



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

**Dissertação de Mestrado**

---

**POLIMORFISMO DO GENE TP53 EM SARCOMAS DE PARTES**  
**MOLES NO ADULTO**

---

**PRISCILLA SILVA ROSA DE ALMEIDA**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi**

**Goiânia-GO**

**2008**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**MESTRADO EM GENÉTICA**

---

**POLIMORFISMO DO GENE TP53 EM SARCOMAS DE PARTES  
MOLES NO ADULTO**

---

**PRISCILLA SILVA ROSA DE ALMEIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi**

**Goiânia-GO**

**2008**

A447p Almeida, Priscilla Silva Rosa de.  
Polimorfismo do gene TP53 em sarcomas de partes moles no  
adulto / Priscilla Silva Rosa de Almeida. – 2008.

89 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás,  
Programa de Pós-Graduação em Genética, 2008.  
“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi”.

1. Sarcoma – partes moles – adulto. 2. Polimorfismo p53Arg/Pro.  
3. Gene TP53. 4. Genética. I. Título.

CDU: 575.17:616-006.04-053.8(043.3)

**BANCA EXAMINADORA DA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno(a): Priscilla Silva Rosa de Almeida**

---

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi**

---

**Membros Externos:**

Titular: Professora Dra. Sílvia Helena Rabelo Santos

Suplente: Professora Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves

**Membros Internos:**

Titular: Professora Dra. Mariana Telles

Suplente: Professor Dr. Flávio Monteiro Ayres

**Curso de Mestrado em Genética**

**Universidade Católica de Goiás**

**Data: 21/07/2008**

***Dedico essa vitória aos meus avós e à minha mãe, que sempre me incentivaram e se orgulharam de todas as minhas conquistas.***

## Agradecimentos

---

*Primeiramente, agradeço a Deus por todas as minhas conquistas, por me dar forças nos momentos difíceis e entusiasmo nos momentos de alegria. Em Jesus recebi toda riqueza, tanto do conhecimento quanto da palavra. É Ele quem me fortalece até o fim...*

*Agradeço a todas as pessoas da minha família, em especial à minha mãe, Vera Lúcia Rosa, uma mulher batalhadora, que me educou com amor incondicional. Ela é a responsável direta por tudo o que sou, pelo meu caráter, pela minha formação acadêmica e por sempre nutrir e apoiar os meus sonhos. Obrigada, mamãe!*

*Aos meus avós, Edson Rosa e Eleusa Silva Rosa, que também me criaram e me deram toda formação baseada em bons princípios. Um agradecimento especial ao meu avô, Edson, homem de fé, solidário com os menos favorecidos, simples, prestativo, fiel, alegre. Um exemplo de vida que levarei para sempre comigo. Sempre me apoiou em meus estudos e por isso deixo aqui o meu agradecimento pelo incentivo, carinho e paciência. Agradeço a Deus por ter a oportunidade de conviver com essa pessoa tão maravilhosa que foi o meu avô. Apesar de não conseguir esperar o término do meu mestrado, tenho certeza de que ele está feliz em ver mais uma etapa de minha vida vencida, aonde quer que esteja...*

*Às minhas madrinhas, Cristiane Sanchez Rodrigues Alves e Valéria Rosa Conceição Grespan, como também às tias, tios, enfim a toda minha família.*

*À minha orientadora, Dra. Vera Aparecida Saddi, pela oportunidade de me orientar nos Programas de Pós-graduação *latu sensu* e *strictu sensu*. Devo à profa. Vera a orientação, não apenas sobre os aspectos da vida acadêmica, mas também a valorização da vida, não deixando que as dificuldades atrapalhassem a minha caminhada.*

*A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás pela amizade e companheirismo, principalmente ao amigo Dr. Wilmar José Manoel. Foi ele o responsável pela realização deste projeto e, sem a sua ajuda, talvez eu não conseguisse chegar até o final dessa conquista. A ele o meu mais sincero “Muito obrigada”!*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos ensinamentos compartilhados com toda dedicação. Em especial aos professores Dr. Flávio Monteiro Ayres, Dra. Daniela Melo e Silva e Dra. Mariana Pires de Campos Telles por suas opiniões e paciência preciosas a mim dedicadas.*

*A toda equipe do Núcleo de Pesquisas Replicon pelo auxílio em todos os momentos. Em especial à professora Ângela Adamski da Silva Reis, pela amizade sincera e o valioso auxílio; às estagiárias Paula Roberta, Thatiane Ribeiro e Pollyane Rosa Silva, pela ajuda incondicional que nunca me falharam, ao responsável técnico Eduardo Rocha Pedrosa e ao amigo Raimundo Lima da Silva Júnior, sempre prontos para me auxiliarem no que fosse necessário.*

*À equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, LaGene, que sempre esteve presente, especialmente a Sandra Maria Torres, por todas as palavras de incentivo e conforto que nunca me deixaram desanimar.*

*Gostaria de agradecer a todos os médicos e funcionários do Hospital Araújo Jorge, especialmente às equipes dos Setores de Anatomia Patológica, de Transplante de Medula Óssea e do Setor de Arquivo, por contribuírem para a conclusão da minha jornada.*

*A todos os meus amigos, pelo apoio, paciência e dedicação em todos os momentos vividos, não apenas nessa fase de mestrado, como também em toda e qualquer situação. Em especial, quero agradecer (em ordem alfabética) às pessoas que me ofereceram tantos momentos de alegria e conforto, facilitando a minha jornada: Alessandra Ribeiro Cardoso, Ana Thaís Pereira, Bráulio Cançado Flores, Camila de Souza Hamú, Cejana de Souza Hamú, Fernanda da*

*Veiga Jardim Gurgel e Silva, Fernanda Ferreira Amuy, Fernanda Ribeiro Cardoso, Helenisa Helena de Oliveira Neto, Jaqueline Barbosa Queiroz, Taciana Cecília Pereira, Thaís Guimarães de Castro, Yara Netto Muniz.*



# Sumário

---

	<b>Página</b>
<b>Figuras, Tabelas e Anexos</b>	viii
<b>Siglas, Símbolos e Abreviaturas</b>	xi
<b>Resumo</b>	xv
<b>Abstract</b>	xvii
<b>Introdução</b>	1
<b>Justificativas</b>	42
<b>Objetivos</b>	43
<b>Metodologia</b>	44
<b>Resultados</b>	51
<b>Discussão</b>	62
<b>Conclusões</b>	70
<b>Referências Bibliográficas</b>	71
<b>Anexos</b>	85
<b>Apêndice</b>	89

## Figuras, Tabelas e Anexos

		Página
Figura 1	Sistema de descrição do estadio, grau e metástases linfonodais e à distância (TNM) – segundo o <i>Committee on Cancer for Soft-tissue Sarcoma e a International Union Against Cancer</i> .	9
Figura 2	Desenho esquemático dos 393 aminoácidos da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53.	18
Figura 3	Modelo mostrando ativação da proteína p53 através da fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal. Após fosforilação, a proteína se liga de maneira inespecífica ao DNA. A acetilação na extremidade C-terminal libera o domínio de ligação ao DNA, isso faz com que a p53 se ligue especificamente a determinados sítios do DNA, podendo assim agir como um fator transcricional.	22
Figura 4	Mutações somáticas de TP53 mais freqüentes em humanos – dados de mutações em TP53 do IARC.	28
Figura 5	Modelo esquemático do gene <i>p53</i> , indicando os domínios funcionais da proteína. A localização do polimorfismo é indicada no códon 72, mostrando a posição dos aminoácidos prolina (Pro) e arginina (Arg).	32
Figura 6	Resultados da eletroforese dos produtos de PCR de p53Arg (A) e p53Pro (B) em PAGE 8% corado por nitrato de prata	49
Figura 7	Sobrevida global em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles.	56
Figura 8	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao grau histopatológico.	57
Figura 9	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao estadio do tumor.	58

Figura 10	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao tamanho do tumor.	59
Figura 11	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação à presença de metástase linfonodal.	60
Figura 12	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação à presença de metástase à distância.	60
Figura 13	Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação aos diferentes genótipos analisados (Arg/Arg; Arg/Pro; Pro/Pro).	61

Tabela I	Fatores prognósticos relevantes para a sobrevida de pacientes com sarcomas de partes moles não incluídos no sistema de estadiamento da AJCC.	9
Tabela II	Translocações cromossômicas frequentemente descritas para os Sarcomas de Partes Moles (SPM).	11
Tabela III	Protocolo de ciclagem para amplificação dos fragmentos de TP53.	46
Tabela IV	Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de p53Arg.	46
Tabela V	Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de p53Pro.	47
Tabela VI	Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de GAPDH.	47
Tabela VII	Protocolo de ciclagem para amplificação do fragmento de GAPDH.	48
Tabela VIII	Seqüência dos primers e tamanho dos amplicons obtidos.	48
Tabela IX	Distribuição das frequências absolutas e relativas dos casos de sarcomas de partes moles, em relação ao gênero, faixa etária e idade agrupada.	51
Tabela X	Distribuição das frequências absolutas e relativas dos casos de sarcomas de partes moles em relação à localização e ao tipo histológico do tumor.	52

Tabela XI	Distribuição das frequências absolutas e relativas dos casos de sarcoma de partes moles em relação aos aspectos clínico-patológicos.	53
Tabela XII	Distribuição das frequências alélicas entre as populações caso e controle.	54
Tabela XIII	Distribuição das frequências genótípicas entre as populações caso e controle	54
Tabela XIV	Distribuição das frequências absolutas e relativas dos pacientes com sarcomas de partes moles por genótipo em relação aos diferentes aspectos clínico-patológicos.	55
Tabela XV	Possíveis associações entre as características clínico-patológicas e os genótipos polimórficos de TP53.	56
Anexo 1	Classificação de Sarcomas de Partes Moles Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).	85
Anexo 2	Ficha de coleta de dados clinicopatológicos de sarcoma de partes moles (SPM) – Hospital Araújo Jorge – ACCG	86
Anexo 3	Autorização do autor Silva, AMTC para a utilização das ilustrações neste documento Araújo Jorge – ACCG	87
Anexo 4	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG (CEPACCG)	88
Apêndice 1	Distribuição dos pacientes com SPMs por genótipo em relação à faixa etária, localização do tumor e tipo histológico.	89

## Siglas, Símbolos e Abreviaturas

<b>A</b>	Base nitrogenada adenina
<b>ACCG</b>	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>ARF</b>	<i>Alternative Reading Frame</i>
<b>ASPP</b>	<i>Apoptosis-stimulating Protein of p53</i>
<b>C</b>	Base nitrogenada citosina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CEPACCG</b>	Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
<b>CDKI</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors</i>
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COL1A1</b>	<i>Collagen Type 1 Alfa 1 Gene</i>
<b>c-Myc</b>	<i>Myelocytomatosis Oncogene</i>
<b>C-terminal</b>	Extremidade Carboxi-terminal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleosídeos trifosfato
<b>EBV</b>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<b>ELISA</b>	Enzimainumensaio
<b>ES</b>	Ewing's sarcoma
<b><i>et al.</i></b>	Abreviatura de <i>et alii</i> que significa <i>e outros</i>
<b>FHM</b>	Histiocitoma Fibroso Maligno
<b>G</b>	Base nitrogenada guanina
<b>G</b>	Gramma
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-P-desidrogenase
<b>GL</b>	Grau de liberdade
<b>HAT</b>	<i>Histone-acetil-transferases</i>
<b>HAI</b>	Hospital Araújo Jorge

<b>HDM2</b>	<i>Humam double minute 2 gene</i>
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HPV</b>	<i>Human Papilomavirus</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IARC</b>	<i>International Agency Research on Cancer</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>GIST</b>	<i>Gastrointestinal Stromal Tumor</i>
<b>ES</b>	Sarcoma de Ewing
<b>Kb</b>	Kilo base (1kb = 1000pb)
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KIT</b>	<i>Tyrosine Kinase Receptor Gene</i>
<b>L</b>	Marcador de tamanho ou escada alélica ( <i>Ladder</i> )
<b>LaGene</b>	Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular do Estado de Goiás
<b>Max</b>	<i>Proteína Max</i>
<b>MDM2</b>	<i>Murine double minute 2 gene</i>
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NES</b>	<i>Nuclear Export Signal</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear Localisation Signals</i>
<b>nM</b>	Nanomol
<b>N-terminal</b>	Extremidade Amino-terminal
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p53</b>	Proteína p53
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>PAH</b>	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGFB</b>	<i>Platelet Derived Growth Factor <math>\beta</math></i>

<b>PETCT</b>	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
<b>PNET</b>	<i>Primitive Neuroectodermic Tumor</i>
<b>p53Arg</b>	Proteína p53 com aminoácido arginina no códon 72
<b>p55Pro</b>	Proteína p53 com aminoácido prolina no códon 72
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RB1</b>	<i>Retinoblastoma 1 Gene</i>
<b>RCBPGO</b>	Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia
<b>RNM</b>	Ressonância Nuclear Magnética
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SBC</b>	Sociedade Brasileira de Cancerologia
<b>seg</b>	Segundos
<b>SLF</b>	Síndrome de Li-Fraumeni
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorfism</i>
<b>SOE</b>	Sem Outras Especificações
<b>SPM</b>	Sarcomas de Partes Moles
<b>SV-40</b>	<i>Simian vírus 40</i>
<b>T</b>	Base nitrogenada timina
<b>TBE</b>	Tris-Borato de EDTA
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TNM</b>	Sistema de classificação por estadiamento: <b>T</b> umor, <b>N</b> ódulos linfáticos e <b>M</b> etástases à distância
<b>TP53</b>	Gene supressor de tumor P53
<b>TP63</b>	Gene supressor de tumor P63
<b>TP73</b>	Gene supressor de tumor P73
<b>UICC</b>	<i>International Union Against Câncer</i>
$\chi^2$	Qui-quadrado
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
<b>V</b>	Volts
<b>%</b>	Porcentagem

$>$	Maior
$<$	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
$\infty$	Infinito



## Resumo

---

Os sarcomas de partes moles (SPM) são tumores de origem mesodérmica, representando cerca de 1% do total das neoplasias em adultos. O polimorfismo do códon 72 do gene TP53 é extensivamente estudado por causar impacto na seqüência codificadora do gene, além de estar associado ao maior risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Este polimorfismo resulta na expressão de arginina (p53Arg) e/ou prolina (p53Pro) na posição 72 da proteína p53. As formas polimórficas de TP53, em relação ao polimorfismo do códon 72, apresentam propriedades bioquímicas e biológicas diferentes, e por esta razão, vários estudos foram conduzidos na tentativa de associar tais formas polimórficas como fator de risco e prognóstico para inúmeras neoplasias. Entretanto, a literatura não relata nenhum estudo que associe este polimorfismo aos sarcomas de partes moles do adulto. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o polimorfismo p53Arg/Pro como potencial fator de risco e/ou prognóstico em 100 casos de SPMs em adultos atendidos no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. O grupo controle incluiu 85 indivíduos saudáveis selecionados aleatoriamente da população da cidade de Goiânia. As amostras dos casos constituíram de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina e, para a extração de DNA, os tecidos foram previamente desparafinizados. A extração de DNA do grupo controle foi realizada a partir de sangue periférico. Para a genotipagem do polimorfismo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando conjuntos de *primers* específicos para cada variante polimórfica. Após a análise dos dados obtidos, verificou-se que as freqüências alélicas e genotípicas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os casos e os controles. Nosso estudo corrobora com as evidências de que o alelo p53Arg é o mais comum em populações latino-americanas. Entretanto, os dados sobre as freqüências gênicas e genotípicas da literatura mundial são conflitantes, fato que pode ser atribuído às diferenças étnicas descritas entre as populações estudadas. Nenhuma relação estatisticamente significativa foi encontrada entre o polimorfismo do códon 72 de

TP53 e as características clínico-patológicas estudadas, como sexo, idade agrupada, localização, histologia, tamanho e grau histológico tumoral, estadiamento e presença de metástases. A sobrevida global em cinco anos para o grupo estudado foi de 48,1%. As análises de sobrevida em relação ao polimorfismo de TP53 revelaram que os pacientes cujos tumores apresentaram o genótipo p53Pro/Pro tiveram sobrevida inferior (30%), quando comparados ao grupo de pacientes com os genótipos p53Arg/Arg (45%) e p53Arg/Pro (54,9%). Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,444$ ). Sabe-se que a isoforma p53Arg apresenta função apoptótica mais marcante. Esta característica pode conferir ao paciente um melhor prognóstico da doença. No presente trabalho, contudo, não pudemos verificar que esta variante esteve associada a um prognóstico mais favorável em pacientes adultos com SPMs.

**Palavras-chave:** Sarcomas de partes moles; polimorfismo p53Arg/Pro; fatores prognósticos; polimorfismos de nucleotídeos únicos.

## Abstract

---

Soft tissue sarcomas (STS) are tumors with mesodermic origin, comprising about 1% of all adult neoplasms. Because of its effect on the p53 protein coding sequence, and its association with an increased risk for some cancer types, TP53 codon 72 polymorphism has been investigated in several studies. TP53 codon 72 codes for either Arginine (p53Arg), or Proline (p53Pro) at the p53 protein primary sequence. It was demonstrated that such amino acid change affects p53 biochemical and biological properties, and several studies have been developed in order to associate TP53 codon 72 polymorphisms as a risk, and as a prognostic factor for different cancer types. Any published study on the TP53 codon 72 polymorphism in adult soft tissue sarcomas was found in the literature. The present study aimed to investigate TP53Arg/Pro polymorphism as a potential prognostic factor in 100 adult subjects with STS. Patients were assisted at the Hospital Araújo Jorge of the Associação de Combate ao Câncer em Goiás in Goiânia, Brazil. DNA from patients was obtained from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue samples stored at the Pathology Department of the institution. Control group included 85 healthy donors randomly selected from Goiânia's population and, for this group, DNA extraction was performed from peripheral blood. Polymorphism genotyping was achieved by using polymerase chain reaction (PCR) with specific primer sets for each polymorphic variant. Statistical analysis was performed by using *GenePop*<sup>®</sup> *web version 3.4* software. In this study, TP53 allelic and genotypic frequencies were investigated for subjects and controls, however, any statistical difference between the two groups was found. Our study supports the evidence that p53Arg is the most frequent allele in Latin American population, but worldwide genic and genetic frequency data are conflicting because of ethnical differences among the studied populations. According to the results, no significant association was demonstrated between TP53 codon 72 polymorphism and clinicopathological characteristics such as gender, age, tumor localization, histology, tumor size, stage, grade, node status,

and distant metastasis. The five-year overall survival for the study group was 48.1%. Tumors with p53Pro/Pro genotype demonstrated a reduced survival rate (30%) when compared to p53Arg/Arg (45%), and p53Arg/Pro group (54.9%), but this association was not statistically significant ( $p = 0.444$ ). In the present study, the p53Arg variant was not statistically associated with a more favorable prognosis in adult STS patients.

