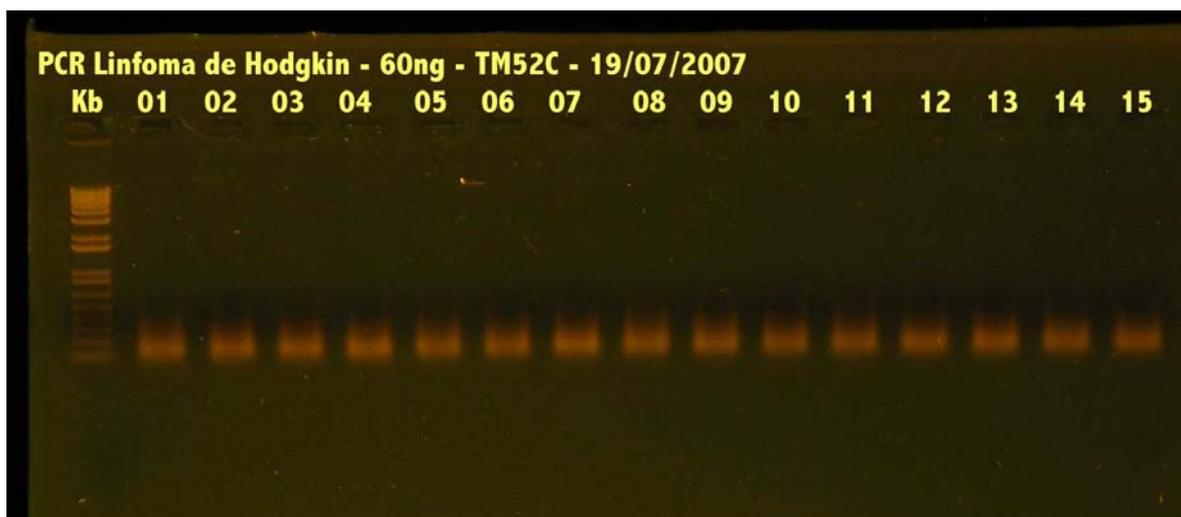


Figura 10 - Fotografia de eletroforese em gel de agarose para visualização de bandas contendo os produtos de PCR relativos ao éxon 8 do gene TP53 nas amostras de Linfoma de Hodgkin. A canaleta 1 (à esquerda), apresenta o padrão molecular de DNA (DNA *Ladder*, 1KB – 0.5-10kb contendo 11 bandas, SIGMA[®]), enquanto nas demais canaletas são separadas as respectivas bandas para as 15 amostras corridas neste ensaio.

É consenso entre os pesquisadores que ocorre degradação e fragmentação do DNA após processamento histológico (KULLMANN et al., 1998; LIU et al., 1993) e o sucesso para a reação de PCR só ocorreria caso os fragmentos alvo para amplificação tivessem em torno de 200bp. Nosso fragmento alvo era o éxon 8 que possui 137pb, estando, portanto, dentro do considerado razoável para amplificação viável. Inclusive, vale ressaltar que há relatos na literatura dando conta de uma extensão ideal de menos de 200pb para a seqüência amplificável (BAREA et al., 2004; LIBÓRIO et al. 2005; MESQUITA et al., 2001), o que pôde ser realmente confirmado através de nossos resultados.

De fato, pequenos segmentos de DNA são potencialmente utilizados em grande parte dos métodos de biologia molecular como a reação de PCR, que permite a amplificação de regiões específicas no genoma, a partir de quantidades mínimas de DNA (o cúmulo sendo mesmo uma única molécula de DNA), ainda que degradado ou danificado (SAIKI et al., 1988). Em vista disso, o DNA antigo, assim recuperado pela tecnologia da Taq polimerase, torna-se uma fonte de escolha

inestimável, pois permite aos pesquisadores em geral e aos patologistas em particular a utilização de quaisquer tecidos fixados em formalina e incluídos em bloco de parafina (SEPP et al., 1994), além de outros materiais de arquivo e de fontes escassas de DNA.

Neste contexto, o presente trabalho experimental foi extremamente bem sucedido, uma vez que os resultados alcançados nas etapas iniciais de extração, purificação e amplificação do DNA parafinado foram completamente compatíveis com os objetivos originalmente previstos de padronização das técnicas para a manipulação desta fonte de DNA.

5.4 Reação de Seqüenciamento dos Produtos de PCR do Gene TP53 em Tumores de Linfoma de Hodgkin e Visualização dos Eletroferogramas.

O seqüenciamento dos fragmentos gerou, dentre outros formatos de dados, um arquivo gráfico contendo picos representativos dos quatro nucleotídeos ou bases possíveis (A para adenina, T para timina, C para citosina e G para guanina) e as posições relativas das bases, como números na parte superior, acima da discriminação de cada base representada por seu pico. A Figura 11 abaixo ilustra o eletroferograma de uma das 42 amostras analisadas. A seqüência é apresentada desde a posição 01 ate 30 do fragmento.

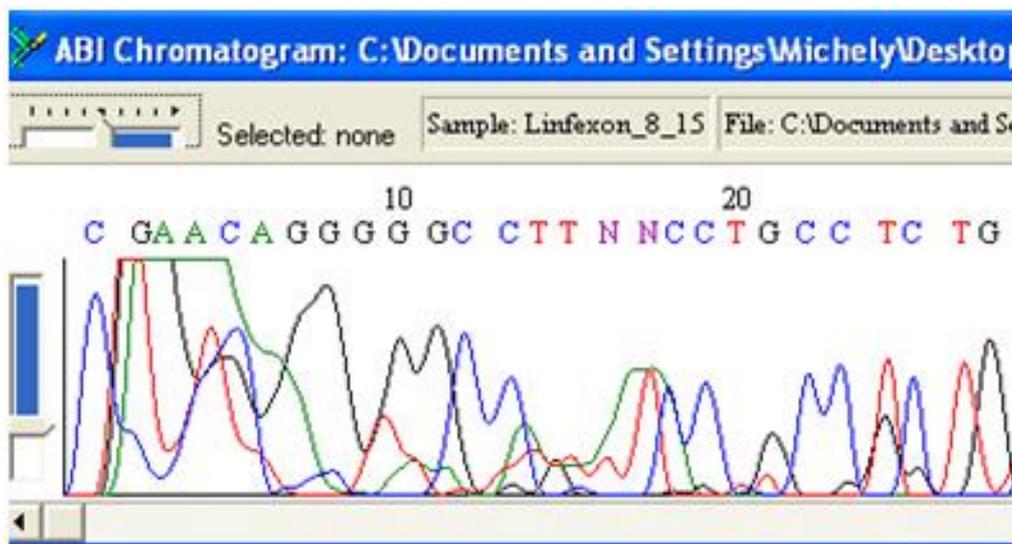


Figura 11 - Exemplo de um eletroferograma visualizado pelo aplicativo *Chromas*[®] (da Applied Biosystems) em uma interface gráfica para melhor visualização de picos e posições.