**Keywords:** soft tissue sarcomas; p53 Arg/Pro polymorphism; prognostic factors; single nucleotide polymorphism.

# INTRODUÇÃO

---

Denomina-se mutação, qualquer mudança súbita e permanente no material genético ou genótipo de um organismo não explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Esse termo se refere tanto à modificação do material genético quanto ao processo pelo qual a modificação ocorre. As modificações genotípicas incluem mudanças no número cromossômico (euploidia e aneuploidia), mudanças grosseiras na estrutura dos cromossomos (aberrações cromossômicas) e mudanças nos genes individuais (mutação gênica). Atualmente, no entanto, o termo mutação é utilizado em um sentido mais restrito, referindo-se apenas às alterações detectadas em nível de genes individuais. As mutações são a fonte de toda a variação genética, a matéria-prima da evolução, podendo ser espontâneas ou induzidas por agentes denominados mutagênicos. As mutações em nível molecular podem ser classificadas, quanto ao efeito de troca, em: silenciosas, aquelas que envolvem a troca de bases do DNA, mas não causam a troca do aminoácido presente na proteína correspondente; mutações neutras, que levam à troca de bases do DNA e do aminoácido, mas a substituição não afeta a atividade da proteína; e mutações diretas, que são aquelas que inativam o gene (Passaglia, 2003). Quando a modificação na seqüência de DNA possui uma freqüência superior a 1% em uma dada população, essa alteração é denominada polimorfismo. Os polimorfismos são mais freqüentes e menos comprometedores para as funções celulares do que as mutações. O polimorfismo mais estudado nos últimos tempos é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP = *single nucleotide polymorphism*), associado a alterações de apenas uma base nitrogenada em uma seqüência nucleotídica, podendo criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e resultando em dois fenótipos distintos (Lima J *et al.*, 2006; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Essas alterações podem ocorrer nas seqüências codificadoras dos genes, gerando proteínas com atividades irregulares. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças, como o câncer, uma vez que alterações nas funções protéicas são capazes de desregular a homeostase celular (Lima *et al.*, 2006). Nos últimos anos, os

polimorfismos têm sido intensamente estudados, pois podem contribuir para o aparecimento de doenças. Assim, é possível prever a predisposição genética de um indivíduo para determinada enfermidade, bem como seu prognóstico ou sua resposta frente a tratamentos específicos (Ørsted *et al.*, 2007). A determinação das possíveis correlações entre as diferentes alterações de TP53 e o prognóstico dos tumores é muito importante para oferecer aos indivíduos com maior predisposição, a chance de monitoramento mais freqüente da doença, com conseqüente detecção precoce, o que aumentaria significativamente as chances de cura com as intervenções cirúrgicas mais precoces (Borden *et al.*, 2003). Adicionalmente, os indivíduos com variantes polimórficas relacionadas a comportamentos mais agressivos poderiam ser submetidos a terapias adjuvantes mais severas, aumentando suas chances de controle da neoplasia (Muret *et al.*, 2008).

## **1 – SARCOMAS DE PARTES MOLES (SPM) – DEFINIÇÃO:**

Os sarcomas de partes moles (SPM) constituem um grupo heterogêneo de tumores com diversos tipos histológicos e que compartilham uma origem mesodérmica comum (Dirix *et al.*, 1999; Graadt van Roggen *et al.*, 1999; Borden *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2005; Kotilingan *et al.*, 2006; Skubitz & D'Adamo, 2007; Manoel *et al.*, 2008) com pequeno componente ectodérmico, incluindo mais de 100 entidades diagnósticas distintas (Clark *et al.*, 2005; Skubitz & D'Adamo, 2007). As partes moles incluem os tecidos localizados entre a epiderme e as vísceras, com exceção dos ossos. Esses tecidos constituem cerca de 50% do peso corporal do adulto e são representados por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, músculos lisos, músculos estriados, tecido gorduroso, aponeuroses, tendões, dentre outros (SBC, 2007).

A heterogeneidade dos SPM pode ser identificada por microscopia e por análises de expressão gênica. Essa variedade pode existir mesmo dentro de uma única categoria histológica (Skubitz & D'Adamo, 2007). Embora os SPM possam surgir de qualquer região do corpo, a maioria ocorre nos membros ou em regiões intrabdominais. Os tumores de partes moles benignos, especialmente os lipomas, são 100 vezes mais comuns do que os sarcomas (Clark *et al.*, 2005).

## **2 – EPIDEMIOLOGIA**

Os sarcomas de partes moles são responsáveis por cerca de 1% de todos os tumores sólidos malignos em adultos (Graadt van Roggen *et al.*, 1999; Latorre & Franco, 1999; Clark *et al.*, 2005; Manoel *et al.*, 2008). Apesar de apresentarem um pico de incidência na infância, os SPM são mais comuns no adulto, especialmente naqueles com mais de 50 anos (Manoel *et al.*, 2008). Não existe uma relação uniforme da distribuição dos SPM entre os sexos. Os SPM podem se originar em qualquer área do corpo, sendo mais comuns em membros inferiores e cintura pélvica (Latorre & Franco, 1999).

Aproximadamente 9.420 novos casos são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos e em torno de 1.500 no Reino Unido (Grobmyer *et al.*,

2004; Clark *et al.*, 2005; Jemal *et al.*, 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os sarcomas apresentam uma incidência de 0,7 a 1,0% dentre todas as neoplasias (INCA, 2005). O registro de câncer de base populacional de Goiânia (RCBPGO) registrou, de 1996 a 2000, uma incidência no sexo masculino de 1,78 por 100.000 habitantes, equivalendo a 0.72% do total das neoplasias do sexo masculino. No sexo feminino, 2,21 por 100.000 habitantes, correspondendo a 0.82% das neoplasias das mulheres (RCBPGO, 2006). A frequência relativa dos SPM e a resposta ao tratamento podem variar de acordo com a idade. A incidência global dos SPM está aumentando, talvez como resultado do aumento do sarcoma de Kaposi, associado frequentemente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Latorre & Franco, 1999; Grobmyer *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Jemal *et al.*, 2005).

A sobrevida global dos pacientes com SPM é de aproximadamente 50% após 5 anos do diagnóstico e os tumores de extremidades possuem prognóstico mais favorável do que aqueles de outras localizações (Ferreira & Lopes, 1999; Kotilingam *et al.*, 2006; Skubitz & D'Adamo, 2007; Das *et al.*, 2007). As taxas de sobrevida para os estádios I, II, III e IV são de aproximadamente 85 a 90%, 70%, 50% e 10 a 20%, respectivamente, podendo ser modificadas pelo tipo histológico e localização do tumor, além de outros fatores (Clark *et al.*, 2005).

### **3 – ETIOLOGIA**

A etiologia dos SPM ainda permanece desconhecida, embora alguns fatores distintos estejam implicados em seu desenvolvimento, como os agentes infecciosos, exposição a carcinógenos químicos e as radiações ionizantes (Dirix *et al.*, 1999; Latorre & Franco, 1999). Contudo, não apenas os fatores exógenos devem ser considerados como fatores de risco. O pico de incidência de SPM em crianças também sugere a possibilidade de existirem fatores genéticos associados (Latorre & Franco, 1999). A maioria dos SPM é esporádica e poucos possuem uma causa identificável. Existe uma associação entre certas infecções virais (como o vírus Epstein-Barr em crianças portadoras do HIV) e o leiomiossarcoma (Clark *et al.*, 2005; Lima M *et al.*, 2006). Embora o



vírus do sarcoma de Rous que causa sarcomas em aves seja o primeiro vírus tumoral descoberto capaz de causar tumores sólidos, o único vírus conhecido associado a sarcomas em humanos é o vírus herpes humano 8, que desempenha um papel no desenvolvimento do sarcoma de Kaposi (Skubitz & D'Adamo, 2007). Os SPM podem se desenvolver de 3 a 15 anos após irradiação terapêutica para linfoma, câncer cervical, tumor testicular ou câncer de mama. Entretanto, os benefícios da radioterapia nessas circunstâncias se sobrepõem ao risco mínimo para o desenvolvimento de sarcoma. O linfedema crônico associado ao angiossarcoma (síndrome de Stewart-Treves) geralmente ocorre como uma complicação rara do tratamento do câncer de mama (Clark *et al.*, 2005).

Os fatores genéticos desempenham um papel importante na iniciação e progressão dos SPM. Acredita-se que as mutações genéticas nas células mesenquimais pluripotentes originem os clones malignos que levam à formação desse tipo de tumor. As mutações em genes supressores de tumor e em proto-oncogenes estão relacionadas ao desenvolvimento de SPM e são relevantes no prognóstico desse tipo de neoplasia (Kotilingam *et al.*, 2006). As alterações citogenéticas são comuns em SPM e podem ser divididas em duas categorias. Um grupo possui alterações citogenéticas características e específicas com cariótipos simples, como fusões gênicas ou mutações pontuais. O outro grupo possui alterações inespecíficas, com cariótipos muito complexos. Em alguns casos, as alterações citogenéticas observadas estão sendo exploradas como alvos terapêuticos (Antonescu, 2006; Skubitz & D'Adamo, 2007).

Crianças com retinoblastoma hereditário, relacionado a uma mutação germinativa no gene supressor de tumor RB1, possuem risco elevado para o desenvolvimento de osteossarcoma e SPM, o qual aumenta ainda mais quando são submetidas à radioterapia. Os SPM também ocorrem em pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni, causada por uma mutação germinativa do gene supressor de tumor TP53 (Fett-Conte & Salles, 2002; Pinto *et al.*, 2002; Grobmyer *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005; Skubitz & D'Adamo, 2007).

Algumas anormalidades citogenéticas e/ou moleculares foram identificadas em lipossarcoma, leiomiossarcoma, sarcoma sinovial, tumor do estroma gastrointestinal (GIST), dermatofibrossarcoma *protuberans*,

fibromatose agressiva ou tumor desmóide, sarcoma de partes moles alveolar, rabdomiossarcoma (Skubitz & D'Adamo, 2007). A alteração citogenética primária em sarcoma de Ewing/PNET consiste em translocações específicas resultando na fusão do gene EWS, localizado em 22q12, e um gene da família de fatores de transcrição ETS, formando um novo fator de transcrição quimérico. O EWS-FLI1, devido à t(11;22)(q24;q12), é o gene de fusão mais comum (95%) em ES/PNET, enquanto o EWS-ERG, devido à translocação entre o gene EWS e o gene ERG em 21q22, é muito menos comum (5%). Essas translocações são consideradas os eventos genéticos moleculares iniciadores em ES/PNET (Graadt van Roggen *et al.*, 1999; Alava *et al.*, 2000).

Durante a progressão do tumor, alterações moleculares secundárias podem ocorrer, fornecendo uma vantagem de crescimento adicional a certos tumores. Essas alterações envolvem genes reguladores da proliferação celular ou de apoptose (Alava *et al.*, 2000).

O padrão de disseminação dos SPM, que determina o reservado prognóstico da maioria dos pacientes, é caracterizado pela infiltração de tecidos contíguos ao tumor e por um padrão de disseminação hematogênico. Quando presentes, as metástases acometem preferencialmente os pulmões (Chammas, 1999). Menos de 3% dos pacientes adultos com sarcomas terão metástase para os linfonodos, embora alguns subtipos epitelióides tenham prevalência superior (Borden *et al.*, 2003).

#### **4 – ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICOS**

Os sintomas dos SPM estão associados ao seu crescimento na região de origem, como parestesia e/ou edema distal. Se o tumor se origina em uma região facilmente visível, o paciente pode se apresentar com uma massa assintomática e indolor. O tamanho do tumor ao diagnóstico varia de acordo com o sítio anatômico. Os SPM se expandem de uma maneira esférica, podendo infiltrar a pseudocápsula e, ocasionalmente, as estruturas adjacentes. Por isso, sarcomas retroperitoneais são frequentemente grandes antes de serem notados. A taxa de crescimento dos SPM varia com a agressividade do tumor (Clark *et al.*, 2005; Skubitz & D'Adamo, 2007).

A maioria dos SPM localiza-se nas extremidades, seguida, em ordem de frequência, pela cavidade abdominal, retroperitônio, parede torácica e abdominal e cabeça e pescoço (Manoel *et al.*, 2008). Em pacientes com SPM retroperitoneais, a recidiva local é a principal causa de mortalidade (Borden *et al.*, 2003).

A identificação do SPM é baseada no exame clínico, no exame de imagem e na análise histopatológica. A anamnese e os exames de imagem podem ser usados para definir a relação do tumor com as estruturas adjacentes (Clark *et al.*, 2005; Skubitz & D'Adamo, 2007). Na prática clínica, a dor tem sido valorizada como um indicador de invasão local, considerada na decisão de preservação de membro como um fator prognóstico (Manoel *et al.*, 2008).

As radiografias convencionais podem ser usadas para excluir neoplasias ósseas e detectar calcificações características de osteossarcoma de partes moles ou sarcoma sinovial. A tomografia é utilizada na detecção e no estadiamento dos SPM intracavitários e na identificação de metástases pulmonares. A ressonância nuclear magnética, através de suas imagens multiplanares, possibilita melhor definição anatômica no diagnóstico de SPM de extremidades. A PETCT (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons) tem sua indicação bem definida no rastreamento da doença metastática (Clark *et al.*, 2005).

A confirmação diagnóstica dos SPM é feita por meio de análise histopatológica. A biópsia percutânea com agulha grossa (*core biopsy*) é um procedimento seguro e efetivo e pode ser realizado com anestesia local em pacientes ambulatoriais com tumores em membros superiores e inferiores. O sítio da biópsia deve ser escolhido de maneira que se situe na área de uma possível subsequente ressecção em bloco do tumor e deve-se tomar cuidado em assegurar que a biópsia não interfira com a cirurgia definitiva subsequente (Manoel, 2007; Skubitz & D'Adamo, 2007). O subtipo e o grau do tumor podem ser determinados em 80% dos casos submetidos a esse procedimento. Patologistas experientes em examinar SPM têm certeza diagnóstica em 95 - 99% dos casos (Manoel, 2007).

Atualmente, a biópsia incisional é menos comum do que biópsia por agulha. Em mãos inexperientes, biópsias incisionais apresentam taxas de

complicações maiores que biópsias por agulha e devem ser realizadas apenas em circunstâncias excepcionais por cirurgiões experientes que planejam a ressecção definitiva (Clark *et al.*, 2005; Manoel, 2007).

## 5 – ESTADIAMENTO

O estadiamento da doença ao diagnóstico é o fator prognóstico mais importante para os SPM. Um sistema de estadiamento foi padronizado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela *International Union Against Cancer* (UICC) (Figura 1), baseado no grau histológico, no tamanho, na profundidade e na localização do tumor, assim como no comprometimento linfonodal e na presença de metástases à distância (Kotilingam *et al.*, 2006; Borden *et al.*, 2003). Muitos estudos confirmam que o grau e o tamanho do tumor são de importância prognóstica similar (Clark *et al.*, 2005). Além desses fatores, a presença das margens cirúrgicas comprometidas também está relacionada com um pior prognóstico (Manoel *et al.*, 2008).

Existem alguns fatores prognósticos adicionais que não são incorporados no sistema de estadiamento da AJCC. Estes incluem a localização do tumor primário, *status* das margens de ressecção cirúrgica e tamanho do tumor maior que 10,0 cm (Tabela 1) (Kotilingam *et al.*, 2006).

Alguns autores ressaltam que os tumores com mais de 5 cm estão associados a um risco de recorrência local elevado, principalmente se forem maiores do que 10 cm (Kotilingam *et al.*, 2006; Manoel *et al.*, 2008).

Grau e TNM	Descrição		T1a	T1b	T2a	T2b
			Estágio			
G1	Bem diferenciado					
G2	Moderadamente diferenciado	G1 ou G2	IA	IB	IIC	IIA
G3	Pobrememente diferenciado	G3 ou G4	IIB			III
G4	Indiferenciado	N1	IV			
T1	Tumor ≤ 5cm em sua maior dimensão	M1				
T1a	Superficial à fascia profunda					
T1b	Profundo à fascia profunda que inclui: Retroperitônio, intratorácico e a maioria de cabeça e pescoço					
T2	Tumor > 5cm em sua maior dimensão		<u>Sobrevida 5 anos</u>			
T2a	Superficial à fascia profunda		Estágio	%		
T2b	Profundo à fascia profunda que inclui: Retroperitônio, intratorácico e a maioria de cabeça e pescoço		I	86		
			II	72		
N1	Linfonodos regionais metastáticos		III	52		
M1	Metástases à distancia		IV	10 - 20		

**Figura 1** – Sistema de descrição do estadio, grau e metástases linfonodais e à distância (TNM) – segundo o *Committee on Cancer for Soft-tissue Sarcoma e a International Union Against Cancer*. Dados modificados por Greene *et al.*; 2002.

**Tabela I** – Fatores prognósticos relevantes para a sobrevida de pacientes com sarcomas de partes moles não incluídos no sistema de estadiamento da AJCC (Adaptada de Kotilingam *et al.*, 2006).

Variável	Taxa de sobrevida em 5 anos (%)	Valor P
Extremidades	81	<0,001
Retroperitônio	70	
Tamanho ≤ 5 cm	89	
Tamanho > 5 - ≤ 10 cm	79	<0,001
Tamanho > 10 cm	69	
Margem (-)	80	<0,001
Margem (+)	70	

## 6 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu aproximadamente 50 subtipos de SPM relevantes e estes são denominados de acordo com o tecido

que mais se assemelham. Um sistema de graduação em três graus realizado pela *French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group* é amplamente utilizado (Borden *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2005) e leva em conta a taxa de diferenciação, a contagem mitótica e a extensão da necrose para a definição do grau histológico tumoral. Um sistema de graduação em quatro graus também é utilizado. É difícil classificar o grau de tumores previamente tratados com radioterapia, quimioterapia e tumores recidivados (Clark *et al.*, 2005). Os três subgrupos mais comuns de SPM foram previamente considerados o histiocitoma fibroso maligno (FHM), o lipossarcoma e o leiomiossarcoma (Skubitz & D'Adamo, 2007).

O tamanho do espécime de biópsia pode limitar a precisão do grau do tumor. Em alguns casos, as técnicas moleculares podem complementar a avaliação histológica (Skubitz & D'Adamo, 2007). Embora o prognóstico dos SPM seja determinado por parâmetros clínicos (tamanho, localização e margens de ressecção cirúrgica) e por características patológicas (atividade mitótica e necrose), o subtipo histológico não representa um fator prognóstico consistente (Dirix *et al.*, 1999).

Alterações genéticas são descritas em muitos SPM e ajudam a identificar tumores que foram previamente difíceis de classificar, especialmente os SPM pleomórficos. As aberrações genéticas podem ser hereditárias ou adquiridas. As translocações específicas levam a fusões gênicas que caracterizam alguns sarcomas. As informações genéticas podem facilitar o diagnóstico, especialmente no caso de tumores de células redondas pequenas. Elas também auxiliam na conformação de subtipos morfológicos e na previsão do comportamento de sarcomas específicos, além das características gerais fornecidas, como o grau, o tamanho e a profundidade. Uma aplicação emergente é a análise mutacional de tumores do estroma gastrointestinal (GIST), nos quais a mutação do gene *KIT* parece ter um efeito crucial na resposta ao tratamento e na sobrevida (Graadt van Roggen *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2005; Antonescu, 2006).

Um terço de todos os sarcomas é caracterizado por translocações cromossômicas específicas e recorrentes, resultando em genes de fusão altamente específicos, usualmente codificadores de fatores de transcrição quiméricos (Tabela II).

**Tabela II** – Translocações cromossômicas freqüentemente descritas para os Sarcomas de Partes Moles (SPM) (Adaptada de: Antonescu, 2006).

<b>Tumor</b>	<b>Translocações</b>	<b>Produto de Fusão</b>
Rabdomiossarcoma alveolar	T(2;13)(q35;q14)	PAX3 : FOXO1A
	T(1;13)(p36;q14)	PAX7 : FOXO1A
Sarcoma alveolar de partes moles	T(X;17)(p11;q25)	TFE3 : ASPL
Fibrohistiocitoma angiomatóide	T(12;16)(q13;p11)	FUS : ATF1
Sarcomas de células claras	T(12;22)(q13;q12)	EWS : ATF1
Fibrossarcoma congênito (Nefroma Mesoblástico)	T(12;15)(p13;q25)	ETV6 : NTRK3
Dermatofibrossarcoma protuberans	T(17;22)(q22;q13)	COL1A1 : PDGFB
Tumor desmoplásico de células pequenas	T(11;22)(p13;q12)	EWS:WT1
Sarcoma do estroma endometrial	T(7;17)(p15;q21)	JAZF1 : JJAZ1
	t(11;22)(q24;q12)	EWS : FLI1
Sarcoma de Ewing / Tumor Neuroectodérmico	t(21;22)(q22;q12)	EWS : ERG
	t(7;22)(p22;q12)	EWS : ETV1
Primitivo Periférico (PNET)	t(17;22)(q12;q12)	EWS : E1AF
	t(2;22)(q33;q12)	EWS : FEV
	t(9;22)(q22;q12)	EWS : NR4A3
Condrossarcoma mixóide extra-esquelético	t(9;17)(q22;q11)	RBP56 : NR4A3
	t(9;15)(q22;q21)	TCF12 : NR4A3
	t(7;16)(q33;p11)	FUS : CREB3L2
Sarcoma fibromixóide, baixo grau	t(11;16)(p11;p11)	FUS : CREB3L1 (raro)
	t(1;2)(q22;p23)	TPM3 : ALK
	t(2;19)(p23;p13)	TPM4 : ALK
Tumor miofibroblástico inflamatório	t(2;17)(p23;q23)	CLTC : ALK
	t(2;2)(p23;q13)	RANBP2 : ALK
	t(12;16)(q13;p11)	FUS : DDIT3
Lipossarcoma mixoide	t(12;22)(p13;q12)	EWS : DDIT3
		SS18 : SSX1
Sinoviossarcoma	T(X;18)(p11;q11)	SS18 : SSX2
		SS18 : SSX4 (raro)

Essas translocações cromossômicas podem ser utilizadas como marcadores moleculares para a identificação dos tipos de sarcomas de partes moles. Uma questão muito difícil tem sido usar esses genes de fusão tumor-específicos como alvos terapêuticos efetivos, seja de maneira imunoterapêutica ou citotóxica (Antonescu, 2006).

Os dois terços restantes dos SPM que não possuem uma “assinatura” genética recorrente são caracterizados por várias aberrações, incluindo perdas e ganhos cromossômicos. A maioria dos sarcomas fusocelulares em adultos e sarcomas pleomórficos pertence a este grupo. Em nível molecular, esse subgrupo de sarcomas possui uma prevalência elevada de alterações de TP53, incluindo mutações inativadoras de TP53, deleção homozigota de *CDK2N*, ampliações de *MDM2*, dentre outras (Antonescu, 2006).

Os testes genéticos aperfeiçoaram a classificação dos SPM que foram anteriormente classificados com base em apenas fundamentos histológicos ou clínicos. Por exemplo, com base em tais testes, tornou-se possível a distinção entre o rabdiossarcoma embrionário pobremente diferenciado e o rabdiossarcoma alveolar sólido, pela presença do gene de fusão *PAX-FOXO1A*, encontrado nesta última categoria histopatológica (Graadt van Roggen *et al.*, 1999; Antonescu, 2006). O diagnóstico molecular também poderia ser usado na distinção entre neoplasias malignas e benignas, quando as consequências de uma interpretação incorreta são significativas e quando os achados imuno-histoquímicos e microscópicos são inconclusivos. Em muitos casos, os resultados moleculares deveriam ser usados como uma forma de validar o diagnóstico morfológico diferencial, corroborando com os achados imuno-histoquímicos e com a informação clínica (Antonescu, 2006).

As análises de *microarrays* podem ser muito úteis na classificação dos sarcomas. Os estudos de *microarrays* vão além do problema da classificação, elucidando mecanismos de regulação gênica do tumor, identificando fatores prognósticos e acelerando a descoberta de novas drogas alvo-dirigidas (Borden *et al.*, 2003).

Uma necessidade urgente para o relato comum, completo e único da patologia dos sarcomas é eminente. O diagnóstico patológico preciso e a classificação de subtipos diferentes de SPM são críticos para a caracterização molecular e avaliação de alvos terapêuticos em ensaios clínicos para cada tipo



histológico específico (Borden *et al.*, 2003). Nessa dissertação será empregada a classificação baseada na origem histológica dos SPM, segundo as diretrizes apontadas pela OMS (Anexo 1).

## **7 – TRATAMENTO**

O progresso no tratamento dos SPM do adulto, de 1970 a 1990, foi marcado por avanços na definição histopatológica, no estadiamento, no uso da radioterapia como adjuvante em outras modalidades terapêuticas, como a definição da doxorrubicina e da iofosfamida como drogas ativas, permitindo a preservação funcional dos membros. De 1990 a 2000, os progressos incluíram a identificação das translocações gênicas, o uso da imuno-histoquímica, a introdução de novas modalidades de imagem e refinamentos no prognóstico (Borden *et al.*, 2003).

A avaliação precisa dos SPM é crítica para iniciar o tratamento. A cirurgia para a doença localizada é frequentemente curativa, isolada ou em combinação com radioterapia e quimioterapia em pacientes selecionados. A preservação da função dos membros é um dos objetivos do tratamento para SPM de extremidades. Tumores intrabdominais representam um desafio ao tratamento, devido à proximidade aos órgãos vitais adjacentes. Os especialistas que preservam a função de uma dada região devem trabalhar em cooperação com outras especialidades para aumentar a probabilidade de melhores resultados (Clark *et al.*, 2005). Atualmente, o tratamento dos SPM é norteado pelo grau histológico e pela adequação das margens cirúrgicas, em relação à necessidade de quimioterapia e radioterapia (Manoel *et al.*, 2008).

### **7.1 – Cirurgia:**

A ressecção cirúrgica do tumor envolvendo margens amplas, com ou sem radioterapia, oferece a melhor chance de cura na ausência de doença metastática. A cirurgia deve ser bem planejada por uma equipe de cirurgiões experientes após o estudo cuidadoso da histopatologia e das imagens (Clark *et al.*, 2005).

Os SPM se expandem esfericamente ao longo de um plano tecidual, promovendo um crescimento centrífugo que cria uma pseudocápsula, constituída de tecido circunvizinho comprimido. As células malignas penetram essa pseudocápsula. A simples remoção do tecido tumoral visível nesse plano deixa uma doença microscópica no leito cirúrgico, levando à recidiva em cerca de 90% dos casos. Mais de 30% dos tumores terão recidiva local após re-excisão do leito tumoral e o uso subsequente da radioterapia não resgata pacientes com margens histológicas positivas não-planejadas. Portanto, o objetivo da cirurgia é ressecar o tumor com margens amplas, entre 2 a 3 cm, sempre que possível, removendo assim pelo menos um plano de tecido não-comprometido. Aproximadamente 1/3 dos pacientes com tumores de baixo grau e de grau intermediário, com margens de ressecção amplas não necessitarão de tratamento complementar, incluindo radioterapia (Clark *et al.*, 2005).

A cirurgia é o sustentáculo do tratamento dos SPM retroperitoneais. A ressecção em bloco das vísceras adjacentes é necessária com frequência, mas a ressecção tumoral completa, com margens histológicas negativas, é difícil devido à proximidade com estruturas vitais (Clark *et al.*, 2005).

Embora os tumores distais dos segmentos apendiculares sejam menores, é mais difícil a preservação de função, principalmente nos antebraços e mãos. O tratamento de indução pré-operatória pode reduzir o tamanho dos tumores distais dos membros e proporcionar melhores resultados funcionais. A amputação é necessária em cerca de 5 a 10% dos pacientes com SPM dos membros, geralmente após cirurgias prévias de preservação dos mesmos. Esses procedimentos são bem tolerados e fornecem um excelente controle local (Clark *et al.*, 2005). Entretanto, não há evidências de que as amputações proporcionem maior sobrevida. A radioterapia intra-operatória tem sido recentemente utilizada para proporcionar uma melhor taxa de controle local, desde que associada à ressecção com margem livre (Manoel *et al.*, 2008).

## **7.2 - Radioterapia:**

Os efeitos citotóxicos e o papel terapêutico da radioterapia no tratamento de SPM são bem descritos. A radioterapia deve ser considerada para tumores

de alto grau de extremidades, a menos que as margens sejam muito amplas, e para tumores de grau intermediário das extremidades com margens histológicas próximas ou positivas. A radioterapia apresenta um papel pouco relevante em SPM de baixo grau, embora seja considerada quando há recidiva local (Clark *et al.*, 2005).

A radioterapia como tratamento exclusivo deve ser considerada somente quando a cirurgia for inapropriada ou quando ocorrer recusa pelo paciente, alcançando taxas de controle local de 30 a 60% (Clark *et al.*, 2005). Não existe consenso quanto à utilização da radioterapia pré e pós-operatória, sendo que o método utilizado depende da preferência dos centros de tratamento. Como vantagem, a radioterapia pré-operatória pode promover cito-redução, diminuindo o tamanho do tumor e facilitando a cirurgia. Por outro lado, pode retardar a cirurgia, dificultar a cicatrização e confundir a avaliação patológica do espécime ressecado. Complicações que não estão presentes na radioterapia pós-operatória (Skubitz & D'Adamo, 2007).

O papel da radioterapia adjuvante está bem definido nos sarcomas de alto grau com mais de 5 cm, nas cirurgias com margens comprometidas, ou naqueles tumores menores que 1 cm, quando a proposta é de preservação de membros. Os SPM de alto grau  $\leq$  5 cm, os de baixo grau, os retroperitoneais, os de cabeça e pescoço, os de mama e os ginecológicos representam um ponto de controvérsia quanto à indicação da radioterapia nas suas diversas modalidades (Manoel *et al.*, 2008). A braquiterapia é vantajosa no pós-operatório, dada a sua natureza hipóxica da ferida e por suas características radiobiológicas da lei do inverso do quadrado (a dose local é alta, mas decresce proporcionalmente com o aumento da distância do tumor). Essa vantagem é mais importante em pacientes que já foram tratados previamente com radioterapia externa (Clark *et al.*, 2005).

### **7.3 – Quimioterapia:**

Enquanto que o objetivo da cirurgia e da radioterapia é o controle local, a finalidade da quimioterapia é o controle sistêmico, o qual pode ser terapêutico, adjuvante ou paliativo. Embora alguns subtipos de SPM sejam sensíveis aos agentes quimioterápicos, os resultados da quimioterapia são

geralmente insatisfatórios e o uso da quimioterapia adjuvante é controverso (Clark *et al.*, 2005; Muret *et al.*, 2008).

A quimioterapia pré-operatória oferece muitas vantagens. Em alguns casos, ela pode reduzir o tumor, facilitando a cirurgia. A administração de quimioterapia pré-operatória também pode demonstrar a resposta do tumor ao quimioterápico, *in vivo*, podendo auxiliar nas decisões sobre sua aplicação no tratamento pós-operatório (Skubitz & D'Adamo, 2007). A quimioterapia pode ser considerada paliativa para muitos pacientes com doença irresssecável ou metastática (Clark *et al.*, 2005). Acredita-se que a estratificação dos perfis de expressão gênica ou de outros estudos moleculares futuros possam esclarecer o papel da quimioterapia adjuvante em pacientes com SPM específicos (Skubitz & D'Adamo, 2007).

#### **7.4 – Terapia molecular alvo-dirigida:**

Muitos progressos estão ocorrendo com o uso de terapias direcionadas a alvos moleculares associados aos SPM. O melhor exemplo conhecido é o do tumor do estroma gastro-intestinal (GIST), onde se destaca mutações no proto-oncogene *KIT*, um receptor de tirosina-quinase. A detecção imuno-histoquímica da proteína resultante, também denominada KIT, caracteriza este tipo de tumor. O inibidor de tirosina-quinase Mesilato de Imatinib é o tratamento de escolha para o GIST avançado, inoperável ou metastático. O papel do Imatinib como terapia neoadjuvante ou adjuvante está sob avaliação (Borden *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2005).

Outros subtipos de SPM com alvos moleculares específicos foram identificados. O *dermatofibrossarcoma protuberans* e o fibrossarcoma de células gigantes apresentam uma translocação, que causa a fusão dos genes do colágeno tipo 1 $\alpha$  (COL1A1) e o fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGFB). A proteína de fusão resultante é um PDGFB funcional. O Mesilato Imatinib inibe o receptor de PDGFB e, então, pode ser também efetivo no tratamento do *dermatofibrossarcoma protuberans*. Este agente pode ser útil em pacientes com doença recidivada, inoperável ou metastática (Clark *et al.*, 2005). O sucesso do Mesilato de Imatinib no tratamento do GIST ao longo dos

últimos anos resultou em uma melhor compreensão da biologia do câncer e do desenvolvimento de novas drogas alvo-dirigidas (Borden *et al.*, 2003)

## **8 – O GENE SUPRESSOR DE TUMOR TP53**

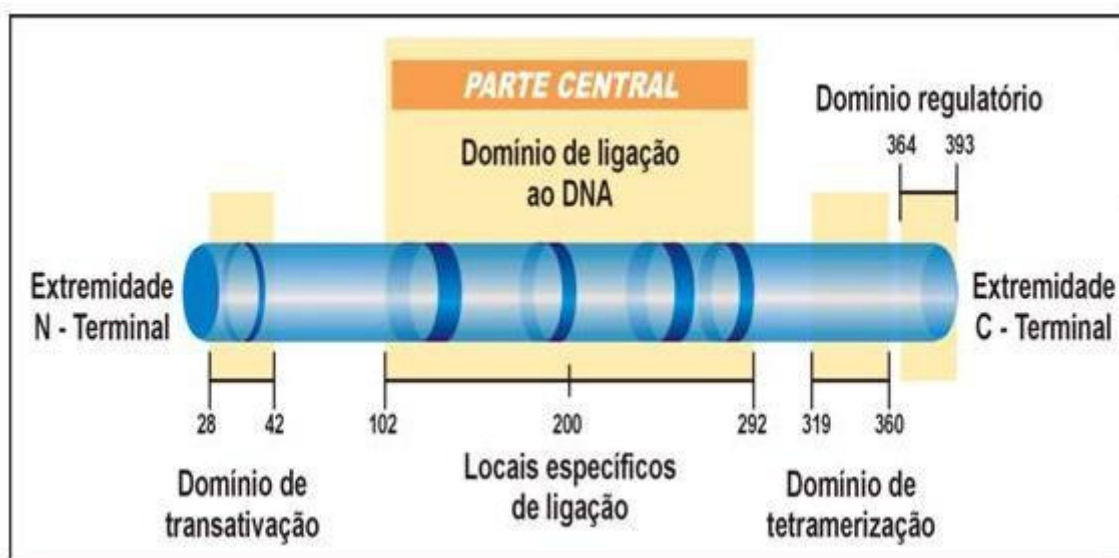
Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos do ciclo celular e a perda ou inativação desses genes está relacionada à proliferação celular. O TP53 é o gene supressor tumoral mais estudado em cânceres humanos e atua na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular (Simpson, 1999; Silva, 2003; Lattuada *et al.*, 2004; Oliveira, 2005; Gallo *et al.*, 2005; Lima J *et al.*, 2006; Hamú *et al.*, 2007). Ele está localizado no *locus* 17p13.1, estendendo-se através de 20 kb (Furuwatari *et al.*, 1998; Dirix *et al.*, 1999; Fett-Conte & Salles, 2002; Klumb *et al.*, 2002; Gallo *et al.*, 2005; Ribeiro Jr & Safatle-Ribeiro, 2006; Savage *et al.*, 2006; Bojesen & Nordestgaard, 2008; Muret *et al.*, 2008) e contém 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante. O TP53 pertence a uma família de genes altamente conservados que contém pelo menos outros dois membros, TP63 e TP73 (Gallo *et al.*, 2005; Oliveira, 2005), e apresenta homologias entre diversas espécies eucarióticas superiores como *Drosophila melanogaster*, *Xenopus leavis*, *Mus musculus* entre outros (Cavalcanti Jr *et al.*, 2002; Oliveira, 2005). Embora os genes TP53, TP63 e TP73 regulem grupos similares de genes, o TP53 é o único com papel de supressão tumoral (Gallo *et al.*, 2005). Os fatores de transcrição para o gene TP53 incluem heterodímeros de proteínas c-Myc/Max que reconhecem seqüências CATGTG de -29 à -34 no sítio promotor do gene, podendo elevar a expressão de TP53 em até 12 vezes (Oliveira, 2005).

### **8.1 – Do gene à proteína p53:**

O produto do gene TP53 é uma fosfoproteína nuclear de 53kDa e com 393 aminoácidos em sua extensão (Sutcliffe & Brehm, 2004; Levine *et al.*, 2006; Bojesen & Nordestgaard, 2008). A proteína p53 foi descrita primeiramente em 1979 e desde essa época existem mais de 46.000 artigos

publicados sobre esse assunto. A descrição dessa proteína e de seu gene mudou do conceito de um antígeno tumoral associado a vírus para um oncogene e em seguida para um gene supressor de tumor (Kress *et al.*, 1979; Oren & Rotter, 1999; Cavalcanti Jr. *et al.*, 2002; Fett-Conte & Salles, 2002; Silva, 2003; Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Ribeiro Jr & Safatle-Ribeiro, 2006; Levine *et al.*, 2006).

A proteína p53 possui uma organização estrutural típica de fatores de transcrição. Ela apresenta quatro domínios com funções distintas (Figura 2). A extremidade amino-terminal ou N-terminal (resíduos 1 ao 83) constitui o domínio de transativação transcricional, a porção central (resíduos 102 ao 292) constitui a porção ligante a seqüências específicas no DNA, e por fim na extremidade carboxi-terminal ou C-terminal estão os domínios de tetramerização (resíduos 319 ao 360) e regulatório (resíduo 364 ao 393) (van Oijen *et al.*, 2000; Silva, 2003; Sutcliffe & Brehm, 2004; Gallo *et al.*, 2005, Oliveira, 2005; Levine *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007). A região N-terminal pode ser dividida em sub-domínios com funções distintas, mas capazes de cooperar na ativação da transcrição de vários genes-alvo (Smith *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Desenho esquemático dos 393 aminoácidos da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53 [Silva, 2003].