5.5 Busca e Análise de Polimorfismos nas Seqüências do Gene TP53 em Tumores de Linfoma de Hodgkin.

As seqüências foram, subseqüentemente, analisadas individual- e manualmente por confirmação visual comparativa com os cromatogramas originais visualizados pelo aplicativo *Chromas*[®] (versão 1.45 – 32 bit, McCarthy, 1996). Os códons 272 (G para A – GTG para ATG), 273 (G para A – CGT para CAT), 278 (C para A – CCT para CAT), 282 (C para T – CGG para TGG) e 306 (C para T – CGA para TGA) foram analisados para distinção tentativa dos genótipos humanos do gene TP53.

A condição de homozigose ou heterozigose dos genótipos seqüenciados foi analisada pela localização direta dos códons esperados como polimórficos (272, 273, 278, 282 e 306) nos eletroferogramas de cada seqüência e, conforme pode ser visto na figura 11, não foi possível determinar polimorfismos nos códons seqüenciados do éxon 8. Como a qualidade das seqüências do DNA parafinado é sabidamente um fator limitante, os resultados obtidos nessa etapa ficam, portanto, comprometendo uma interpretação acurada dos eletroferogramas obtidos. A dificuldade nesta avaliação, já esperada pelos relatos similares de outros experimentos na literatura, reforça a necessidade de novas otimizações na reação de seqüenciamento para obtenção de *reads* mais confiáveis e com picos melhor definidos para inferências mais conclusivas.

Sendo assim, ao todo, 42 tumores de linfoma de Hodgkin foram analisados quanto ao éxon 8 do gene TP53 humano e tiveram seus genótipos tentativamente determinados para o haplótipo éxon 8 do TP53. Não foi possível, neste momento, e nas circunstâncias testadas, detectar os já conhecidos dimorfismos nos códons 272, 273, 278, 282 e 306 que foram catalogadas, inclusive, em outras neoplasias (DU et al., 1995; SANDER et al., 1993; OVERHOLTZER et al., 2003; LIU; BODMER, 2006).

O fato de não terem sido detectados, nas amostras testadas, os SNPs que se esperava levanta duas possibilidades: a primeira, de que realmente não ocorra essa variação polimórfica neste exon no linfoma de Hodgkin (já que os SNPs deste exon são bem conhecidos em outros tipos de tumores, mas não no linfoma de Hodgkin (LIU; BODMER, 2006), e a segunda, de que simplesmente a qualidade das seqüências obtidas do DNA parafinado sejam o fator limitante na análise (BAREA et al., 2004; LIBÓRIO et al., 2005; MESQUITA et al., 2001). Deste modo, independente de qual das duas possibilidades seja a verdadeira, os resultados aqui obtidos são muito encorajadores para a continuação desta linha de pesquisa (patogenômica em linfomas Hodgkin) porque foram suficientemente consistentes em sua principal meta: a de propiciar uma padronização local de técnicas moleculares para esse tipo de abordagem diagnóstica. Por conseguinte, mesmo diante do relativo obstáculo na detecção clara dos picos nos eletroferogramas, que, em última instância, impedem uma interpretação segura dos *reads* obtidos pelo método de Sanger no seqüenciador automático de DNA, resta-nos a certeza de que todo o trabalho inicial de preparo e recuperação do DNA danificado pelo tratamento histotécnico, assim como de amplificação deste por PCR, foi plenamente recompensado por resultados excelentes.

Perspectivas futuras se apresentam alvissareiras, especialmente quando se considera a recente descoberta de novas enzimas similares à Taq polimerase e que prometem ser particularmente desenvolvidas para emprego na amplificação de DNA danificado. Já que a etapa de amplificação reconhecidamente é um gargalo na técnica para DNA antigo, o seu refinamento certamente melhorará as chances de qualidade mais alta no seqüenciamento sucedâneo. Confirmações reprodutíveis em outros experimentos e com as possíveis adaptações metodológicas (p. ex., testando a nova polimerase ou usando controles de DNA tumoral fresco) poderão guiar investigações futuras para comprovação definitiva da ausência destes polimorfismos ora suposta.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar localmente pelo menos duas técnicas para acesso ao DNA parafinizado (extração e purificação do DNA) que, sabidamente, é de difícil recuperação, mas que, neste trabalho, a partir de otimizações realizadas em termos de quantidade e periodicidades nas etapas metodológicas, foi plenamente recuperado de todas as 42 amostras testadas;
- Também foi padronizado localmente o ensaio de amplificação de DNA parafinizado por PCR que, da mesma maneira que em relação à extração e purificação do DNA danificado pelo tempo ou tratamento histotécnico, é de difícil realização, exigindo, geralmente requisitos de exímia excelência laboratorial para o resultado positivo, aqui alcançado em 100% das amostras testadas;
- A análise genética do DNA de tumores do arquivo diagnosticados histologicamente como linfoma de Hodgkin foi realizada com relativo sucesso, tendo sido as seguintes etapas alcançadas:
 - a) Através de estudos minuciosos, foi selecionada a região-alvo para genotipagem no gene TP53: o exon 8;
 - b) O exon 8 foi devidamente amplificado em todas as amostras de DNA analisadas, pois o desenho dos primers forward e reverse exclusivos (um outro diferencial obtido neste trabalho) foi um forte elemento para esta outrora rara amplificação;
 - c) O sequenciamento automático do DNA parafinizado foi devidamente realizado, sendo possível determinar, com segurança e confiabilidade previstas em parâmetros convencionais, a seqüência de pelo menos 32 amostras; contudo, não se obteve distinção suficiente dos picos de eletroferogramas para a determinação de eventuais polimorfismos na região analisada.
- Não foi possível, portanto, verificar com margem de segurança razoável a presença ou ausência de SNPs nas amostras seqüenciadas;
- Há, contudo, uma qualificação e competência laboratorial instalada localmente (em Fortaleza), a partir da experiência desenvolvida com o esforço deste trabalho, para continuar a investigação molecular em prol da

determinação, em futuro breve, da ocorrência ou não de SNPs no exon 8 do TP53 em linfoma de Hodgkin.

REFERÊNCIAS

AKALU, A.; REICHARDT, J. K. V. A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. **Genet Anal**, v. 15, n. 6, p. 229-233, 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. Grapped BLSAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALTSHULER, D. et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 513-516, 2000.

APPLIED BIOSYSTEMS. **AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit: User's Manual**, Foster City, CA, 2001.

BANDOH, N. et al. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 7, p. 1968-1980, 2002.

BANKS, P. M. Pathology of malignant lymphomas. In: BENTLER, E. et al. **Williams hematology**. 5. ed. Philadelphia: MacGraw Hill, 1995. cap. 109, p. 1049-1075.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-81, 2004.

BASIC-JUKICI, N. et al. Reed-Sternberg cells in the pathogenesis of Hodgkin's disease. **Acta Med Croatica**, v. 55, n. 3, p. 115-121, 2001.

BECKMAN, G. et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum Hered**, v. 44, n. 5, p. 266-270, 1994.