Por desempenhar diferentes funções, cada domínio da proteína atua em momentos específicos da atividade da p53. O domínio de transativação é

importante para a ativação específica de determinados genes além de ser o sítio de ligação de sua principal antagonista, a oncoproteína HDM2 – a forma humana do gene *murine double minute 2 protein*, *MDM2*. O domínio central de ligação ao DNA permite a adesão da molécula protéica aos motivos de DNA, incluindo as regiões promotoras ou as regiões intrônicas de determinados genes-alvo e constitui uma região altamente conservada entre os membros da família de p53 (p63 e p73). O domínio de tetramerização é responsável pela formação dos tetrâmeros de p53, que representam a forma mais ativa da molécula em transativação. Finalmente, o domínio regulatório é responsável pela regulação negativa do domínio central de ligação ao DNA, ligando-se a ele e, assim, inibindo a ligação específica da proteína aos diferentes promotores (Özören & El-Deiry, 2000; van Oijen *et al.*, 2000; Silva, 2003; Oliveira, 2005; Smith *et al.*, 2007 ; Madhumalar *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2008).

A extremidade C-terminal é propensa ao *splicing* alternativo e a modificações pós-traducionais e possui um domínio básico rico em arginina e lisina que funciona como uma região autônoma de ligação inespecífica aos ácidos nucléicos. Acredita-se que esse domínio facilite a busca por alvos específicos por todo o genoma (Sauer *et al.*, 2008).

A afinidade de ligação da p53 aos diversos motivos de DNA é variável e os genes com maior afinidade respondem de forma mais intensa às alterações nas concentrações dessa proteína causadas por estresse carcinogênico. Os polimorfismos de nucleotídeo único nessas regiões podem afetar o controle transcricional de seus genes-alvo (Veprintsev & Fersht, 2008; Zeng *et al.*, 2008). Os mecanismos moleculares para a ativação/repressão da transcrição mediada por p53 são complexos e parecem depender da orientação da seqüência de ligação aos promotores de seus genes responsivos (Alimirah *et al.*, 2007).

A função da p53 na supressão tumoral é explicada por seu papel chave na resposta celular a várias formas de estresse. A proteína p53 tem a característica de ser expressa quando o DNA sofre algum tipo de dano (Silva, 2003; Sutcliffe & Brehm, 2004; Lima JM *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2007). Em condições favoráveis, ou seja, sem qualquer sinal de estresse celular, p53 se encontra na forma inativa, mas esta é rapidamente ativada quando a célula sofre alguma agressão. Vários sinais podem levar à estabilização e ao acúmulo

de p53 por modificações pós-traducionais, paralisando a progressão do ciclo celular nos chamados pontos de checagem (*checkpoints*) para que o DNA possa ser reparado (Oren & Rotter, 1999; Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005). Esses sinais incluem agentes que causam danos ao DNA (estresse genotóxico), ativação constitutiva de cascatas de sinalização de crescimento (estresse oncogênico), bem como outros tipos de estresse como a depleção de ribonucleotídeos ou a hipóxia (Levine *et al.*, 2006).

Portanto, p53 está no ponto de convergência de várias vias diferentes de resposta ao estresse. Ela é induzida em resposta a sinais gerados por quinases como ATM, ATR, Chk2, JNK, que reconhecem danos e outros sinais de estresse para o DNA (Oliveira, 2005; Levine *et al.*, 2006). A proteína p53 se liga ao local danificado do DNA, interrompendo as células nas fases G do ciclo celular (G1 e/ou G2) e ativando mecanismos de reparo do DNA ou apoptose (Alava *et al.*, 2000; Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Gallo *et al.*, 2005; Lima JM *et al.*, 2006). Desta forma, é garantida a manutenção da integridade genômica e o controle da proliferação celular (Oren & Rotter, 1999; Klumb *et al.*, 2002).

Os genes regulados por p53 envolvem genes envolvidos no bloqueio do ciclo celular (p21<sup>waf1</sup>, 14-3-3 sigma, GADD45, Reprimo e b99), na apoptose (PUMA, BAX, NOXA, Fas/CD95, Perp, scotin, BCL-2, BCL-XL), no reparo do DNA (Pol B, O6MGMT, MSH2, p48, p53R2), na angiogênese (TSP1, BAI-1, MASPIN, GD-AiF, TSAP-6) e na evolução para metástases (KAI). A regulação coordenada desses genes por p53 resulta em efeitos anti-proliferativos, permitindo a preservação da integridade genômica (Jin *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2006).

A senescência é outra forma de resposta de p53 ao estresse celular. Existem algumas sugestões de que a senescência é tão importante quanto a apoptose na mediação das funções supressoras de tumor de p53. Os genes e seus produtos gênicos que contribuem para esta via incluem os genes ATM, ATR, Chk1, Chk2, Rb, STAT5A, E2F1, RasV12 (Mallette *et al.*, 2008). Vários outros genes responsivos à p53 estão começando a definir funções adicionais à sua via. A proteína p48 e a subunidade p53R2 da ribonucleotídeo redutase são genes responsivos à p53 que auxiliam no reparo do DNA. As sestrinas são um grupo de genes regulados por p53 que neutralizam a presença de oxigênio



reativo na célula. Algumas funções da via de p53 ajudam a proteger a célula de estresses endógenos e exógenos, enquanto que outras aumentam os processos de reparo celular. Uma segunda função regulada por p53 é a comunicação com as células vizinhas de que há um dano no DNA ou um sinal de estresse (Jin *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 2006).

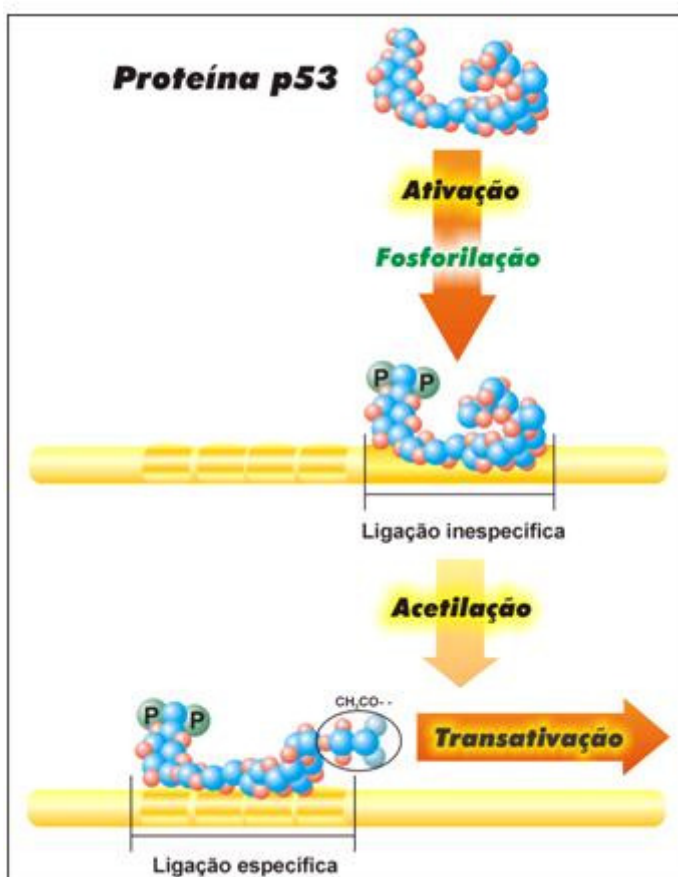
A seqüência de consenso para a sinalização de p53 no DNA é RRRRCWWGYYY, onde R é uma purina, W é Adenina ou Timina e Y é uma pirimidina. O elemento responsivo à p53 é composto por duas a dez dessas seqüências de bases pareadas, separadas por uma região espaçadora de 0-21 pares de base. As seqüências estão localizadas frequentemente na extremidade 5' do gene ou no primeiro ou segundo íntron do gene regulado pela proteína p53. Está claro que tipos diferentes de sinais de estresse resultam em genes diferentes sendo transcritos sob o controle de p53 (Murphy, 2006; Levine *et al.*, 2006; Alimirah *et al.*, 2007; Lyakhov *et al.*, 2008; Veprintsev & Fersht, 2008).

Os genes que estão sob o controle de p53 foram localizados por meio de um estudo que utilizou ferramentas de bio-informática para reunir todas as informações encontradas nos bancos de dados sobre essa proteína. Foram encontrados 16 elementos responsivos a p53, sendo que alguns deles também são alvos de p63 e p73 (Lyakhov *et al.*, 2008). Entretanto, até o ano de 2008, já foram identificadas 1.546 regiões de ligação de p53, que também podem ser sinalizadas pela superexpressão dos fatores de transcrição p63 e p73 (Smeenk *et al.*, 2008).

Em uma célula que se encontra numa situação de estresse, a proteína p53 torna-se ativada pela fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal. Uma vez fosforilada, p53 não é capaz de se ligar ao DNA de maneira específica. A ligação não-específica ao DNA é causada pela ligação da extremidade C-terminal da proteína com o domínio central, causando um bloqueio desse domínio. O bloqueio pode ser revertido por fosforilação ou acetilação da extremidade C-terminal (Figura 3) (Oliveira, 2005; Sauer *et al.*, 2008). Nessa situação, p53 liga-se de maneira mais eficaz ao DNA, podendo agir assim como fator de transcrição de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, incluindo os genes *WAF1/CIP/P21* (do inglês, *Wild-type p53-*

*Activated Fragment*) e *GADD45* (do inglês, *Growth Arrest DNA Damage*) (Alimirah *et al.*, 2007; Sabah *et al.*, 2007).

Para desempenhar sua função regulatória, as moléculas protéicas de p53 devem se associar para formarem tetrâmeros. O complexo protéico tetramérico da proteína é capaz de conter o crescimento celular ou induzir a apoptose (Oren & Rotter, 1999; Alava *et al.*, 2000; Silva, 2003; Oliveira, 2005). Além do mais, a fosforilação de p53 na extremidade N-terminal aumenta sua ligação às histonas acetil-transferases (HATs) que promovem a acetilação de p53 após indução pelo estresse celular. A acetilação de p53 aumenta a sua ativação transcricional, acentuando sua atividade de ligação a seqüências específicas no DNA (Sutcliffe & Brehm, 2004; Smith *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Modelo mostrando ativação da proteína p53 através da fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal. Após fosforilação, a proteína se liga de maneira inespecífica ao DNA. A acetilação na extremidade C-terminal libera o domínio de ligação ao DNA, isso faz com que a p53 se ligue especificamente a determinados sítios do DNA, podendo assim agir como um fator transcricional [Silva, 2003].

O gene *WAF1* é ativado por p53 e codifica uma CDKI (do inglês, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*) denominada p21, um inibidor universal da atividade das CDKs (do inglês, *Cyclin-Dependent Kinase*) (Sabah *et al.*, 2007). Quando os níveis de p21 aumentam, os complexos ciclina-CDK, aos quais a p21 se liga, perdem a capacidade de fosforilar as proteínas supressoras tumorais da família RB. A proteína RB na sua forma hipofosforilada seqüestra o fator de transcrição E2F (do inglês, *Elongation Factor*), necessário para a síntese da maquinaria protéica de replicação do DNA celular, bloqueando a progressão do ciclo celular antes da fase S. Além de inibir a atividade do complexo ciclina-CDK, a p21 também pode interferir diretamente com a síntese de DNA mediante ligação ao PCNA (do inglês, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), um fator essencial para a replicação do material genético.

O gene *GADD45* codifica uma proteína que, de forma similar a p21, inibe a síntese de DNA pela ligação ao PCNA (Oren & Rotter, 1999; Wallace-Brodeur & Lowe, 1999; Fett-Conte & Salles, 2002; Oliveira, 2005).

Apesar de ser um fator transcricional para genes relacionados às vias apoptóticas, a proteína p53 também pode estimular a apoptose independentemente da transcrição gênica através da ação direta no citosol/mitocôndria. As vias apoptóticas dependentes da p53 levam a uma disfunção mitocondrial (Levine *et al.*, 2006; Uo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

A proteína BAX é membro da família BCL-2 e seu deslocamento do citoplasma para a mitocôndria promove a liberação de agentes pró-apoptóticos nesta organela. Os alvos transcripcionais de p53 incluem proteínas de domínio único BH3 (*Bcl-2 homology 3*) como PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) e Noxa, as quais ativam BAX (*Bcl-2-associated X protein*) e BAK (*Bcl-2-antagonist/killer*) direta ou indiretamente, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação do citocromo *c*. Uma vez no citoplasma, o citocromo *c* funciona como um co-fator da Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) para promover a clivagem da pró-capase-9, iniciando os eventos apoptóticos (Jin *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2007; Sabah *et al.*, 2007; Uo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

O equilíbrio entre as proteínas BAX (indutora de apoptose) e BCL-2 (oncoproteína anti-apoptótica) pode ser alterado pela p53 de maneira a favorecer a morte celular (Sabah *et al.*, 2007). A proteína p53, ao se deslocar

para a mitocôndria, neutraliza a função anti-apotótica da BCL-2 (Oliveira, 2005; Sabah *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

Outras proteínas anti-apoptóticas reguladas negativamente por p53 incluem survivina e ARC (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*) (Végran *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Mutações no gene TP53 foram associadas ao aumento de expressão de survivina e de suas variantes, sugerindo um aumento da sobrevivência celular com conseqüente resistência a terapias para o câncer, já que não ocorre apoptose (Végran *et al.*, 2007).

A proteína p53, que em situações normais possui uma meia vida relativamente curta, cerca de 20 a 30 minutos, é mantida em baixos níveis nos tecidos normais que não sofreram nenhum dano. Os baixos níveis de p53 nos tecidos normais são mantidos por meio de mecanismos que garantem sua rápida degradação, sob um rígido controle. Muitos genes e seus produtos estão envolvidos nesse controle. Neste contexto, o proto-oncogene *MDM2* é importante, pois se trata de um gene ativado por p53. O controle da expressão de *MDM2* é exercido pela própria p53 sendo ela assim responsável pelo seu próprio *feedback* (Silva, 2003; Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Levine *et al.*, 2006; Sabah *et al.*, 2007; Veprintsev & Fersht, 2008).

O produto funcional de *MDM2*, a proteína MDM2, é uma ubiquitina-ligase capaz de se ligar à extremidade N-terminal da proteína p53, bloqueando assim sua atividade transcricional. A MDM2 transfere unidades de ubiquitina a várias regiões da extremidade C-terminal de p53. Essa ligação é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma celular, onde esta será degradada via proteassoma. Recentemente, outras duas ubiquitina ligases que agem sobre a p53 foram descritas, a COP-1 e PIRH-2 (Levine *et al.*, 2006). O transporte do complexo protéico MDM2/p53 para fora do núcleo é mediado por proteínas específicas, denominadas exportinas, que são capazes de se ligar a proteína MDM2 e auxiliar na exportação do complexo para fora do núcleo (Silva, 2003; Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Levine *et al.*, 2006).

Existem outros mecanismos de degradação de p53 independentes do proteassoma em células humanas. Um exemplo é o que envolve as calpaínas, uma família de cisteína-proteases capazes de degradar p53 via ubiquitinação (Sutcliffe *et al.*, 2004).

Outra via de ativação de p53 resulta da inativação mutacional de um gene supressor de tumor como o retinoblastoma e o APC ou de uma mutação capaz de ativar oncogenes como o myc ou Ras. As atividades de fatores de transcrição que resultam das mutações nesses genes podem transcrever o gene ARF (Levine *et al.*, 2006).

A regulação dos níveis de p53 nuclear pode ser neutralizada pela proteína supressora tumoral p14<sup>ARF</sup> codificada pelo locus *INKa/ARF* (do inglês, *Alternative Reading Frame*), que é capaz de se ligar à proteína MDM2 e formar um complexo com MDM2/p53 que é retido no núcleo. A proteína p14<sup>ARF</sup> pode também degradar MDM2, inibindo sua atividade como ubiquitina ligase, aumentando os níveis de p53 na célula (Jin *et al.*, 2000; Silva, 2003; Oliveira, 2005, Levine *et al.*, 2006). Adicionalmente, deleção ou mutações do gene *INKa/ARF* também são mecanismos alternativos de inativação de p53. A proteína p53 reprime a transcrição do gene *ARF*. Este circuito complexo é essencial para a atividade, a manutenção e para a regulação dos níveis intracelulares de p53 (Jin *et al.*, 2000; Oliveira, 2005).

A habilidade de MDM2 de se ligar à p53 também é prejudicada após fosforilação do sítio de ligação, causada por danos no DNA. A proteína p53 possui sinais de localização nuclear, chamados NLS (do inglês, *Nuclear Localization Signals*), os quais, em sua maioria, se localizam na extremidade C-terminal e que permitem a sua entrada no núcleo. Existe um sinal de exportação nuclear, o NES (do inglês, *Nuclear Export Signal*), no domínio de tetramerização da proteína p53. Quando a p53 está na forma tetramérica, o NES fica inacessível às exportinas, mas se p53 se encontra no estágio dimérico ou monomérico, as exportinas podem se ligar ao NES e p53 pode ser transportada para o citoplasma independentemente de MDM2. Existe também outro mecanismo de exportação de p53 para o citoplasma em sua extremidade N-terminal, na região de ligação a MDM2 (Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005).

A fosforilação da extremidade N-terminal, além de estabilizar p53, bloqueia sua interação com MDM2 e regula sua localização celular, inibindo a seqüência de exportação nuclear. Além do mais, ela tem o poder de estimular a atividade de transativação de p53 (Sutcliffe & Brehm, 2004).

A superexpressão de MDM2 também está associada à progressão acelerada do câncer e à falta de resposta à terapia em alguns tipos de tumor. Os níveis muito elevados de MDM2 enfraquecem a via de p53, resultando em uma taxa mais elevada de mutações, em falhas no reparo de DNA e na redução da apoptose, levando a uma formação tumoral mais rápida e freqüente (Levine *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2007).

A região promotora de MDM2 é regulada por vias de sinalização hormonais e sua ativação pode ser induzida pela expressão do receptor de estrógeno. Por isso, é possível relacionar a expressão de MDM2 ao gênero, pois muitos hormônios são gênero-específicos. Assim, as mulheres possuem níveis mais elevados de MDM2, fato que diminui as concentrações celulares de p53, podendo levá-las a uma predisposição mais intensa ao desenvolvimento de câncer (Levine *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2007; Ørsted *et al.*, 2007). De forma interessante, também foi sugerido que existe uma regulação mútua e inversa entre a expressão de TP53 e o receptor de andrógeno em linhagens celulares de câncer de próstata (Alimirah *et al.*, 2007).

Mutações gênicas também interferem na estabilidade da p53. As mutações são preferencialmente do tipo *missense* e ocorrem principalmente no domínio de ligação ao DNA (Thomas *et al.*, 1999; Wallace-Brodeur & Lowe, 1999; Alava *et al.*, 2000; Silva, 2003; Savage *et al.*, 2006; Petitjean *et al.*, 2007a; Madhumalar *et al.*, 2008). As proteínas mutantes possuem um efeito dominante negativo, formando heterotetrâmeros com p53 normal. Estas mutações resultam em proteínas com atividades transcricionais alteradas ou ausentes e que se acumulam em altas concentrações (Thomas *et al.*, 1999; Alava *et al.*, 2000; Silva, 2003; Petitjean *et al.*, 2007a; Madhumalar *et al.*, 2008).

Neste contexto, utilizando ensaios imuno-histoquímicos, imunofluorescência e ELISA, pode-se detectar p53 mutante em tumores devido a sua conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem (Wallace-Brodeur & Lowe, 1999; Oliveira, 2005; Muret *et al.*, 2008). Entretanto, dependendo da sensibilidade da técnica, e do nível de estresse exercido sobre o tecido, a superexpressão fisiológica do tipo selvagem de p53 também pode resultar em níveis protéicos imunodetectáveis. Para distinguir entre as causas da imunorreatividade de p53, a análise paralela da expressão de  $p21^{WAF1}$  pode ser útil. A demonstração do acúmulo de p53 na ausência de  $p21^{WAF1}$  se

correlaciona bem com as mutações do tipo *missense* de TP53 em vários estudos (Alava *et al.*, 2000; Sabah *et al.*, 2007).

Em células com o TP53 mutado ou inativo, há um acúmulo de defeitos genéticos que culminam com a transformação maligna, pois não ocorre apoptose (Brentani *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2007). As mutações em TP53 se diversificam em suas posições e natureza, permitindo o agrupamento e a comparação dos perfis mutacionais encontrados em cada tipo de tumor. Mais de 80% das mutações pontuais estão concentradas nos éxons 4 a 9, facilitando o estudo dessas alterações (Gallo *et al.*, 2005). Os tumores com mutações em TP53 estão associados a um fenótipo mais agressivo e a um pior prognóstico (Bond *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007).

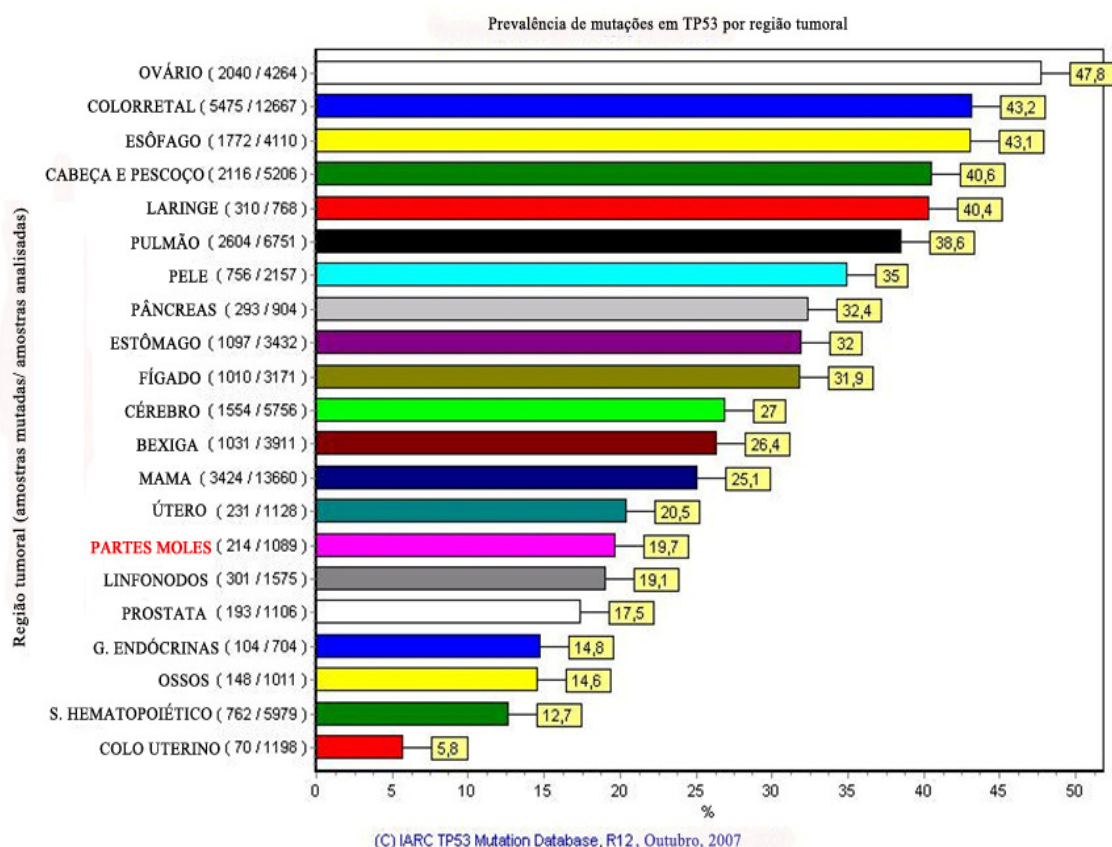
A perda da função gênica por meio de mecanismos genéticos recessivos requer a inativação de ambos os alelos de TP53, sugerindo uma perda de função geneticamente dominante em consequência dessas mutações pontuais. Estas podem resultar em uma oncoproteína capaz de seqüestrar ou de inativar a p53 selvagem. Esses dados indicam que, apesar de mecanismos genéticos específicos, a atenuação da função normal de p53 também é importante para seu papel em neoplasias humanas (Mulligan *et al.*, 1990; Das *et al.*, 2007). Outro aspecto interessante é que, além da ausência de atividade da própria proteína selvagem, o predomínio de mutações do tipo *missense* leva à expressão de uma proteína estável, mas conformacionalmente aberrante, sugerindo um possível ganho de função como resultado dessas mutações (Das *et al.*, 2007).

As alterações germinativas de TP53 estão associadas a uma condição autossômica dominante rara, a síndrome de Li-Fraumeni (SLF). Essas mutações são encontradas em 70% dos casos dessa síndrome (Achatz *et al.*, 2007). Os pacientes com SLF são heterozigotos para a mutação de TP53, mas suas células neoplásicas perdem o alelo selvagem. Cerca de 80% dos tumores encontrados nos portadores dessa mutação são sarcomas, câncer de mama, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais. Destes 80%, a metade é representada apenas por câncer de mama e por sarcomas (Gallo *et al.*, 2005; Petitjean *et al.*, 2007a).

De modo geral, a mutação em TP53 é um fator prognóstico ruim e, aos poucos, a detecção de tais mutações está sendo incorporada na avaliação

prognóstica clínica de tumores humanos (Simpson, 1999, Antonescu *et al.*, 2001; Antonescu *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 2006; Achatz *et al.*, 2007; Petitjean *et al.*, 2007a). Alguns indivíduos possuem níveis funcionais de p53 diversos, respondendo de maneiras diferentes ao estresse ambiental e possuindo riscos variáveis para o desenvolvimento do câncer associado (Bond *et al.*, 2007). As mutações em TP53 também são associadas com a resistência à quimioterapia, especialmente aos agentes que causam danos ao DNA, em pacientes com diversos tipos de tumor, incluindo sarcomas. Isso pode ser devido à perda da capacidade apoptótica em resposta ao dano no DNA (Alava *et al.*, 2000; Bond *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008).

As mutações somáticas de TP53 mais freqüentes foram seqüenciadas e encontram-se descritas em um banco de dados do IARC, conforme ilustrado na figura 4.



**Figura 4** - Mutações somáticas de TP53 mais freqüentes em humanos – dados de mutações em TP53 do IARC (modificado de Petitjean *et al.*, 2007b).

Várias mutações de TP53 foram relacionadas aos SPM (Andreassen *et al.*, 1993; Hieken *et al.*, 1996; Simpson, 1999; Wallace-Brodeur & Lowe, 1999;



Alava *et al.*, 2000; Ambrosini-Spaltro *et al.*, 2006; Borden *et al.*, 2003), sendo consideradas as alterações genéticas mais comuns nessas neoplasias (Das *et al.*, 2007). Essas alterações foram relacionadas à agressividade do tumor, ao prognóstico desfavorável, à redução na sobrevida e à resposta ao tratamento (Komuro *et al.*, 1993; Taubert *et al.*, 1996; Bastian *et al.*, 1999; Schhhneider-Stock *et al.*, 1999; Dirix *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Borden *et al.*, 2003; Sabah *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008). O gene TP53 está mutado em 17 a 20% dos SPM e, dentre essas mutações, 69% são do tipo *missense*, 13,4% são mutações silenciosas e 6,06% são mutações sem sentido (Petitjean *et al.*, 2007b; Muret *et al.*, 2008). A literatura relata que essas mutações são mais freqüentemente encontradas em metástases do que em tumores primários, como também em sarcomas de alto grau, quando comparados àqueles de baixo grau de anaplasia (Das *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008).

As mutações de TP53 possuem impacto negativo na sobrevida global e na sobrevida sarcoma-específica. A expansão clonal de células com o TP53 mutado em SPM confere vantagem metastática ao tumor e a re-introdução do gene selvagem nessas mesmas células é capaz de inibir a proliferação celular e de aumentar a resposta tumoral a drogas citotóxicas utilizadas no tratamento quimioterápico (Das *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008).

As alterações de TP53 em SPM estão correlacionadas ao prognóstico desfavorável, especialmente quando estão associadas à amplificação do gene *MDM2* (Muret *et al.*, 2008). Elas contribuem para a promoção de metástases, uma vez que estão relacionadas à perda do controle do ciclo celular, ao aumento da angiogênese, da invasividade e da quimioresistência (Das *et al.*, 2007).

Hieken *et al.*, 1993, foram os primeiros a sugerir que a expressão de p53 mutante é um marcador de sobrevida diminuída em pacientes adultos com SPM bem diferenciados de grau I. O estudo de Das *et al.*, 2007, foi o primeiro a identificar mutações no éxon 4 de TP53 em amostras tumorais de SPM. Por meio de técnicas de seqüenciamento direto e de imuno-histoquímica, os autores não conseguiram correlacionar os achados entre as duas técnicas. A presença de mutações foi observada ao longo de toda região codificadora do gene. Entretanto, 40% delas se concentravam entre os resíduos 63-96,

correspondentes ao éxon 4 de TP53. Este foi o primeiro relato de mutações nessa região do gene TP53 em SPM e tais alterações conferiram aos pacientes incluídos no estudo um decréscimo nas taxas de sobrevivência, quando comparados aos tumores que abrigavam o TP53 selvagem. Esta alta taxa de mutações encontrada no éxon 4 sugere que o mesmo possa ser uma região propensa a mutações em SPM, especialmente no sarcoma sinovial, mas esta é uma observação que necessita ser validada em um maior número de casos.

Em relação à terapia dos SPM, algumas modalidades de tratamento quimioterápico induzem a morte celular através da ativação de TP53 após danos ao DNA. A proteína p53 mutada é capaz de inibir essa ativação, podendo explicar a resistência dos sarcomas ao tratamento administrado e também se correlaciona com respostas histopatológicas insatisfatórias. Os achados da literatura indicam que o *status* da p53 pode ser determinante na eficácia dos protocolos de tratamento baseados no uso de indutores apoptóticos (Muret *et al.*, 2008).

Neste contexto, a introdução da p53 selvagem pode ser um componente essencial na promoção da morte celular dinâmica, podendo auxiliar no desenvolvimento de terapias baseadas em mecanismos citotóxicos, com o objetivo de se estabelecer um tratamento mais efetivo. Assim, pacientes portadores da p53 mutada poderiam se beneficiar de um tratamento mais agressivo, incluindo radioterapia pós-operatória, combinada ou não à quimioterapia (Muret *et al.*, 2008).

## **9 – O polimorfismo de TP53**

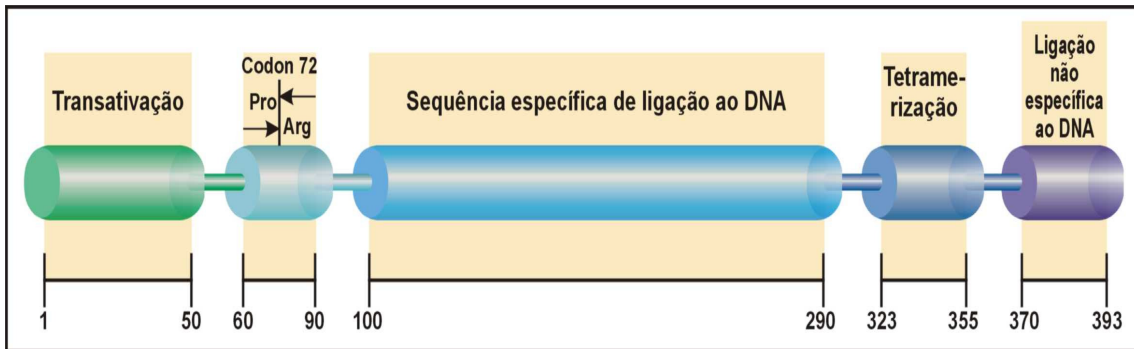
### **9.1 – O polimorfismo Arg/Pro no códon 72 de TP53**

Os polimorfismos genéticos de nucleotídeos únicos (SNP = *single nucleotide polymorphism*) são variações na seqüência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e que estão associados com alterações de apenas uma base nitrogenada. A freqüência dos polimorfismos genéticos de nucleotídeos únicos ocorre em mais de 1% da população (Lima *et al.*, 2006; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Após a

conclusão do projeto genoma, mais de dez milhões de SNPs foram identificados (Bojesen & Nordestgaard, 2008). Algumas das alterações polimórficas ocorrem em seqüências não codificantes do gene, e na maioria dos casos, não afetam suas funções. Outras alterações ocorrem em seqüências codificantes, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos, os SNPs podem afetar a suscetibilidade ao câncer (Lima J *et al.*, 2006).

O gene TP53 apresenta mais de 14 polimorfismos diferentes (Gallo *et al.*, 2005; Oliveira, 2005), cujas seqüências nucleotídicas foram descritas e estão depositadas no banco de dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC – *International Agency Research on Cancer*) em Lyon, França (Petitjean *et al.*, 2007b).

Além das mutações, o polimorfismo do códon 72 do gene supressor de tumor TP53 tem sido investigado extensivamente. Este polimorfismo causa impacto na seqüência codificante do gene, além de se associar a um maior risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Gallo *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 2006). O polimorfismo acarreta mudança na seqüência de aminoácidos da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 (Figura 5) (Silva, 2003). O códon 72 do éxon 4 pode codificar um aminoácido arginina (p53Arg) ou uma prolina (p53Pro) (Storey *et al.*, 1998; Sourvinos *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2002; Lattuada *et al.*, 2004; Cortezzi *et al.*, 2004; Oliveira, 2005; Ribeiro Jr & Safatle-Ribeiro, 2006). A simples substituição de uma base no códon resulta em alteração estrutural da proteína p53 (Cavalcanti Jr. *et al.*, 2002; Lattuada *et al.*, 2004; Oliveira, 2005; Lima J *et al.*, 2006). A segunda base do códon 72 sofre um processo de transversão, que consiste na substituição de uma base púrica (G) por uma base pirimídica (C), gerando assim os dois códons diferentes: um CCC que codifica prolina e outro CGC que codifica arginina. De modo geral, as transversões têm origem nos erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA. Em outros casos, são causadas por lesões no DNA ocasionadas por agentes ambientais (Guimarães & Costa, 2002; Oliveira, 2005).



**Figura 5.** Modelo esquemático do gene *p53*, indicando os domínios funcionais da proteína. A localização do polimorfismo é indicada no códon 72, mostrando a posição dos aminoácidos prolina (Pro) e arginina (Arg) [Silva, 2003]

Os dois alelos selvagens, *p53Arg* e *p53Pro*, geram três genótipos diferentes nas populações humanas: dois homocigotos para *p53ArgArg* e *p53ProPro*, e um heterocigoto para *p53ArgPro*.

O polimorfismo do códon 72 ocorre em um domínio protéico rico em resíduos de prolina (aminoácidos 64 a 92). Essa região é necessária para a atividade de supressão do crescimento celular, desempenhando um papel importante na apoptose mediada por *p53*, mas não no bloqueio do ciclo celular (Thomas *et al.*, 1999; Siddique *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2007). Por este motivo, é de grande importância verificar o papel deste polimorfismo na atividade da proteína *p53*.

#### **a) Polimorfismo de TP53 e distribuição geográfica de suas variantes**

As freqüências alélicas de *p53Arg* e *p53Pro* variam etno-geograficamente e esta observação sugere que os dois alelos podem sofrer pressão seletiva nas diferentes populações étnicas, o que pode ser consequência de uma adaptação ecológica (Fett-Conte & Salles, 2002; Oliveira, 2005; Siddique *et al.*, 2005; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Acredita-se que o alelo *p53Pro* seja o mais antigo (Bojesen & Nordestgaard, 2008). Sua freqüência é de aproximadamente 60-70% em afro-descendentes, mas de apenas 10-35% em caucasianos. A freqüência deste alelo aumenta de maneira linear à medida que as populações se aproximam da linha equatorial. Essa característica levou à hipótese de que a alta exposição à luz UV resultou na

seleção do alelo p53Pro, sugerindo que este seja um alelo protetor mais eficiente contra doenças induzidas pela exposição à luz solar (Dumont *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2006; Murphy, 2006; Bojesen & Nordestgaard, 2008). A frequência do alelo p53Arg no códon 72 da população caucasiana em geral é de aproximadamente 70% (Donehower *et al.*, 2005).

Até o ano de 2005, oito estudos relacionados ao SNP do códon 72 de TP53 foram relatados na América Latina. Todos eles foram feitos utilizando-se a técnica de PCR e o alelo p53Arg foi descrito como o mais comum em todas as populações, exceto em uma análise peruana, na qual o alelo p53Pro foi o mais freqüente. Algumas pesquisas também já foram conduzidas com o objetivo de relacionar os diversos polimorfismos de TP53 como marcador para compreender a distribuição populacional na América Latina (Gallo *et al.*, 2005).

#### **b) Polimorfismo de TP53 e diferenças funcionais das variantes**

Diversos estudos demonstram que as variantes p53Arg e p53Pro apresentam diferenças funcionais significativas (Storey *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999; Sourvinos *et al.*, 2001; Dumont *et al.*, 2003; van Heemst *et al.*, 2005; Oliveira, 2005; Siddique *et al.*, 2006; Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Todos esses autores concordam que o polimorfismo do códon 72 altera a conformação da proteína p53, afetando suas propriedades bioquímicas, biológicas e funcionais (Lattuada *et al.*, 2004). A troca do aminoácido na posição 72 resulta em uma alteração estrutural da proteína, uma vez que a variante p53Pro migra mais lentamente do que a variante p53Arg no gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês, *Sodium Duodecil Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Bojesen & Nordestgaard, 2008).

Está comprovado que a variante p53Arg é a mais eficiente na indução da apoptose, enquanto que a variante p53Pro induz o bloqueio do ciclo celular em G1 e a ativação de mecanismos de reparo p53-dependentes de forma mais eficaz (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Siddique *et al.*, 2006; Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Alguns estudos revelaram que a variante p53Arg movimenta-se mais intensamente para a mitocôndria, induzindo a liberação do citocromo *c* e desencadeamento da apoptose

(Murphy, 2006; Siddique *et al.*, 2006). O papel de p53Arg na indução de apoptose se correlaciona com uma melhor capacidade de p53 interagir com MDM2, o que facilita sua exportação nuclear e sua localização mitocondrial (Ørsted *et al.*, 2007; Petitjean *et al.*, 2007b).