BEGG, C. B.; et al. A design for cancer case-control studies using only incident cases: experience with the GEM study of melanoma. *International Journal of Epidemiology*, v. 35, n. 3, p. 756-764, 2006.

BIGNI, R. **Linfoma não Hodgkin**. 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=457>. Acesso em: 29 jan. 2006.

BRÄUNINGER, A. et al. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 16, p. 1239-1247, 1999.

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 233-234, 2004.

CHAN, J. K. C. The New World Health Organization Classification of Lymphomas: The past, the present and future. **Hematological Oncology**, v. 19, n. 4, p. 129-150, 2001.

CHANG, H. M. et al. Phase II Study of Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Gastric Cancer Previously Treated with 5-Fluorouracil and Platinum. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 5, p. 251-255, 2005.

COATES, P. J. et al. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. **Jornal of Clinical Pathology**, v. 44, n. 2, p. 115-118, 1991.

COLLINS, F. S.; GUYER, M. S.; CHAKRAVARTI, A. Variations on a Theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation. **Science**, 278, n. 5343, p. 1580–1581, 1997.

COLLINS, A.; LONJOU, C.; MORTON, N. E. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 96, n. 26, p. 15173–15177, 1999.

COOPER, D. N.; KRAWCZAK, M. **Human gene mutation**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995.

CORNUET, J. M. et al. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. **Genetics**, v. 153, n. 4, p. 1989-2000, 1999.

DAWSON, E. et al. A SNP resource for human chromosome 22: extracting dense clusters of SNPs from the genomic sequence. **Genome Research**, v. 11, n. 1, p. 170-178, 2001.

DEVEREUX, T. R.; TAYLOR, J. A.; BARRET, J. C. Molecular mechanisms of lung cancer. **Chest**, v. 109, p. 14s-19s, 1996.

DU, M. et al. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Blood**, v. 86, n. 12, p. 4587-4593, 1995.

EKSTRAND, B. C.; HORNING, S. J. Hodgkin's disease. **Blood Reviews**, v. 16, n. 2, p. 111-117, 2002.

FERREIRA, F. V. A.; OLIVEIRA, E. G.; ALENCAR, J. E. B. Doença de Hodgkin: peculiaridades estatísticas em Fortaleza, Ceará, Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 17, p. 15-8, 1977.

GAO, C. Y.; ZELENKA, P. S. Cyclins, cyclins-dependent kinases and differentiation. **Bioessays**, v. 19, n. 4, p. 307-315, 1997.

GEMIGNANI, F. et al. Generation of a DNA microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. **Journal of Virological Methods**, v. 119, n. 2, p. 95-102, 2004.

GREENBLATT, M. S. et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

GOEDERT, J. J. et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. **The Lancet**, v. 251, p. 1833-1839, 1998.

GOLONI, C. B. V. **Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico BCR/ABL e do cromossomo 20 em leucemias**. 2000. 150 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto.

GOLONI, C. B. V. **Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico BCR/ABL e do cromossomo 20 em leucemias**. 2001. 150 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto.

GUMP, J. et al. Analysis of TP53 mutations in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, n. 7, p. 416-419, 2001.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Advances in Cancer Research**. v. 77, p. 81-137, 2000.

HALUSKA, F. G.; BRUFISKY, A. M.; CANELLOS, G. P. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. **Blood**, v. 84, n. 4, p. 1005-1019, 1994

HANSMANN, M .L.; WILLENBROCK, K. WHO Classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance. **Pathologe**, v. 23, n. 3, p. 207-218, 2002.

HARRIS, N. L. Hodgkin's Lymphoma: classification, diagnosis and grading. **Seminars Hematology**, v. 36, n. 3, p. 220-232, 1999.

HERCHER, C. et al. A multicentric study of 41 cases of B-prolymphocytic leukemia: two evolutive forms. **Leuk Lymphoma**, v. 42, n. 5, p. 981-987, 2001.

HODGSON, S. V.; MAHER, E. R. **Human cancer genetics**. 2. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 1999. 336 p.

HORNING, S. J. Hodgkin Lymphoma. In: BEUTLER, E. et al. (Ed). **Williams Hematology**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1215-1235.

HUDSON, M. M.; DONALDSON, S. S. Treatment of pediatric Hodgkin lymphoma. **Seminars in Hematology**, v. 36, p. 313-323, 1999.

HUMMEL, M. et al. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue. Expression and cellular localization of EBV gene products. **British Journal of Haematology**. v. 82, n. 4, p. 689-694, 1995.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. **PCR Applications: Protocols for Functional Genomics**. Academic Press, 1999.

ISOLA, J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.

JACKSON, D. P. et al. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 6, p. 499-504, 1990.

JEMAL A.; WARD, E. M.; THUN, M. J. Practice of Oncology. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S. ROSENBERG, S. A. (Ed.) **Epidemiology of Cancer in Câncer: principles & Practice of Oncology** . 7. Ed. Portugal: Wolters Kluwer, 2005. p. 226-241.

JIN, X. et al. Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 9, p. 2205-2208, 1995.

JONG, M. M. et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. **Jornal of Medical Genetics**, v. 39, p. 225-242, 2002.

JORDAN, B. et al. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2942-2947, 2002.

JORDE, L. B. et al. **Genética Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 297 p.

KAWAJIRI, K. et al. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 6, p. 1085-1089, 1993.

KLEYN, P. W.; VESELL, E. S. Genetic Variation as a Guide to Drug Development. **Science**, v. 281, n. 5384, p. 1820-1821, 1998.

KULLMANN, M. et al. RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14620-14625, 1998.

LAMB, P.; CRAWFORD, L. Characterization of the Human p53 Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 5, p. 1379-1385, 1986.

LANDER, E. S. The New Genomics: Global Views of Biology. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 536-539, 1996.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T-antigen is bound to host protein in SV40 transformed cells. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261-263, 1979.

LAYTRAGOON-LEWIN, N. et al. Significance of phosphotyrosine proteins, Bcl-2 and p53 for apoptosis in resting B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 3, p. 344-348, 2002.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LI, F. P. et al. A cancer family syndrome in 24 kindreds. **Cancer Research**, v. 48, n. 18, p. 5358-5362, 1988.

LIBÓRIO, T. N. et al. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin embedded oral samples archived for the past 40-years. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 405-10, 2005.

LIU, T. et al. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 2, p. 223-232, 2002.

LIU, Y.; BODMER, W. F. From the cover: analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 4, p. 976-981, 2006.

LOZANO, G.; LEVINE, A. J. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. **Molecular Carcinogenesis**, v. 4, n. 1, p. 3-9, 1991.

LUSIS, M. K. P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 175-178, 2000.

MATTICK, J. S. Introns: evolution and function. **Curr Opin Genet Dev.**, v. 4, n. 6, p. 823-831, 1994.

MESQUITA, R. A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

MIES, C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. **Human Pathology**, v. 25, n. 6, p. 555-60, 1994.

MILLIGAN, B. G. Total DNA isolation. In: HOELZEL, A. R. (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: a practical approach**. 2. ed. Oxford: IRL Press, 1998. p 29-64.

MITANI, K. Disease-related gene and tumor progression. **Nippon Rinsho**, v. 59. n. 12, p. 2316-2321, 2001.

MORI, T.; ANAZAWA, Y.; IIZUMI, M. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. **Oncogene**, v. 21, n. 18, p. 2914-2918, 2002.

NAKAMURA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 2102-2107, 2002.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **BankIt: GenBank Submissions by WWW**. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>>. Acesso em: 29 jan. 2006.

NICKERSON, D. A. et al. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. **Nature Genetics**, v. 19, n. 13, p. 233-240, 1998.

NUNES, J. da C.; MEDEIROS, A. C. de. Mutações do Gene TP53 no linfoma de Hodgkin / Mutations of the TP53 Gene in Hodgkin's Lymphoma. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 8, n. 3, p. 255-264, 2004.

OLIVIER, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**, v. 19, n. 6, p. 607-614, 2002.

OLIVIER, M. et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 4, p. 1157-1167, 2006.

ORR-WEAVER, T. L.; WEINBERG, R. A. A checkpoint on the road to cancer. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 223-224, 1998.

OVERHOLTZER, M. et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 20, p. 11547-11552, 2003.

PALMER, L. J.; COOKSON, W. O. C. M. Atopy and asthma. In: BISHOP, T; BISHOP, D. T.; SHAM, P. (Ed.) **Genetic Analysis of Multifactorial Diseases**. London: BIOS Scientific Publishers, 2000. p. 215–237.

PALMER L. J.; COOKSON W. O. C. M. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. **Respiratory Research**, v. 2, p. 102–112, 2001.

PARKIN, et al. Global cancer statistics, 2002. **CA A Cancer Journal of Clinicians**. v. 55, n. 2, p. 74–108, 2005.

PAVELIC, J. et al. PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. **Neoplasma**, v. 43, n. 2, p. 75-81, 1996.

PETTITT, A. R. et al. P53 dysfunction in B-cell Chronic Lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. **Blood**, v. 98, n. 3, p. 814-822, 2001.

PILERI, S. A. et al. Hodgkin's Lymphoma: the pathologist's viewpoint. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 3, p. 162-176, 2002.

PITOMBEIRA, A. da S. et al. Histiocitose X: revisão e apresentação de um caso / Histiocytosis X: review and report of a case. **Rev. méd. HGF**, v. 3, n. 2/3, p. 76-80, 1987.

POPPEMA, S. et al. Report: workshop on mediastinal grey zone lymphoma. **European Journal Haematology**, v. 66, p. 45-52, 2005. Suplemento.

RISCH N.; MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1516–1517, 1996.

ROBBINS; COTRAN. *Pathologic Basis of Disease – Interactive Case Study CD Companion*. São Paulo: Elsevier, 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3**. 1998. Disponível em: <http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html>. Acesso em: 10 jan. 2007.

SAEKI, K.; OKUMA, E.; YUO, A. Recurrent growth factor startivation promotes drug resistance in human leukaemic cells. **British Journal of Cancer**, v. 21, p. 292-300, 2002.

SAIFUDEEN, Z. X.; DIPP, S.; EL-DAHR, S. S. A role for p53 in terminal epithelial cell differentiation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 8, p. 1021-1030, 2002.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANDER, C. A. et al. P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. **Blood**, v. 82, n. 7, p. 1994-2004, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARNOW, P. et al. Adenovirus EI B-58KD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are pgysically associated with the same 54 KD cellular protein in transformed cells. **Cell**, v. 28, n. 2, p. 387-394, 1982.

SAS INSTITUTE INC. **User's guide**: basic and statistic. Cary: SAS, 1999. 1686 p.

SEITZ, V. et al. Detection od clonal T-cell receptor gama-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells od classic Hodgkin disease. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3020-3024, 2000.

SEPP, S. et al. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 4, p. 318-323, 1994.

SHEN, H. M.; YANG, C. F.; ONG, C. N. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **International Journal of Cancer**, v. 81, n. 5, p. 820-828, 1999.

SHIBATA, D.; MARTIN, W. J.; ARNHEIM, N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. **Cancer Research**, v. 48, n. 16, p. 4564-4566, 1988.

SPECTOR, N. Abordagem atual dos pacientes com Doença de Hodgkin. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 35-42, 2004.

STEIN, H. et al. Hodgkin's Lymphoma. In: JAFFE, E. S. et al. (Ed.) **Pathology and Genetic Tumors of Hematopoietic and Lymphoid System**. World Organization Classification of Tumors. IARC Press; Lyon, 2001. p. 244-253.

STILGENBAUER, S.; LICHTER, P.; DOHNER, H. Genetic Features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Reviews in Clinical & Experimental Haematology**, v. 4, n. 1, p. 48-72, 2000.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 576 p.

THOMAS, R. K. et al. Epidemiology and Etiology of Hodgkin's Lymphoma. **Annals of Oncology**, v. 3, p. 147-151, 2002. Suplemento.

THOMAS, R. K. et al. Part I: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2004.

TSCHAN, M. P. et al. Different p16INK4a and p14ARF expression patterns in acute myeloid leukaemia and normal blood leukocytes. **Leuk Lymphoma**, v. 42, p. 1077-1087, 2001.

TSUI, C. et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 16, p. 4910-4916, 2003.

VARLEY, J. M. et al. An extended Li-Fraumeni Kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. **Journal of Medical Genetics**, v. 32, n. 12, p. 942-945, 1995.

VASSALO, J. et al. Classificação histológica de 1.025 casos de linfoma de Hodgkin do Estado de São Paulo, Brasil. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 3, p. 134-136, 2005.

VOGT, U. et al. P53 Gene status in relation to ex vivo chemosensitivity of non-small cell lung cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 128, n. 3, p. 141-147, 2002.

VON WASIELEWSKI, R. et al. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. **Cancer Research**, v. 57, p. 2501-2507, 1997.

VOVTAS, Daniel. Agarose gel electrophoresis. **Current Protocols in Immunology**, Chapter 10, section II, unit 10.4, 1998.

WANDS, J.; BLUM, H. E. Primary hepatocellular carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 10, p. 729-731, 1991.

WAGNER, J. et al. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 22, p. 1707-1710, 1994.

WEBER, W. W. **Pharmacogenetics**. New York : Oxford, 1997.

WEINERT, T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 555-558, 1998.

WILTSHIRE, T. et al. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, n. 6, p. 3380-3385, 2003.

WRIGHT, C. F. et al. Detection of Epstein-Barr virus sequences in Hodgkin's disease by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Pathology**, v. 139, n. 2, p. 393-398, 1991

WRIGHT, D. H. Lymphomas of Waldeyer's Ring. **Histopathology**, v. 24, n. 1, p. 97-99, 1994.

WU, X.; et al. p53 Genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 9, p. 681-690, 2002.

YAMAGUCHI, K. et al. Retrospective analysis of 70 operations for gallbladder carcinoma. **British Journal of Surgery**, v. 84, n. 2, p. 200-204, 1997.