A afinidade de ligação a MDM2 é três a quatro vezes maior para a proteína p53 que contém o alelo p53Arg do que a que contém p53Pro, levando a um maior aumento da exportação nuclear desta variante (Murphy, 2006). Polimorfismos no gene MDM2 também podem influenciar na capacidade apoptótica das células. O produto do gene AKT1 é uma quinase anti-apoptótica e um dos seus substratos é a proteína MDM2. A fosforilação de MDM2 por AKT1 inibe sua ubiquitinação, estabilizando-a. Essa fosforilação também promove o movimento de MDM2 para dentro do núcleo no qual ela pode agir, desestabilizar a proteína p53 e reduzir a apoptose. Portanto, AKT1 pode agir em epistasia com MDM2, controlando os níveis de sua proteína (Harris *et al.*, 2005).

Os membros da família ASPP (*apoptosis-stimulating protein of p53*) ligam-se ao domínio rico em prolina de p53, região que abriga o SNP do códon 72. ASPP1 e ASPP2 são ativadores de p53, enquanto que iASPP funciona como inibidor dessa proteína, ligando-se e regulando a atividade da variante p53Pro mais eficientemente do que da p53Arg. Portanto, o escape à regulação negativa por iASPP é um novo mecanismo identificado pelo qual p53Arg ativa apoptose de forma mais eficiente que p53Pro (Bergamaschi *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que a variante p53Pro induz o bloqueio do ciclo celular mais satisfatoriamente do que p53Arg. Os dados indicam que essas variantes polimórficas podem ter evoluído para regularem seletivamente funções celulares específicas. Os mecanismos de reparo do DNA são essenciais para a prevenção do acúmulo de instabilidade genômica e, portanto, para a formação do câncer. Está comprovado que p53Pro ativa a transcrição de vários genes-alvo envolvidos no reparo do DNA de maneira mais eficiente que p53Arg (Siddique *et al.*, 2006).

Outros polimorfismos de TP53 foram identificados em populações humanas, muitos deles localizados em íntrons, fora das regiões de *splicing* de consenso. O polimorfismo do códon 72 tem as suas freqüências alélicas influenciadas por diferenças étnicas. Muitos estudos investigaram as

associações do SNP do códon 72 de TP53 com o risco elevado para inúmeros cânceres, mas as associações que foram encontradas em alguns destes estudos tornam-se um desafio para os estudos subseqüentes (Sourvinos *et al.*, 2001; Lattuada *et al.*, 2004; Gallo *et al.*, 2005; Bojesen & Nordestgaard, 2008). A heterogeneidade da resposta de p53 também pode ser devida às variações genéticas nos promotores dos seus genes responsivos. Alguns grupos identificaram aproximadamente 40 SNPs nesses elementos funcionais que possuem impacto significativo na atividade transcricional de p53 (Murphy, 2006).

### **c) Polimorfismo de TP53 e longevidade**

Van Heemst *et al.*, 2005, demonstraram que o polimorfismo do códon 72 de TP53 influencia na longevidade. Este grupo realizou um estudo prospectivo nos habitantes de Leiden, Holanda, com 1.226 indivíduos com idades acima de 85 anos. O SNP do códon 72 foi analisado e a causa específica de morte foi relatada posteriormente. A mortalidade por câncer foi maior nos indivíduos homocigotos para p53Pro, comparada aos homocigotos para p53Arg (29 *versus* 14%, respectivamente). Essa diferença significativa é consistente com o potencial apoptótico aumentado da variante p53Arg. O mais interessante, contudo, é que o mesmo estudo indicou que os indivíduos homocigotos para p53Pro tiveram um aumento relativo na sobrevivência, quando comparados aos homocigotos para p53Arg. A morte por eventos não relacionados ao câncer ocorreu em 21% dos indivíduos p53Arg/Arg, mas em apenas 6% dos p53Pro/Pro. Isso indica que p53Arg diminui o risco para o desenvolvimento de câncer, mas também reduz a expectativa de vida. Os autores concluíram que o genótipo p53Pro/Pro confere um benefício significativo para a expectativa de vida que supera os efeitos deletérios de uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer.

Donehower *et al.*, 2005, especulam que o aumento da atividade global da proteína p53 inibe a renovação do tecido e a função das “stem cells”, resultando em um órgão com número de células e função reduzidas, acompanhado de atrofia. O TP53 regula o processo de envelhecimento dos mamíferos independente do seu papel na supressão do câncer, podendo

influenciar na longevidade. A alteração dessas funções pode estar relacionada ao melhor poder apoptótico conferido pelo alelo p53Arg.

Os estudos de Ørsted *et al.*, 2007, e Bojesen & Nordestgaard, 2008, são complementares e também apresentam resultados semelhantes ao de van Heemst, porém em um grupo amostral consideravelmente maior, mais de 9.000 participantes. Segundo esse grupo, a ativação das vias de p53, principalmente da variante p53Arg, é benéfica quando o organismo é jovem, protegendo contra o câncer, mas em organismos mais velhos ela pode reduzir a expectativa de vida e até aumentar o risco para o desenvolvimento de neoplasias, a chamada pleiotropia antagonista (Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Esse termo é atribuído a genes que possuem papéis benéficos quando a pressão seletiva é grande (durante os anos reprodutivos, por exemplo), mas que apresentam efeitos deletérios na ausência de seleção (após os anos reprodutivos). De acordo com esse conceito, p53 acelera o envelhecimento à medida que responde ao estresse celular, indicando que sua expressão influencia os processos degenerativos em todo o organismo.

Segundo esse grupo, a expressão do alelo p53Pro reduz a mortalidade, podendo resultar no decréscimo do processo de envelhecimento causado pela diminuição das atividades pró-apoptóticas e aumento do bloqueio do ciclo celular e dos mecanismos de reparo induzidos por p53. O fato dos genótipos p53Arg/Pro e p53Pro/Pro se associarem à maior expectativa de vida pode ser explicado por um melhor prognóstico após o diagnóstico de câncer ou de outras doenças graves, melhorando a sobrevida em cinco anos. Essa característica sugere que p53Pro é uma variante genética de ganho de função importante. Entretanto, os resultados encontrados de que não existe associação entre os genótipos p53Arg/Pro e p53Pro/Pro e o risco para o desenvolvimento do câncer sugerem que o polimorfismo do códon 72 não está associado à predisposição para o desenvolvimento de neoplasias (Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen & Nordestgaard, 2008).



#### **d) Polimorfismo de TP53 e predisposição aos diferentes tipos de câncer**

A análise do polimorfismo do códon 72 de TP53 foi realizada em vários tipos de neoplasias, algumas das quais incluem o câncer colorretal (Lima J *et al.*, 2006), hepatocelular (Zhu *et al.*, 2005), de mama (Bonafé *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Toyama *et al.*, 2007), de cabeça e pescoço (Sourvinos *et al.*, 2001; Cortezzi *et al.*, 2004), de colo uterino (Bhattacharya *et al.*, 2002; Brenna *et al.*, 2004) e a leucemia mielóide crônica (Hamú *et al.*, 2007). Estes resultados são conflitantes e sugerem que os alelos p53Arg/Pro desenvolvem papéis diferentes nos mais variados tipos de câncer (Cortezzi *et al.*, 2004). Assim, estudos com este polimorfismo estão deixando o campo da susceptibilidade ao câncer e adentrando o campo do significado prognóstico da doença já que as variantes p53Arg e p53Pro possuem cinéticas apoptóticas diferenciadas e dependentes do tipo e da localização do tumor (Siddique *et al.*, 2005).

Bonafé *et al.*, 2003, avaliaram o polimorfismo do códon 72 de TP53 em 67 mulheres afetadas por câncer de mama que se submeteram à ressecção cirúrgica. Este estudo levou à conclusão de que a retenção do alelo p53Arg nas pacientes heterozigotas está associada a uma redução na sobrevida global e no intervalo livre de doença. Entretanto, Xu *et al.*, 2005, e Toyama *et al.*, 2007, concluíram que as mulheres com câncer de mama portadoras da variante p53Pro/Pro são menos sensíveis às terapias adjuvante e neoadjuvante do que as portadoras dos genótipos p53Arg/Pro e p53Arg/Arg. Esses autores também avaliaram o comprometimento linfonodal relacionado à genotipagem do códon 72, encontrando uma porcentagem maior de linfonodos positivos nas pacientes portadoras do alelo p53Pro. Toyama *et al.*, 2007, considera o genótipo p53Pro/Pro como um fator prognóstico independente em mulheres com câncer de mama. A melhor resposta ao tratamento em indivíduos portadores do alelo p53Arg pode ser relacionada ao seu potencial apoptótico mais acentuado.

Storey *et al.*, 1998, verificaram que a oncoproteína E6 do HPV-18 possui a capacidade de degradar p53 via ubiquitinação e que a variante p53Arg é mais suscetível a essa degradação. De acordo com esses autores, os indivíduos p53Arg/Arg eram 7 vezes mais propensos ao desenvolvimento de câncer cervical associado ao HPV do que os portadores do genótipo

homozigoto p53Pro/Pro. Entretanto, um estudo posterior (Bhattacharya *et al.*, 2002) não revelou uma associação significativa entre o genótipo p53Arg/Arg e o desenvolvimento de câncer cervical, mas demonstrou que p53Pro/Pro está relacionado ao risco mais elevado para essa neoplasia.

Uma pesquisa conduzida por Brenna *et al.*, 2004, em mulheres brasileiras HPV-positivas portadoras de câncer cervical chegou à conclusão de que o polimorfismo de TP53 é um fator de risco determinante para o carcinoma cervical. Contudo, essa condição não parece ser suficiente para induzir a carcinogênese cervical ou para determinar a progressão da doença.

A meta-análise realizada por Koushik *et al.*, 2004, concluiu que, apesar da forte associação entre a homozigosidade para p53Arg e o risco para o desenvolvimento de câncer cervical, poucos estudos subseqüentes ao de Storey confirmaram seus resultados. A associação entre o polimorfismo do códon 72 de TP53 e a neoplasia cervical foi divergente nos estudos analisados de acordo com a etnia das populações.

Sousa *et al.*, 2007, também conduziram uma meta-análise sobre os estudos realizados em populações européias a fim de resumir o risco global para esse polimorfismo, considerando a influência da localização geográfica/étnica como um fator importante na definição do perfil genético e da suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, o genótipo p53Arg/Arg parece não representar um marcador de risco para o câncer cervical na maioria dos artigos analisados.

Lima JM *et al.*, 2006, observaram maior prevalência do genótipo p53Arg/Arg em indivíduos portadores de câncer colorretal, mas não o associaram com maior risco de desenvolvimento dessa neoplasia na população estudada. Contudo, Sourvinos *et al.*, 2001, demonstraram que os indivíduos homozigotos para p53Arg têm maior predisposição para desenvolver tumores da laringe, predispondo-os às lesões pré-malignas, além da progressão do tumor para a malignidade.

A homozigose para p53Pro foi sugerida como fator de suscetibilidade em carcinomas hepatocelulares (Zhu *et al.*, 2005). Uma análise interessante foi realizada por Nelson *et al.*, 2005, que investigou a combinação de mutações e polimorfismos do códon 72 de TP53, associando-as com estádios da doença e a sobrevida, em câncer de pulmão. A variante p53Pro mutada foi indicativa de

sobrevida pobre, especialmente após a progressão da doença. O genótipo p53Pro/Pro também foi associado a um risco mais elevado para o câncer gástrico em geral, especialmente para as neoplasias gástricas mais precoces (Yi & Lee, 2006).

O polimorfismo de MDM2 foi associado ao polimorfismo do códon 72 de TP53 em portadores da síndrome de Li-Fraumeni (Bougeard *et al.*, 2006). Como a variante p53Arg possui maior afinidade a MDM2, os autores sugeriram que o polimorfismo p53Arg/Pro poderia influenciar na idade de manifestação da síndrome e chegaram à conclusão de que os portadores do alelo p53Arg, juntamente com a alteração de MDM2, manifestam as características da síndrome mais precocemente.

Vogan *et al.*, 1993, seqüenciaram o gene TP53 em neuroblastomas, observando a presença do polimorfismo do códon 72 neste gene, mas não o associaram ao desenvolvimento dessas neoplasias. O primeiro estudo a avaliar o SNP de TP53 em gliomas e meningiomas foi realizado por Malmer *et al.*, 2005, que não observaram associações entre um alelo específico e o risco para o desenvolvimento desses tumores cerebrais.

O papel deste polimorfismo nos cânceres humanos permanece controverso. Enquanto alguns estudos apontam a homozigose para p53Pro no códon 72 como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, outros trabalhos não conseguem identificar uma diferença expressiva para a suscetibilidade ao câncer entre as formas polimórficas p53Arg e p53Pro. Além do mais, a resposta das células tumorais à quimioterapia parece ser menos favorável em cânceres que contenham a variante p53Pro, resultando na redução da sobrevida e em um pior prognóstico após o tratamento (Donehower *et al.*, 2005), o que pode ser explicado pelo seu fraco potencial apoptótico (Murphy, 2006).

#### **e) Polimorfismo de TP53 e prognóstico dos diferentes tipos de câncer**

O polimorfismo do códon 72 de TP53 pode alterar a sensibilidade dos tumores aos agentes quimioterápicos. Tumores homozigotos p53Arg/Arg podem responder mais favoravelmente à radiação e à quimioterapia (Dumont

*et al.*, 2003). Um estudo demonstrou que a atividade indutora de apoptose *in vitro* para o alelo p53Arg é superior à atividade do alelo p53Pro e que essa atividade se correlaciona a uma indução mais eficiente de genes específicos associados à apoptose. Quando a análise foi realizada em carcinomas de células escamosas, *in vivo*, os resultados da quimioterapia e da radioterapia foram mais favoráveis em tumores que abrigavam o alelo p53Arg. Pacientes portadores dessa variante possuíram maiores taxas de resposta às terapias administradas e uma sobrevida mais favorável, quando comparados aos portadores do alelo p53Pro. Juntos, esses resultados revelaram que o SNP do códon 72 do gene TP53 é um fator determinante da resposta aos agentes anti-tumorais (Sullivan *et al.*, 2004). O alelo p53Arg aumenta a habilidade de p53 se deslocar para o citoplasma e, posteriormente, para a mitocôndria, promovendo a liberação de agentes pró-apoptóticos nesta organela (Jin *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 2006; Ørsted *et al.*, 2007). Agentes terapêuticos que aumentam a exportação nuclear da proteína p53 podem ser mais eficientes em tumores portadores do alelo p53Arg (Dumont *et al.*, 2003).

Como já abordado, a variante p53Pro é mais eficaz na ativação dos mecanismos de reparo após danos ao DNA (Siddique *et al.*, 2006). Entretanto, as estratégias para o tratamento do câncer se fundamentam em induzir a morte das células tumorais (Grivicich *et al.*, 2007) e, dessa maneira, a presença de uma isoforma mais eficiente na indução da apoptose (p53Arg) se correlaciona diretamente a um prognóstico mais favorável em inúmeras neoplasias (Toyama *et al.*, 2007).

## **10 – O polimorfismo de p53 em SPM**

Por apresentar propriedades bioquímicas e biológicas diferenciadas, vários estudos foram conduzidos na tentativa de associar o polimorfismo do códon 72 de TP53 como fator de risco e fator preditivo no prognóstico de inúmeras neoplasias (Cavalcanti Jr. *et al.*, 2002; Oliveira; 2005; Lima *et al.*, 2006). A associação entre as alterações de TP53 e o grau do tumor indica que o grau pode ser reflexo da instabilidade genética dos SPM (Ferreira & Lopes,

1999). A instabilidade genética é decorrente do acúmulo de mutações gênicas por defeitos no reparo do DNA e/ou por instabilidade cromossômica e está relacionada a deficiências nos pontos de checagem (*checkpoints*) relacionadas à proteína p53. Dessa maneira, alterações funcionais de p53 podem influenciar na estabilidade genômica, uma vez que são capazes de interferir nos mecanismos de parada do ciclo celular, de reparo e de apoptose (Dumont *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2006). Como a proteína p53 se liga ao local danificado do DNA, bloqueando o ciclo celular nas fases G (G1 e/ou G2) e ativando mecanismos de reparo do DNA ou de apoptose (Sutcliffe & Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Gallo *et al.*, 2005; Lima JM *et al.*, 2006), a presença de uma variante polimórfica mais eficiente no reparo do DNA (p53Pro) e/ou nos mecanismos que desencadeiam a apoptose pode conferir às células maior estabilidade em relação aos diversos agentes genotóxicos que conferem instabilidade genética (Dumont *et al.*, 2003). Entretanto, a literatura não relata nenhum estudo que investigue o polimorfismo do códon 72 de TP53 em sarcomas de partes moles. Existem associações deste polimorfismo a tipos histológicos isolados de SPM (Bastian *et al.*, 1999), contudo, nenhuma pesquisa mais abrangente sobre o assunto foi relatada. Assim, é importante avaliar o polimorfismo de TP53 e associá-lo a cada tipo de tumor para fins prognósticos e de avaliação do tratamento.

# Justificativas

---

O presente projeto se justifica pelas seguintes observações:

- 1) A associação do polimorfismo de TP53 no códon 72 tem sido documentada como fator de risco para diversos tipos de câncer, assim como fator prognóstico da doença (Sourvinos *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2002; Bonafé *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Lima J *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2007).
- 2) As mutações do gene TP53 são consideradas as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 17% nos sarcomas de partes moles (Simpson, 1999; Ferreira & Lopes, 1999; Balmaña *et al.*, 2002; Borden *et al.*, 2003; Achatz *et al.*, 2007; Kudawara *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008).
- 3) Nos pacientes com sarcomas de partes moles, as alterações de TP53 se associam com a agressividade do tumor, o prognóstico desfavorável e a redução na sobrevida (Dirix *et al.*, 1999; Alava *et al.*, 2000; Borden *et al.*, 2003; Sabah *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008).
- 4) Até a presente data, não foi encontrado no banco de dados MedLine, nenhum estudo associando o polimorfismo do códon 72 do gene TP53 na suscetibilidade e no prognóstico dos sarcomas de partes moles, justificando a realização do presente estudo.

# OBJETIVOS

---

## **1- Objetivo Geral:**

Avaliar o polimorfismo p53Arg/Pro no códon 72 do gene TP53 como potencial fator prognóstico em 100 casos de SPM, em adultos atendidos no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

## **2- Objetivos Específicos:**

- 1) Determinar as freqüências gênicas e genotípicas do polimorfismo do gene TP53 no códon 72 (Arginina - Arg e Prolina - Pro), utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em um grupo de pacientes adultos diagnosticados com sarcomas de partes moles no Hospital Araújo Jorge.
- 2) Determinar a sobrevida global em cinco anos dos pacientes portadores dos genótipos homozigotos e heterozigotos.
- 3) Avaliar as possíveis associações entre o polimorfismo de TP53 e os aspectos clinico-patológicos dos pacientes com SPM, incluindo gênero, idade agrupada, tamanho do tumor, estadio clinicopatológico, grau tumoral, presença ou ausência de metastases e sobrevida global em cinco anos.