YAMAGUCHI, H. et al. Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 15, n. 11, p. 1729-1734, 2001.

YAMAGUCHI, K. et al. Polymerase chain reaction based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 92, n. 2, p. 307-312, 2002.

YUNG, L.; LINCH, D. Hodgkin's Lymphoma. **The Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 943-951, 2003.

APÊNDICE A - TERMO DE COMPROMISSO E UTILIZAÇÃO DOS DADOS

Eu, _____, pesquisador do projeto Polimorfismos do gene TP53 no Linfoma de Hodgkin, garanto a manutenção da privacidade e da confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes quando da divulgação dos resultados. Os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, e, portanto, ser submetido novamente à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ - CEP - ICC



Fortaleza, 22 de setembro de 2005

Ao Investigador Principal
Daniel de Araújo

Levamos ao seu conhecimento de V. Sa que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará – CEP-ICC, em sua em sua reunião de 22.09.2005, aprovou o Projeto “POLIMORFISMOS DO GENE TP 53 DO LINFOMA DE HODGKIN”, de sua responsabilidade, na condição de investigador, após ter sido o mesmo apreciado por um dos membros deste Comitê de Ética, merecendo aprovação.

Cordiais saudações,

Dr. Marcelo Gugel Carlos da Silva
Presidente do C.E.P- HC-ICC

**ANEXO B – ANAIS CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA - HEMO 2007(CAPA)**

ISSN 1516-8484

**REVISTA BRASILEIRA
DE HEMATOLOGIA
E HEMOTERAPIA**

Volume 29 – Suplemento 3 - Novembro 2007

**ANAIS DO
CONGRESSO BRASILEIRO DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
HEMO 2007**

**30º CONGRESSO DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**

**23º CONGRESSO NACIONAL
DO COLÉGIO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA**

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA

**07 A 10 DE NOVEMBRO DE 2007
SÃO PAULO - SP - BRASIL**



Órgão Científico
Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia

ANEXO C – ANAIS CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA – HEMO 2007(CONTRA-CAPA)



6º Congresso Brasileiro de Hematologia Pediátrica
7 a 10 de novembro
São Paulo - SP - Brasil

Eventos Multidisciplinares

- 3º Simpósio de Psicologia Hospitalar em Hematologia
- 11º Simpósio Nacional de Captação de Doadores de Sangue
- 7º Encontro de Enfermagem em Hematologia, Hemoterapia e TMO
- 9º Simpósio de Odontologia em Hematologia

A N A I S

Comissão Executiva
Carlos Sérgio Chiattoni
Dante Mário Langhi Jr.
Dimas Tadeu Covas
Fernando Ferreira Costa
Gisele Colleoni
José Orlando Bordin
Marcelo Adcias de Carvalho
Sara Teresinha Olalla Saad

Realização



30º Congresso
da Sociedade Brasileira
de Hematologia
e Hemoterapia



23º Congresso
Nacional do
Colégio Brasileiro
de Hematologia

Diretoria do Congresso

Sara Teresinha Olalla Saad
Presidente
Gisele Colleoni
Vice-presidente
Dante Mário Langhi Jr.
Vice-presidente



ANEXO D – Resumo da dissertação publicada nos Anais Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2007.

Temas livres/Abstracts – Hematologia

Rev. bras. hematol. hemoter., novembro 2007;29, suplemento 3:7-249

to, cada vez mais preciso, dos aspectos morfológicos do LH, entendemos que a sua patogenia e comportamento biológico ainda guardam muitos desafios. Parece existirem 'vários' linfomas de Hodgkin. As evidências na diferença de comportamento clínico nas diversas formas histológicas é mais um critério a ser considerado no momento da decisão terapêutica. Acreditamos sermos éticos na cautela.

0368

Linfoma de Hodgkin no Estado do Ceará - dados epidemiológicos de meio século

MH Pitombeira¹, JM Martins¹, CMBE Costa¹, FD Rocha Filho¹, FVA Ferreira¹, A Quixadá¹, JH Sousa¹, FB Duarte¹, RS Mota¹, RARR Holanda¹, SMM Magalhães¹, M Lima Verde¹

¹Universidade Federal do Ceará

No período de 1957 a 2007 foram atendidos, no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará e no Instituto de Hematologia e Patologia do Ceará, 902 pacientes portadores de linfoma de Hodgkin. Destes, foi possível obter informações válidas de 868 pacientes. Para análise, os pacientes foram divididos em 4 grupos: de 1957 a 1979, de 1980 a 1989 e de 1990 a 1999 e de 2000 a 2007. No primeiro grupo constam 185 (21,3%) pacientes, no segundo 231 (26,6%), no terceiro 274 (31,6%) e no quarto grupo 178 (20,5%). Quanto ao sexo 559 (63,4%) são homens e 323 (36,6%) mulheres, com relação M:F - 1,73:1; a idade variou de 2 a 83 anos e a distribuição por faixa etária: menor de 15 anos 253 (29,0%), 215 (24,7%) entre 15 e 24 anos, 155 (17,8%) entre 25 e 34 anos, 99 (11,4%) entre 35 e 44 anos e 150 (17,2%) acima de 45anos; 266 (31,2%) brancos, 581 (68,3%) pardos e 4 (0,5%) negros. Do ponto de vista do estadiamento clínico (EC): EC I - 175 (20,7%) pacientes, EC II - 268 (31,7%), EC III - 217 (25,7%) e EC IV - 186 (22,0%). Na faixa etária <15, a maior prevalência ocorre no EC I que difere significativamente ($p < 0,001$) em relação à faixa >15 a. É observada diferença significativa ($p < 0,001$) entre as faixas etárias no ECIV sendo este mais prevalente na faixa > 15 anos. Houve predomínio dos pacientes com sintomas gerais B - 534 (63,1%), porém com tendência linear crescente ($p = 0,009$) dos pacientes A ao longo das décadas, principalmente nas mulheres. A distribuição dos pacientes quanto ao tipo histológico mostrou: CM - 308 (39,0%), EN - 283 (35,9%), PL - 93 (11,8%), DL - 95 (12,0%) e 10 (1,3%) não classificados. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) na frequência do tipo EN ao longo das décadas do estudo em ambos os sexos, bem como uma diminuição do subtipo DL ($p < 0,001$). Esta tendência é observada também por faixa etária. As curvas de sobrevida mostraram uma sobrevida global de 82,4% em 2 anos, 74,7% em 5 anos e 68,9% em 10 anos. Na faixa etária <15 a SG em 5 anos foi de 89% e >15 a de 70% ($p = 0,017$). Têm sido discutidas algumas hipóteses para explicar a mudança dos tipos histológicos: 1) Melhoraram as técnicas diagnósticas? 2) O nosso meio está saindo do conceito de subdesenvolvido? Por que não melhoraram os demais critérios epidemiológicos? São perguntas que merecem análise.

0369

O papel do transplante de medula óssea autólogo na doença de Hodgkin: A experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GF Perini¹, LMO Ponte¹, DM Brunetta¹, CHR Kruzich¹, LCV Santos¹, FLS Santos¹, RLG Cunha¹, MP Avanzi¹, LFF Dalmazzo¹, EM Rego¹, BP Simões¹, LCO Oliveira¹

¹Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Introdução: A doença de Hodgkin é hoje considerada uma das neoplasias com melhor prognóstico, alcançando cerca de até 88% de cura, a depender do estágio inicial e de fatores prognósticos estabelecidos. Ainda assim, parte dos pacientes são refratários aos esquemas quimioterápicos iniciais, ou apresentam recaída pós-tratamento. Para estes pacientes, o transplante autólogo de medula óssea constitui importante opção terapêutica. **Metodologia e Resultados:** De 1997 até 2007, foram realizados 37 transplantes para doença de Hodgkin no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dados de 34 pacientes foram levantados, sendo 14 mulheres e 20 homens. A média de idade foi de 26,5 anos, e o subtipo histológico foi esclerose nodular em 85% dos casos. A porcentagem de pacientes com estadiamento de Costwold, ao diagnóstico foi: II (28,5%), III (34,2%), IV (31,4%) e não conhecido em 5,9%, sendo que 68,5% dos pacientes apresentavam sintomas B. O esquema de resgate mais usado foi DHAP (65%), e o condicionamento utilizado foi BEAM exceto em 1 paciente, onde se optou por fludarabina e melfalan pela toxicidade pulmonar. A média de células CD34+ infundidas foi de 4,6x10⁶, e o dia de enxertia ocorreu, em média, no D+11. Em relação à indicação do TMO, 70,5% foram transplantados por recaída, e os demais, por doença refratária. Apenas 26,7% dos pacientes apresentaram remissão após quimioterapia de resgate. A sobrevida global em nossa casuística foi de 48% em cinco anos, sendo maior nos pacientes transplantados em remissão ($p = 0,03$), e menor nos pacientes com indicação por refratariedade ($p = 0,05$, n.s.). A taxa de recaída foi de 48%, sendo maior nos pacientes com indicação ao transplante por refratariedade ($p = 0,02$). Não se observou diferença nas taxas de sobrevida em relação ao estadiamento inicial. **Conclusão:** Em nossa casuística, o transplante autólogo de medula óssea constituiu importante terapia para pacientes com DH recaída ou refratária. Doença refratária à quimioterapia de primeira linha, ou doença em atividade ao transplante foram fatores relacionados ao insucesso do transplante, e consequentemente, menor sobrevida.

0370

Polimorfismos do gene TP53 no linfoma de Hodgkin (LH) - dados preliminares

D Viana¹, M Diniz², A Pacheco², F Ferreira², D Oliveira², F Rocha Filho²

¹Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)/Centro de Ciências da Saúde (CCS)/Universidade Federal do Ceará (UFC)

²Núcleo Tarcísio Pimenta de Pesquisa Genômica e Bioinformática (Nugen)/Faculdade de Veterinária (Favet)/Universidade Estadual do Ceará (Uece)

³Laboratório de Patologia Professor Livino Pinheiro/Hospital do Câncer do Ceará (HCC)/Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Introdução: O linfoma de Hodgkin (LH) é uma hemopatia linfóide comum na idade adulta jovem. O TP53 é um gene de 20kb situado no cromossomo 17 que codifica a proteína p53, com função na preservação da integridade do código genético, que, durante o ciclo celular faz verificação quanto à eventual ocorrência de uma mutação na seqüência do código genético. A maioria dos cânceres apresenta mutações pontuais na seqüência do TP53. Na literatura vigente, poucos trabalhos abordam a identificação dessas mutações no LH. **Objetivos:** Dessa forma, este trabalho se propõe a investigar quantitativa e qualitativamente os padrões de polimorfismos existente no LH. **Material e métodos:** A primeira etapa do nosso experimento constou da seleção de 20 casos de linfonodos de pacientes diagnosticados como LH entre os anos de 2000 e 2006, arquivados em blocos de parafina. Em seguida, o DNA foi extraído das amostras selecionadas para reação de PCR, realizada para isolar e amplificar, o fragmento de 137pb

correspondente ao éxon 8 do gene TP53, através de primers exclusivos desenhados para o experimento. Após a reação, os produtos de PCR foram purificados para reação de seqüenciamento de DNA. A última etapa aconteceu em laboratório de bioinformática, onde as seqüências de DNA obtidas foram analisadas qualitativa e quantitativamente. **Resultados e Conclusões:** Os processos de extração do DNA genômico, amplificação do éxon 8, purificação do produto de PCR e seqüenciamento foram realizados com sucesso em todas as amostras obtidas de material parafinizado. A análise dos resultados demonstrou ausência de polimorfismos no éxon 8 para o gene TP53 nesses 20 pacientes estudados.

0371

Relato de caso: carcinoma de tireóide concomitante à doença de Hodgkin sem irradiação prévia

FB Rocha¹, GMN Nantes¹, TO Givisiez², MC Soares¹, AF Oliveira³, LJ Vieira³

¹Faculdade de Medicina de Juiz de Fora (Unipac/JF)

²Universidade Estácio de Sá (Rio de Janeiro)

³Hospital Nove de Julho (Juiz de Fora)

O câncer da tireóide representa 1% de todos os cânceres diagnosticados. O carcinoma papilífero constitui a neoplasia mais prevalente, sendo responsável por cerca de 70% a 80% de todos os cânceres da tireóide. É mais comum nas mulheres e mais freqüente entre a 2ª e 4ª décadas de vida. A taxa de cura é de aproximadamente 80%. A doença de Hodgkin é uma neoplasia maligna distinta do sistema linfático que afeta primariamente os linfonodos. É responsável por 0,7% de todos os novos casos de cânceres nos EUA. O tratamento baseia-se em radioterapia e quimioterapia, com índice de cura em torno de 75% dos pacientes com tratamento inicial e nos casos de recidiva. Como encontrado nas várias literaturas consultadas, a maioria dos casos de associação entre câncer de tireóide e doença de Hodgkin é relacionada à prévia realização de radioterapia para tratamento da doença de Hodgkin. No entanto, no caso relatado em questão a paciente apresentou carcinoma de tireóide e doença de Hodgkin concomitantemente, independentes e sem irradiações prévias, sugerindo associação das doenças, na qual uma patologia não foi fator causal da outra, sendo as duas diagnosticadas e tratadas simultaneamente em estágio precoce.