# METODOLOGIA

---

## **1 – Tipo de Estudo**

Este projeto consiste em um estudo retrospectivo de 100 casos de sarcomas de partes moles diagnosticados histopatologicamente no Setor de Anatomia do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, Goiás. Os casos foram diagnosticados no período de 1996 a 2000 no Departamento de Tecido Conjuntivo do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e apresentavam seguimento mínimo de 60 meses.

## **2- Seleção dos sujeitos da pesquisa**

### **2.1- Critérios de Inclusão**

Os casos de SPM considerados incluíram pacientes com idades superiores a 18 anos e com diagnóstico histopatológico confirmado por revisão de lâminas, realizada por um patologista treinado do Setor de Anatomia Patológica do HAJ, ACCG. Dentre os pacientes inicialmente identificados, 130 tiveram confirmação diagnóstica de SPM e 60 meses de seguimento mínimo. Todos os casos confirmados foram submetidos à extração de DNA, após desparafinização das amostras, para posterior análise molecular do polimorfismo genético de TP53. Conseguimos obter DNA amplificável de 100 casos, mas o material genético de 30 casos não foi viável para análise molecular. O grupo controle foi constituído por amostras de sangue periférico de 85 indivíduos saudáveis selecionados aleatoriamente da população da cidade de Goiânia – GO e região, já incluídos em um estudo anterior realizado no Núcleo de Pesquisas Replicon (Oliveira, 2005). A participação desses indivíduos teve caráter voluntário.

### **3- Critérios de Exclusão**

Foram excluídos casos devido a:



- 1) Perda de blocos de parafina durante alterações realizadas no laboratório de anatomia patológica.
- 2) Casos submetidos a cirurgias em outras instituições e reoperados no HAJ, o que impossibilitou a aquisição dos blocos de parafina para a realização de revisão de lâminas.
- 3) Falta de confirmação histopatológica de SPM após revisão de lâminas.
- 4) Impossibilidade de obtenção de DNA amplificável para a análise molecular.

#### **4- Análise Molecular**

##### **4.1 – Extração de DNA**

As amostras de SPM selecionadas foram obtidas a partir dos blocos de parafina contendo os fragmentos do tecido, previamente fixados em formalina. Os espécimes (0,5 a 2,0 mg de tecido) foram transferidos para microtubos de centrífuga e submetidos à desparafinização, por meio de três lavagens sucessivas em 400 µl de xileno, por 5 minutos cada, a 65 °C e centrifugações a 14.500 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após a desparafinização, o xileno foi retirado por meio de três banhos em etanol absoluto, por 5 minutos à temperatura ambiente. A partir do material desparafinado, as amostras foram submetidas à purificação de DNA genômico para posterior análise molecular do polimorfismo genético de TP53. A extração de DNA do grupo controle foi realizada a partir de sangue periférico heparinizado e centrifugado para a retirada do anel leucocitário. Para a extração de DNA de ambos os grupos, foi utilizado o kit comercial de purificação do DNA genômico *Wizard*® (Promega Corporation, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. Cada amostra de DNA extraído foi submetida a amplificação de um segmento do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) a fim de confirmar a presença de DNA na amostra e a possibilidade de amplificá-lo por PCR.

## 4.2 - Genotipagem do polimorfismo do códon 72 de TP53 pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene TP53, as amostras foram submetidas a duas reações de PCR, utilizando os *primers* para genotipagem dos alelos p53Arg e p53Pro, método proposto por Sourvinos e colaboradores (2001). Esse método utiliza dois conjuntos de *primers* que apresentam temperaturas de anelamento diferentes, conforme apresentado na Tabela III, e que permitem diferenciar as duas variantes polimórficas de acordo com o tamanho do produto amplificado. Entretanto, o protocolo de PCR foi modificado em nosso laboratório, conforme descrito nas tabelas III, IV e V.

**Tabela III** – Protocolo de ciclagem para amplificação dos fragmentos de TP53.

Etapas dos ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	4	1
	94	1	
Amplificação Cíclica	54°C Pro; 60°C Arg	1	35
	70	1	
Extensão Final	70	5	1
Armazenamento	4	∞	∞

**Tabela IV.** Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de p53Arg.

Reagentes / Conc. Inicial	Conc. Final	Vol p/ 1 reação	Vol p/ reações
Tampão 10 x	1X	2,5 µl	Multiplica-se cada volume por reação pelo número de reações + 1 reação
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0 mM	1,0 µl	
dNTP's (2mM, cada)	0,2 mM	2,5 µl	
Taq polimerase	1,0 U	0,2 µl	
Primer 1 (2,5µM)	0,3 µM	3,0 µl	
Primer 2 (2,5µM)	0,3 µM	3,0 µl	
DNA	-	2,0 µl	
H <sub>2</sub> O milli-Q (q.s.p25 µl)	-	10,8 µl	
Volume total	-	25,0 µl	

**Tabela V.** Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de p53Pro.

Reagentes / Conc. inicial	Conc. final	Vol p/ 1 reação	Vol p/ reações
Tampão 10 X	1 X	2,5 uL	
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3,6mM	1,8uL	Multiplica-se
dNTP's (2,5 mM)	0,2mM	2,0uL	cada volume
Primer 1 (50 nM)	1,8nM	0,9uL	por reação pelo
Primer 2 (50 nM)	1,8nM	0,9uL	número de
H <sub>2</sub> O Milli-Q (q.s.p25 μ)	-	14,7uL	reações + 1
Taq polimerase	1 U	0,2 uL	reação
DNA	-	2,0uL	
Volume total	-	25,0 μl	

Para avaliação da qualidade do DNA obtido das amostras parafinadas, foi amplificado um fragmento de 99 pb do gene GAPDH (Gliceraldeído-P-desidrogenase) a partir de cada amostra.

**Tabela VI.** Concentrações e volumes de reagentes usados para amplificação do fragmento de GAPDH.

Reagentes / Conc. Inicial	Conc. Final	Vol p/ 1 reação	Vol p/ reações
Tampão 10 x	1X	2,5 μl	
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0 mM	1,0 μl	
dNTP's (2mM, cada)	0,2 mM	2,5 μl	Multiplica-se cada
Taq polimerase	1,0 U	0,2 μl	volume por reação
Primer 1 (2,5μM)	0,1 μM	1,0 μl	pelo número de
Primer 2 (2,5μM)	0,1 μM	1,0 μl	reações + 1
DNA (100ng)	2ng/μl	1,0 μl	reação
H <sub>2</sub> O milli-Q (q.s.p 50 μl)	-	15,8 μl	
Volume total	25 μl	25,0 μl	

**Tabela VII.** Protocolo de ciclagem para amplificação do fragmento de GAPDH.

<b>Etapas dos ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturação inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturação cíclica	94 °C	30 seg	35
Anelamento	59 °C	60 seg	35
Extensão cíclica	72 °C	60 seg	35
Extensão final	72 °C	7 min	1
Armazenamento	4 °C	∞	---

A seqüência de bases dos *primers* utilizados nas reações de genotipagem do SNP 72 de TP53 e o tamanho dos *amplicons* encontram-se descritos na Tabela VIII.

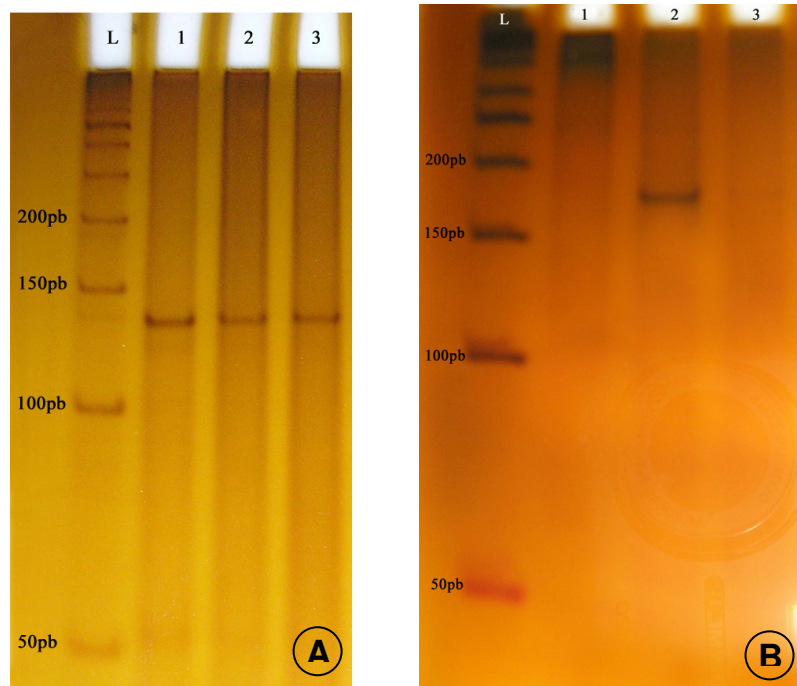
**Tabela VIII.** Seqüência dos primers e tamanho dos amplicons obtidos.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5' → 3')</b>	<b>Produto amplificado (pb)</b>
p53+F/ArgR	TCC CCC TTG CCG TCC CAA CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141
p53Pro+/p53R	GCC AGA GGC TGC TCC CCC CGT GCA AGT CAC AGA CTT	177
GAPDH	5'TTGTCATCAATGGAAATCCCATCA3' 'CAGTGGACTCCACGACGTACTIONCAG3'	99

### 4.3– Análise dos amplicons

Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida não-desnaturante, a 8% (PAGE 8%), em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 3 horas. Como marcador de peso molecular, foi utilizado um DNA ladder de 50pb (0,025µg/µL) aplicado nas raias iniciais do gel. Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi corado pela técnica de nitrato de prata.

A interpretação da eletroforese foi feita da seguinte forma: a presença de uma única banda de 177pb caracterizou um indivíduo homozigoto para *p53Pro*; a presença de uma banda de 144pb caracterizou um indivíduo homozigoto *p53Arg*. A presença de duas bandas, uma de 177pb e outra 144pb, caracterizou um indivíduo heterozigoto *p53ProArg* (Figura 6).



**Figura 6** - Resultados da eletroforese dos produtos de PCR de *p53Arg* (A) e *p53Pro* (B) em PAGE 8% corado por nitrato de prata.

## 5 – Métodos Estatísticos

Os cálculos de medidas de tendência central e o teste do Qui-Quadrado foram realizados para as variáveis relativas aos pacientes e aos aspectos clinicopatológicos. Por meio de uma busca nos prontuários dos pacientes portadores de SPM, utilizou-se a última data de informação do paciente para o cálculo da sobrevivência, empregando o método de Kaplan-Meier, o teste de log rank e, quando necessário, o teste de regressão de Cox para comparação das taxas de sobrevivência. Os dados da genotipagem, tanto dos casos como dos controles, foram calculados com o auxílio do *software GenePop® web version*

3.4. A utilização deste programa permitiu avaliar as frequências alélicas e genotípicas das populações de casos e de controles e a sua diferenciação gênica e genotípica.

## **6- Aspectos Éticos**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEPACCG) e o parecer de aprovação encontra-se no anexo 4 .

# RESULTADOS

**a) Grupo Amostral e aspectos clínico-patológicos:** O grupo amostral foi constituído de 100 pacientes adultos diagnosticados com sarcomas de partes moles no Hospital Araújo Jorge e por 85 indivíduos saudáveis selecionados da população da cidade de Goiânia – GO e região (Oliveira, 2005). Dentre os pacientes, 47% (47/100) eram do sexo masculino e 53% (53/100) do sexo feminino, enquanto que no grupo controle, 63,5% (54/85) dos indivíduos eram do sexo masculino e 36,47% (31/85) do sexo feminino. A média das idades foi de 48,5 e 33,2 anos para casos e controles, respectivamente. A idade dos casos variou de 19 até 83 anos e a maioria dos pacientes eram maiores de 40 anos (Tabela IX).

**Tabela IX** – Distribuição das freqüências absolutas e relativas dos casos de sarcomas de partes moles, em relação ao gênero, faixa etária e idade agrupada.

Característica	Tamanho amostral (n)	Freqüência (%)
<b>Gênero</b>		
Masculino	47	47,0
Feminino	53	53,0
Total	100	100,0
<b>Faixa etária</b>		
18-29	12	12,0
30-39	16	16,0
40-49	26	26,0
50-59	21	21,0
60-69	14	14,0
>70	11	11,0
Total	100	100,0
<b>Idade agrupada</b>		
<40	28	28,0
>40	72	72,0
Total	100	100,0

A localização mais acometida pelos SPM foi membros inferiores (35%), seguida de retroperitônio (18%) e tórax (14%). Os tipos histológicos mais freqüentes foram o fibrossarcoma (29%), o leiomiossarcoma (13%) e o lipossarcoma (11%) (Tabela X).

**Tabela X** - Distribuição das freqüências absolutas e relativas dos casos de sarcomas de partes moles em relação à localização e ao tipo histológico do tumor.

<b>Característica</b>	<b>Tamanho amostral (n)</b>	<b>Freqüência (%)</b>
<b>Localização</b>		
Cabeça e Pescoço	5	5,0
Tórax	14	14,0
Parede abdominal	2	2,0
Retroperitônio	18	18,0
Pelve	2	2,0
Intra-abdominal	11	11,0
Membro Superior	12	12,0
Membro Inferior	35	35,0
Outros	1	1,0
Total	100	100,0
<b>Tipo Histológico</b>		
Fibrossarcoma	29	29,0
Fibrohistiocitoma Maligno	1	1,0
Lipossarcoma	11	11,0
Leiomiossarcoma	13	13,0
Rabdomiossarcoma	3	3,0
Linfangiossarcoma	5	5,0
Sarcoma de Kaposi	5	5,0
Sarcoma Sinovial	1	1,0
Tumor de Origem Neural	6	6,0
Tumor do Estroma Gastrointestinal	1	1,0
Tumor Neuroendócrino Periférico	1	1,0
Sarcoma SOE	19	19,0
Outros	5	5,0
Total	100	100,0



Os tumores maiores que 5 cm foram os mais freqüentes (83%), e, quanto ao grau de anaplasia, predominaram os tumores de alto grau (48%). Em relação ao estadiamento clínico, os tumores com estadio III (34%) foram os mais comuns, seguidos dos estádios II (31%), IV (17%) e I (8%). Um número reduzido de pacientes apresentou comprometimento linfonodal (8%) e metastases à distância (13%) (Tabela XI).

**Tabela XI** – Distribuição das freqüências absolutas e relativas dos casos de sarcomas de partes moles em relação aos aspectos clínico-patológicos.

<b>Característica</b>	<b>Tamanho amostral (n)</b>	<b>Freqüência (%)</b>
<b>Tamanho do Tumor</b>		
< 5 cm	15	15,0
> 5 cm	83	83,0
Não informado	2	2,0
Total	100	100,0
<b>Linfonodos</b>		
Não	91	91,0
Sim	8	8,0
Não informado	1	1,0
Total	100	100,0
<b>Metástase</b>		
Não	83	83,0
Sim	13	13,0
Não Informado	4	4,0
Total	100	100,0
<b>Grau</b>		
Baixo	47	47,0
Alto	48	48,0
Não Informado	5	5,0
Total	100	100,0
<b>Estádio</b>		
I	8	8,0
II	31	31,0
III	34	34,0
IV	17	17,0
Não Informado	10	10,0
Total	100	100,0

**b) Frequências alélicas e genotípicas:** as frequências alélicas de p53Arg e p53Pro foram, respectivamente, de 79,5% (159/200) e 20,5% (41/200) para os pacientes com sarcomas de partes moles, e de 74,1% (126/170) e 25,9% (44/170) para o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências obtidas para os dois grupos estudados ( $p = 0,267$ ) (Tabela XII).

**Tabela XII** – Distribuição das frequências alélicas entre as populações caso e controle.

<b>Alelo</b>	<b>Caso</b>	<b>Controle</b>
p53Arg	79,5% (159)	74,1% (126)
p53Pro	20,5% (41)	25,9% (44)
<b>Total</b>	100% (200)	100% (170)

As frequências genotípicas encontradas para os casos e os controles foram, respectivamente, de 64% (64/100) e 60% (51/85) para homozigotos p53Arg/Arg; de 31% (31/100) e 28,2% (24/85) para heterozigotos p53Arg/Pro; e de 5% (5/100) e 11,8% (10/85) para homozigotos p53Pro/Pro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas obtidas para os dois grupos (caso e controle) ( $p = 0,308$ ) (Tabela XIII).

**Tabela XIII** – Distribuição das frequências genotípicas entre as populações caso e controle.

<b>Genótipos</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
p53Arg/Arg	64% (64/100)	60% (51/85)
p53Arg/Pro	31% (31/100)	28,2% (24/85)
p53Pro/Pro	5% (5/100)	11,8% (10/85)
<b>Total</b>	100% (100)	100% (85)

**c) Possíveis associações entre o polimorfismo de TP53 e os aspectos clínico-patológicos:** o polimorfismo do códon 72 de TP53 foi avaliado em relação aos diferentes aspectos clinicopatológicos dos pacientes com SPM estudados, incluindo gênero, faixa etária, idade agrupada, tamanho do tumor, estadio clínico, grau tumoral e presença ou ausência de metástases

linfonodais e à distância (Tabela XIV). Entretanto, nenhuma associação estatisticamente significativa foi detectada entre os parâmetros analisados. Uma tabela com a distribuição dos casos de SPM em relação aos genótipos e às demais características clínico-patológicas (faixa etária, localização e tipo histológico) está disponível no apêndice 1.

**Tabela XIV** – Distribuição das freqüências absolutas e relativas dos pacientes com sarcomas de partes moles por genótipo em relação aos diferentes aspectos clínico-patológicos.