0372

Terapia seqüencial de alta dose (HDS) seguida de transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (AHST) como terapia de salvamento para doença de Hodgkin (DH): Uma experiência brasileira

BK Duarte¹, I Valente¹, AC Vigorito¹, FJ Aranha¹, GB Oliveira¹, EC Miranda¹, I Lorand-Metze¹, KB Pagnano¹, CA de Souza¹

¹Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil

De maio de 1998 a novembro de 2006, 77 pacientes com DH que usaram o regime de ciclofosfamida em altas doses (HDCY), 7 ou 4 g/m², metotrexato, 8g/m² e etoposide 2g/m² seguidos de AHST foram analisados. A idade mediana foi de 25,8 (8,8-71,5) anos, 46 homens e 31 mulheres. Ao diagnóstico 50 (65%) tinham doença com estágio III ou IV, 10 (13%) tinham envolvimento da medula óssea, 29 (37,7%) grande massa e 55 (71,4%) sintomas B. Além disso, todos os pacientes tinham sido submetidos a uma média de 2 (1-4) linhas terapêuticas e seus status eram: 3 (3,9%) re-

missão completa (RC), 17 (22,1%) remissão parcial (RP), 57 (74%) com doença em progressão (PD) ou em recidiva de sensibilidade não especificada. Com relação à dose da CY 30 (39%) receberam 4 g/m² e 47 (61%) receberam 7 g/m². Após a HDCY 16 (20,8%) estavam em RC, 22 (28,6%) RP, 28 (36,3%) permaneceram em PD e 11 (14,3%) morreram, a maior parte em PD. Depois de um tempo mediano de seguimento de 3,97 (1,13-55,9) meses, 53 (68,8%) pacientes foram submetidos ao AHST, seus status atuais são 30 vivos; 23 mortos. A sobrevida global para pacientes transplantados foi de 55% em 8 anos. Atualmente nós temos 33/77 (43%) pacientes vivos, 19 RC, 3 RP, 11 PD. Sobrevida Global (SG) para todo o grupo foi 32%, Sobrevida Livre de Doença (SLD) 64%, Sobrevida Livre de Progressão (SLP) 40%. Comparando os status dos pacientes que estavam em PD ou recidiva antes da HDCY (57) com seus status após, houve uma melhora significativa (P=0,001), a SG foi de 40% para o grupo em RC-RP (24) versus 16% para o grupo em PD (33). No geral, a mortalidade foi de 44 (57%), sendo as causas: 19 de PD (43,2%), 8 (18,2%) relacionadas à HDCY, 2 (4,5%) relacionadas à HDMTX, 7 (16%) relacionadas à AHST, 6 (13,6%) infecções, 1 (2,3%) DECH crônico após um transplante com condicionamento de intensidade reduzida e 1 (2,2%) LMA. Além disso, 3 pacientes desenvolveram SMD e 1 desenvolveu LMA. Concluindo, embora tenha ocorrido um número significativo de mortes relacionadas à toxicidade, a seqüência é factível, principalmente para pacientes sensíveis, apresentando, além disso, uma resposta aceitável. Os autores gostariam de destacar a alta freqüência de pacientes com mal prognóstico e a ocorrência de SMD/LMA em 4 (5,2%) pacientes.

0373

Utilização do critério de classificação econômica Brasil (ANEP/IBGE) na avaliação prognóstica de pacientes portadores de linfoma de Hodgkin – dados preliminares

MH Pitombeira¹, S Siqueira¹, CMBE Costa¹, JH Souza¹, FB Duarte¹, FD Rocha Filho¹, RARR Holanda¹, A Quixadá¹, JACN Diógenes¹, LB Eloy da Costa¹, FF Chaves¹

¹Universidade Federal do Ceará

Introdução: O linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia de origem linfóide, caracterizada pela presença de células gigantes denominadas de Reed-Sternberg, que induzem o acúmulo de linfócitos reativos, histiócitos e granulócitos. É uma doença curável, entretanto, existe um grupo considerável de pacientes que são refratários ao tratamento ou apresentam recidivas precocemente, exigindo que as estratégias de tratamento sejam bem avaliadas. A identificação de fatores prognósticos e a adaptação dos protocolos devem, portanto, avaliar o risco individual para que sejam traçadas linhas de investigação de acordo com os critérios obtidos. O Critério de Classificação Econômica Brasil é um protocolo de estudo que tem a função de estimar o poder de compra das pessoas e famílias urbanas, abandonando a pretensão de classificar a população em termos de 'classes sociais'. A divisão de mercado definida é, exclusivamente, de classes econômicas. **Objetivos:** Determinar o perfil econômico dos pacientes com LH acompanhados no SH do HUWC/Hemoce no período de 2000 a 2006 e correlacionar com a resposta ao tratamento. **Resultados:** Foram atendidos 130 pacientes no período, assim distribuídos: 29(22,4%) em 2000, 20(15,4%) em 2001, 29(22,4%) em 2002, 15(11,5%) em 2003, 9(6,9%) em 2004, 14(10,7%) em 2005, 14(10,7%) em 2006; quanto ao sexo, 70(53,8%) eram homens e 60(46,2%) mulheres, com a relação M:F 1,16:1. A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de 5 a 72 anos, sendo uma curva gaussiana entre as idades de 17 e 30 anos, e seu pico em 23 anos. O resultado do inquérito CCEB aplicado em 49(37,7%)

**ANEXO E – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO RESUMO DE
DISSERTAÇÃO NO ANAIS CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA - HEMO 2007**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho intitulado “POLIMORFISMOS DO GENE TP53 NO LINFOMA DE HODGKIN (LH) - DADOS PRELIMINARES” de autoria de D Viana, M Diniz, A Pacheco, F Ferreira, D Oliveira, F Rocha Filho, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2007, realizado no período de 7 a 10 de novembro, na categoria discussão de pôster com visita guiada.



São Paulo, 10 de novembro de 2007


Sara Teresinha Oialia Saad
Presidente



ANEXO F – TP53 - SEQUÊNCIA GENÉTICA

LOCUS NM_000546 2629 bp mRNA linear PRI 24-DEC-2006

DEFINITION Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), mRNA.

ACCESSION NM_000546

VERSION NM_000546.2 GI:8400737

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

ORIGIN

```

1 acttgtcatg gcgactgtcc agctttgtgc caggagcctc gcaggggttg atgggattgg
61 ggttttcccc tccatgtgc tcaagactgg cgctaaaagt tttgagcttc tcaaaagtct
121 agagccaccg tccagggagc aggtagctgc tgggctccgg ggacactttg cgttcgggct
181 gggagcgtgc ttccacgac ggtgacacgc ttcctggat tggcagccag actgcctcc
241 gggcactgc catggaggag ccgcagtcag atcctagcgt cgagccccct ctgagtcagg
301 aacatttc agacctatgg aaactactc ctgaaaacaa cgttctgtcc ccctgccgt
361 cccaagcaat ggatgattg atgctgtccc cggacgatat tgaacaatgg ttcactgaag
421 accaggctc agatgaagct cccagaatgc cagaggctgc tccccgcgtg gccctgcac
481 cagcagctcc tacaccggcg gccctgcac cagccccctc ctggcccctg tcattctctg
541 tccctccca gaaaacctac cagggcagct acggttccg tctgggctc ttgcattctg
601 ggacagccaa gtctgtgact tgcacgtact ccctgccct caacaagatg tttgccaac
661 tggccaagac ctgccctgtg cagctgtggg ttgattccac acccccgcc gccaccgcg
721 tccgcgcat ggccatctac aagcagtcac agcacatgac ggaggtttg aggcgctgcc
781 cccaccatga gcgctgctca gatagcgtg gtctggcccc tcctcagcat cttatccgag
841 tgaaggaaa tttgcgtgtg gactatttg atgacagaaa cacttttcga catagtgtgg
901 tggtgcccta tgagccgct gaggttggt ctgactgtac caccatccac tacaactaca
961 tgtgtaacag ttctgcatg ggcggcatga accggaggcc catcctcacc atcatcacac
1021 tgaagactc cagtggtaat ctactgggac ggaacagctt tgaggctcgt gttgtgcct
1081 gtcctgggag agaccggcg acagaggaag agaatctcc caagaaagg gagcctcacc
1141 acgagctgcc cccagggagc actaagcgag cactgcccaa caacaccagc tcctctcccc
1201 agccaaagaa gaaaccactg gatggagaat attcaccct tcagatccgt gggcgtgagc
1261 gcttcgagat gttccgagag ctgaatgagg ccttggaaact caaggatgcc caggctggga
1321 aggagccagg ggggagcagg gctcactcca gccacctgaa gtccaaaaag ggtcagtcta
1381 cctcccgcca taaaaaactc atgtcaaga cagaagggcc tgactcagac tgacattctc
1441 cacttctgt tcccactga cagcctcca ccccatctc tcctcccct gccatttgg
1501 gtttgggtc tttgaaccct tgcttgaat aggtgtcgt cagaagcacc caggactcc
1561 atttgcttg tcccgggct cactgaaca agttggcctg cactggtgt ttgtgtggg
1621 gaggaggatg gggagtagga cataccagct tagatttaa ggttttact gtgagggatg
1681 tttgggagat gtaagaaatg ttctgcagt taagggttag ttacaatca gccacattct

```

1741 aggtaggtag gggcccactt caccgtacta accaggggaag ctgtccctca tgttgaattt
1801 tctctaactt caaggcccat atctgtgaaa tgctggcatt tgcacctacc tcacagagtg
1861 catttgtagg gttaatgaaa taatgtacat ctggcctga aaccacctt tattacatgg
1921 ggtctaaaac ttgaccccct tgagggtgcc tgttccctct ccctciccct gttggctggt
1981 gggttggtag ttctacagt tgggcagctg gttaggtaga gggagttgct aagtcttgc
2041 ggcccagcca aaccctgtct gacaacctct tggtcgacct tagtacctaa aaggaaatct
2101 caccccatcc cacaccctgg aggatttcat ctctgtata tgatgatctg gatccaccaa
2161 gactgtttt atgctcaggg tcaatttct tttctttt tttttttt tttcttttc
2221 tttgagactg ggtctcgctt tgttcccag gctggagtg agtggcgtga tcttgctta
2281 ctgcagcctt tgcccccgc gctcgagcag tctgcctca gctccggag tagctgggac
2341 cacaggttca tgccaccatg gccagccaac tttgcatgt ttttagaga tggggtctca
2401 cagtgttgc caggctggtc taaaactcct gggctcaggc gatccacctg tctcagcctc
2461 ccagagtgc gggattacaa ttgtgagcca ccacgtggag ctggaagggt caacatctt
2521 tacattctgc aagcacatct gcatttcaac cccaccctc ccctcctct cctttttat
2581 atccatttt tatatcgatc tctatttta caataaaact ttgctgcca

//

ANEXO G – SITE DO INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC)

Firefox File Edit View History Bookmarks Tools Window Help IARC TP53 DATABASE - Welcome

http://www-p53.iarc.fr/ iarc tp53

International Agency for Research on Cancer
Centre International de Recherche sur le Cancer

IARC TP53 Mutation Database

http://www-p53.iarc.fr IARC, 150 Cours Albert-Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France. Tel: +33 (0)4 72738485 - Fax: +33 (0)4 72738575

Home

- About the Database
- Database Statistics
- Data Downloads, R13
- DATABASE SEARCH
- USER'S HELP
- TP53 sequences
- Submitting data
- Sequencing TP53
- Resources & Links
- Slide-show
- References
- Disclaimer
- FAQ
- Contact Us

The IARC TP53 Mutation Database compiles all TP53 gene variations identified in human populations and tumor samples. Data are compiled from the peer-reviewed literature and from generalist databases.

The following datasets are available:

- TP53 **somatic mutations** in sporadic cancers
- TP53 **germline mutation** in familial cancers
- Common TP53 **polymorphisms** identified in human populations
- **Functional and structural properties** of P53 mutant proteins
- TP53 gene status in human **cell-lines**
- **Mouse-models** with engineered TP53

The database includes various **annotations** on the predicted or experimentally assessed **functional impact** of mutations, **clinicopathologic** characteristics of tumors and **demographic and life-style information** on patients.

The database is meant to be a source of information on TP53 mutations for a broad range of scientists and clinicians who work in different research areas:

- **Basic research**, to study the structural and functional aspects of the p53 protein
- **Molecular pathology of cancer**, to understand the clinical significance of mutations identified in cancer patients
- **Molecular epidemiology of cancer**, to analyze the links between specific exposures and mutation patterns and to make inferences about possible causes of cancer
- **Molecular genetics**, to analyze genotype/phenotype relationships

Cancer Gene Therapy

Cancer Gene Therapy 2006, 1-12
© 2006 Nature Publishing Group. All rights reserved. 0924-6460/06 \$30.00
www.nature.com/cgt

REVIEW

Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective
M Olivier¹, A Petitjean¹, V Maréchal¹, A Pétre¹, M Mounawar¹, A Plymothi¹,
CC de Fromental² and P Hainaut¹

¹Group of Molecular Carcinogenesis and Biomarkers, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization, Lyon, France and ²INSERM UMR509, Unité d'Oncogénèse et de Progression Tumorale, Université Lyon-1, Centre Léon Bérard, Lyon, France

Meeting Announcement

4th International Workshop on Mutant p53
In vivo effects of mutant p53: experimental data, animal models, clinical consequences
27-29 March 2009, Acre, Israel

INTERNATIONAL
P53 MARATHON
2009

Done

ANEXO H – SOLUÇÕES UTILIZADAS NESTE EXPERIMENTO

1. Tris-HCl 1M, pH 7.5 - 100ml

- 12.1g Tris base
- Completar a 100ml com água
- ajustar a pH 7.5 com HCl
- autoclavar

2. EDTA 0.5M, pH 8.0 - 100ml

- 16.81g EDTA sal dissódico
- completar a 100ml com água
- ajustar o pH com NaOH
- autoclavar

3. 20% SDS - 100ml

- 20g SDS
- dissolver a 100ml com água

4. Tris-HCl 10mM, pH 7.5 - 20ml

- 200 ul de Tris-HCl 1M, pH 7.5
- completar a 20ml com água

5. Tampão de Extração (Tris-HCl 100mM, 1% SDS) - 20ml

- 17ml de água
- 2ml Tris-HCl 1M, pH 7.5
- 1ml SDS 20%

6. TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM) - 10ml

- 100ul de Tris-HCl 1M, pH 7.5
- 20ul de EDTA 0.5M, pH 8.0
- completar a 10ml com água