Fatores	p53Arg/Arg		p53Arg/Pro		p53Pro/Pro		p
	n	%	n	%	n	%	
<b>Gênero</b>							
Masculino	33	51,6	11	35,5	3	60,0	0,283
Feminino	31	48,4	20	64,5	2	40,0	
Total	64	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Idade agrupada</b>							
<40	18	28,1	10	32,3	0	0,0	0,329
>40	46	71,9	21	67,7	5	100,0	
Total	64	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Tamanho do Tumor</b>							
< 5 cm	11	17,7	4	12,9	0	0,0	0,646
> 5 cm	51	82,3	27	87,1	5	100,0	
Total	62	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Linfonodos</b>							
Não	58	92,1	28	90,3	5	100,0	0,76
Sim	5	7,9	3	9,7	0	0,0	
Total	63	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Metástase</b>							
Não	54	90,0	26	83,9	3	60,0	0,149
Sim	6	10,0	5	16,1	2	40,0	
Total	60	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Grau</b>							
Baixo	30	50,8	16	51,6	1	20,0	0,399
Alto	29	49,2	15	48,4	4	80,0	
Total	59	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Estadio</b>							
I	5	9,3	3	9,7	0	0,0	0,579
II	19	35,2	11	35,5	1	20,0	
III	23	42,6	9	29,0	2	40,0	
IV	7	13,0	8	25,8	2	40,0	
Total	54	100,0	31	100,0	5	100,0	

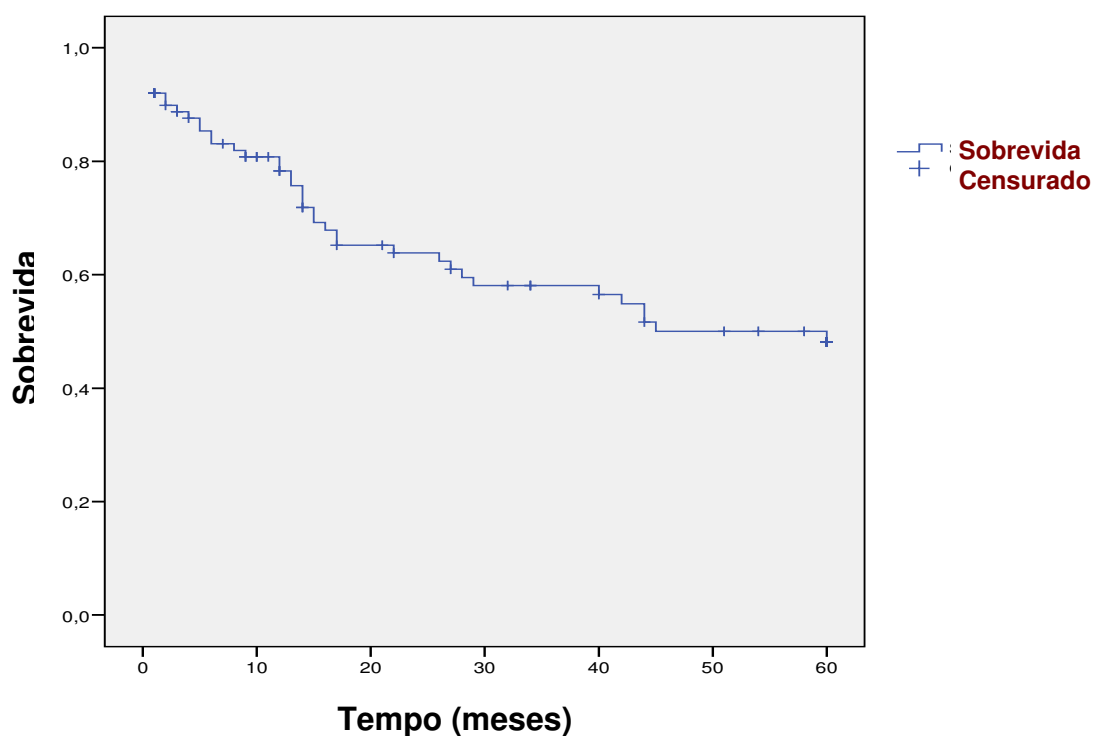
As medidas de tendência central (média, mediana e desvio padrão) foram calculadas para as idades e tamanhos dos tumores avaliados e as possíveis associações com o polimorfismo do códon 72 de TP53 foram

também investigadas. Contudo, nenhuma associação estatisticamente significativa pôde ser demonstrada (Tabela XV).

**Tabela XV** – Possíveis associações entre características clínico-patológicas e os genótipos polimórficos de TP53.

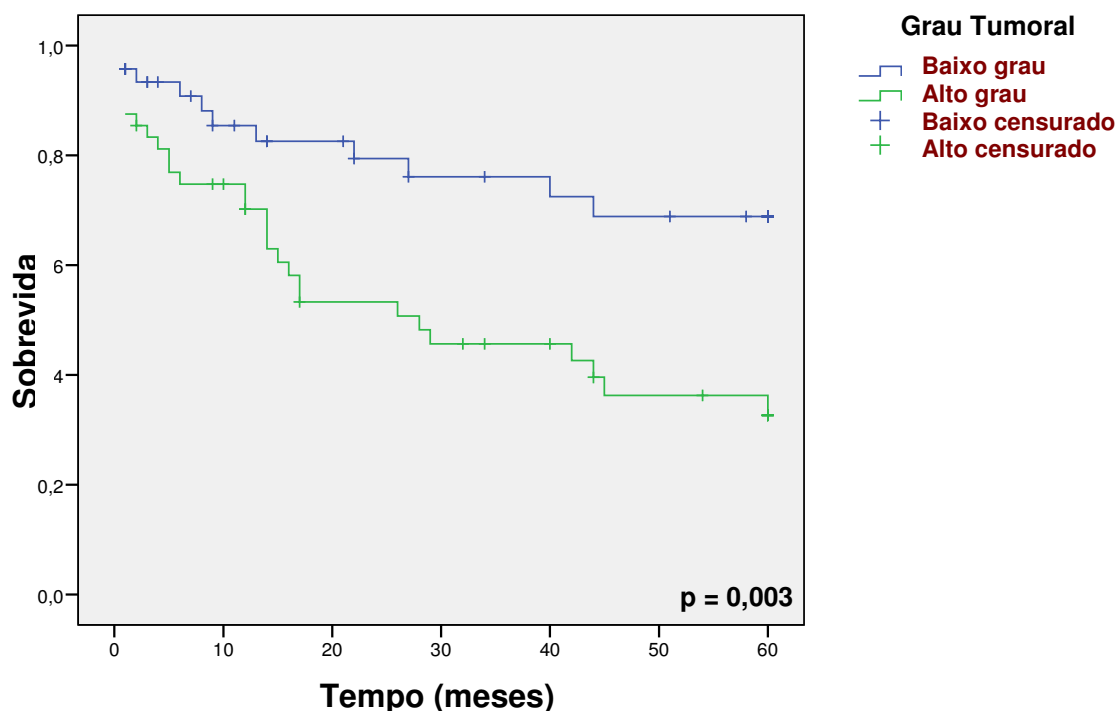
Fator	Média	Mediana	DP	p
<b>Idade</b>				
p53Arg/Arg	50,30	52,50	± 15,69	
p53Arg/Pro	45,10	45,00	± 13,70	0,266
p53Pro/Pro	52,80	50,00	± 6,26	
<b>Tamanho do tumor ao diagnóstico</b>				
p53Arg/Arg	23,96	13,50	± 24,64	
p53Arg/Pro	33,90	31,50	± 30,30	0,561
p53Pro/Pro	18,60	9,00	± 25,93	

**d) Análise de sobrevida:** a sobrevida global em cinco anos, calculada para o grupo de pacientes com SPM, utilizando o método de Kaplan-Meier, foi de 48,1% (Figura 7).



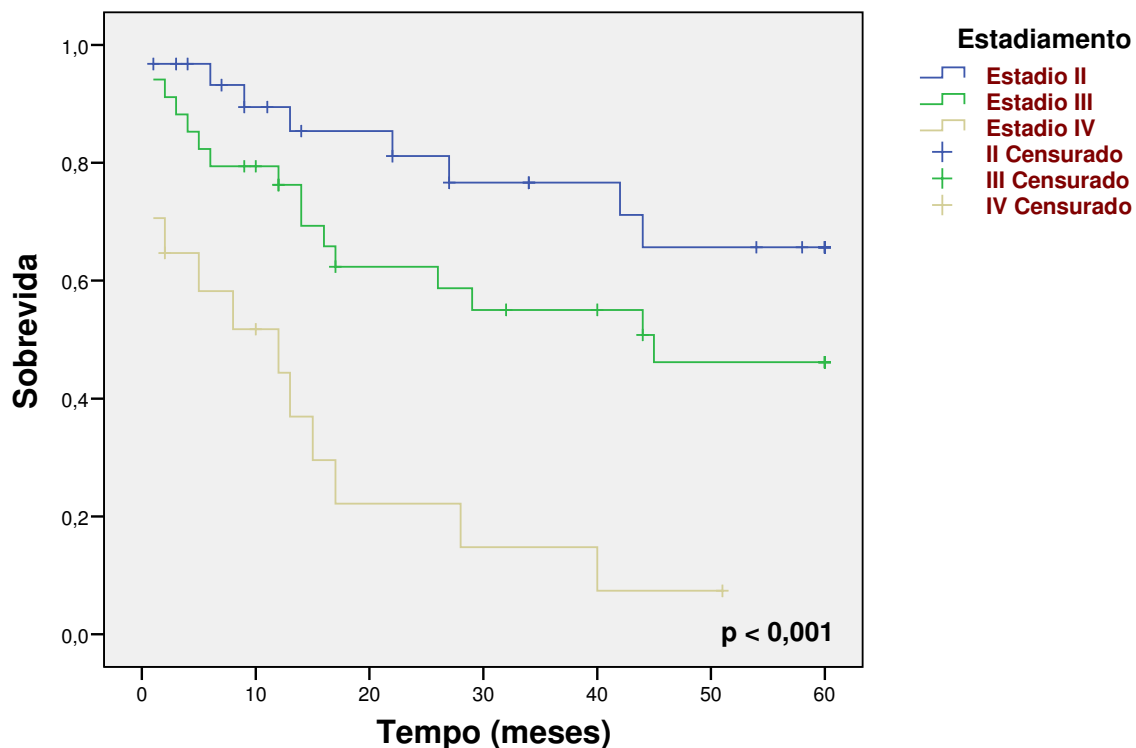
**Figura 7** – Sobrevida global em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles.

O grau tumoral representou um importante fator prognóstico para os pacientes com SPM, ou seja, os pacientes com tumores de baixo grau apresentaram sobrevida significativamente mais alta (68,8%) do que aqueles que apresentavam tumores de alto grau (32,6%) ( $p = 0,003$ ) (Figura 8).



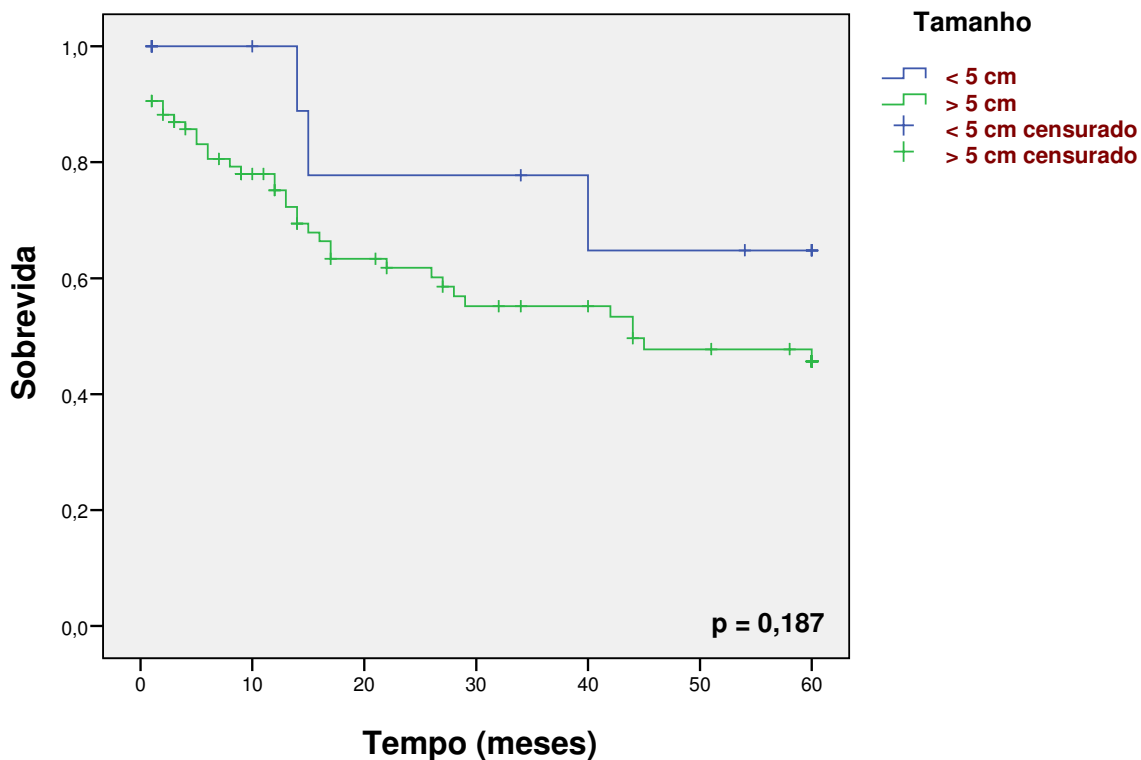
**Figura 8** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao grau histopatológico.

Com relação ao estadiamento clínico, decidiu-se que os pacientes com estadio clínico I fossem censurados, uma vez que não houve óbitos neste grupo durante o período analisado. Pacientes com estadio clínico II apresentaram sobrevida em cinco anos mais elevada (65,7%) que os pacientes com estadios clínicos III (46,2%) e IV (7,4%). O estadiamento clínico representou um fator prognóstico altamente significativo para os pacientes com sarcomas de partes moles, ou seja, quanto mais avançado o estadio, menor a sobrevida ( $p < 0,001$ ) (Figura 9).



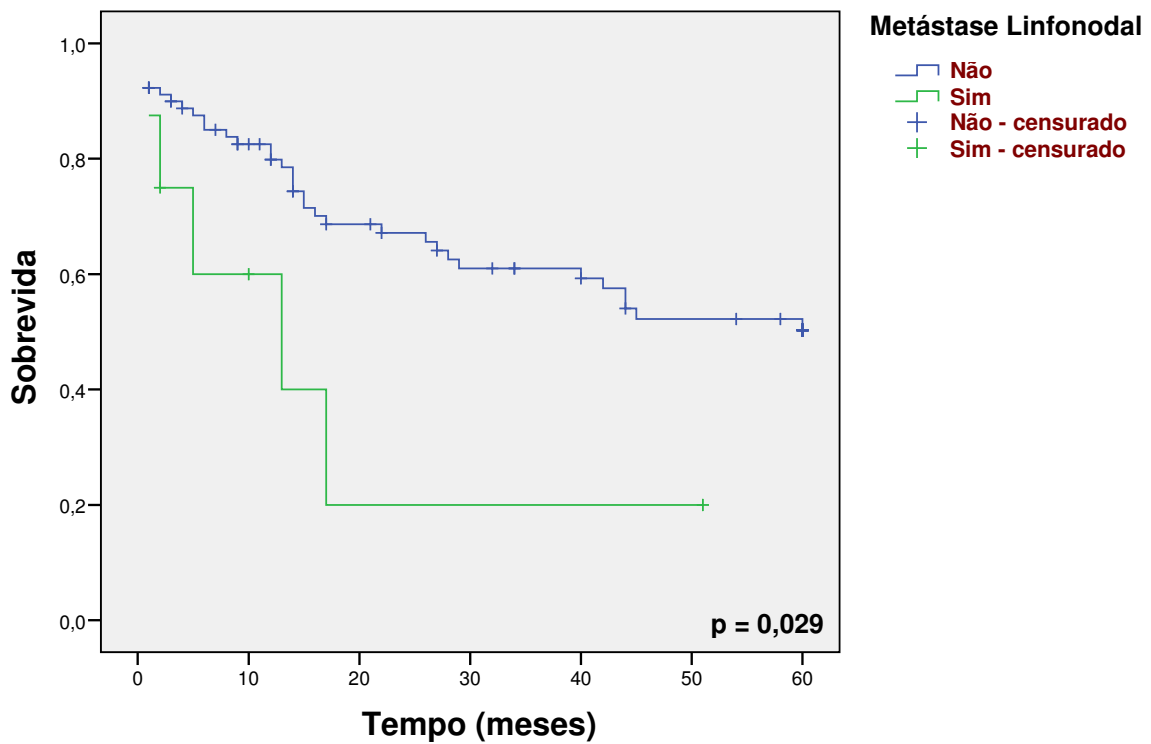
**Figura 9** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao estadio do tumor.

Quando a sobrevivida em cinco anos foi avaliada para os pacientes com relação ao tamanho dos tumores, verificou-se que os pacientes com tumores menores que 5 cm apresentaram sobrevivida mais alta (64,8%), comparados àqueles com tumores maiores que 5 cm (45,7%). Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,187$ ) (Figura 10).

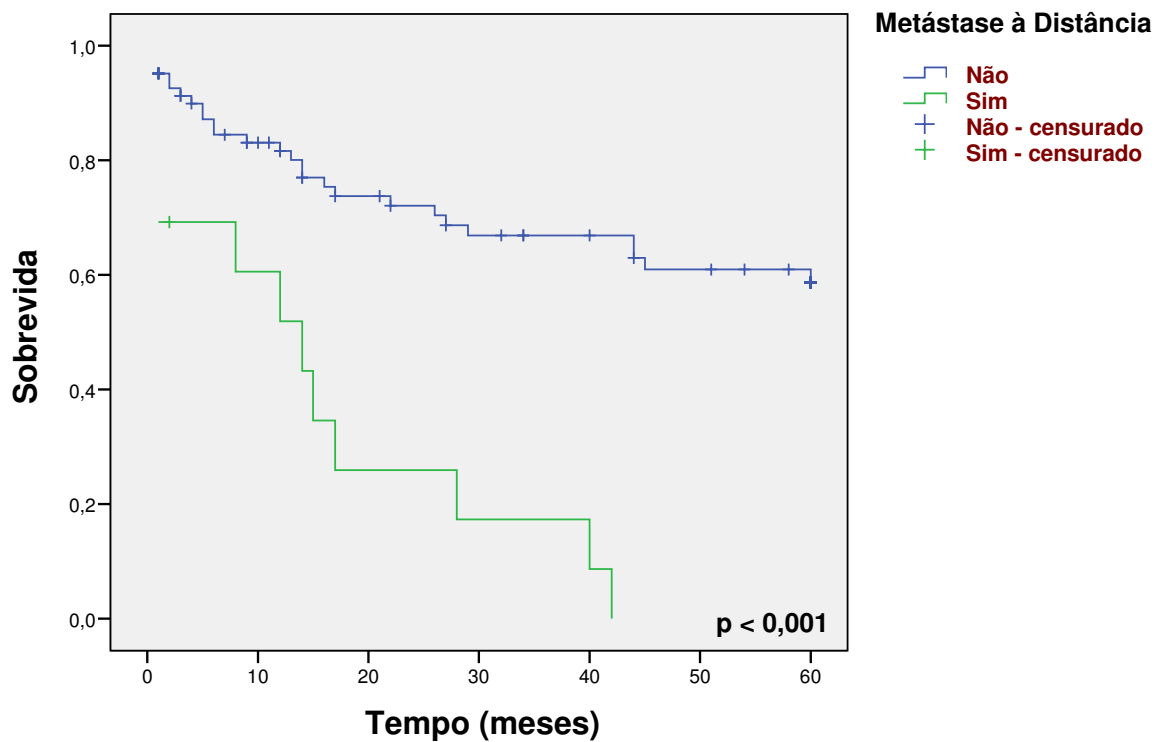


**Figura 10** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação ao tamanho do tumor.

A presença de metástases linfonodais representou um importante fator prognóstico para os pacientes com SPM ( $p = 0,029$ ). A sobrevida em cinco anos, para aqueles que não apresentaram metástases locorregionais, foi de 50,3%, enquanto que os pacientes com metástases linfonodais/locorregionais apresentaram sobrevida de 20% (Figura 11). Do mesmo modo, as metástases à distância influenciaram significativamente a sobrevida do grupo estudado ( $p < 0,001$ ). Ou seja, a sobrevida em cinco anos, para os pacientes que não apresentaram metástase à distância, foi de 58,7%, enquanto todos os pacientes que apresentaram metástases à distância foram a óbito ao final do período de cinco anos de seguimento (Figura 12).



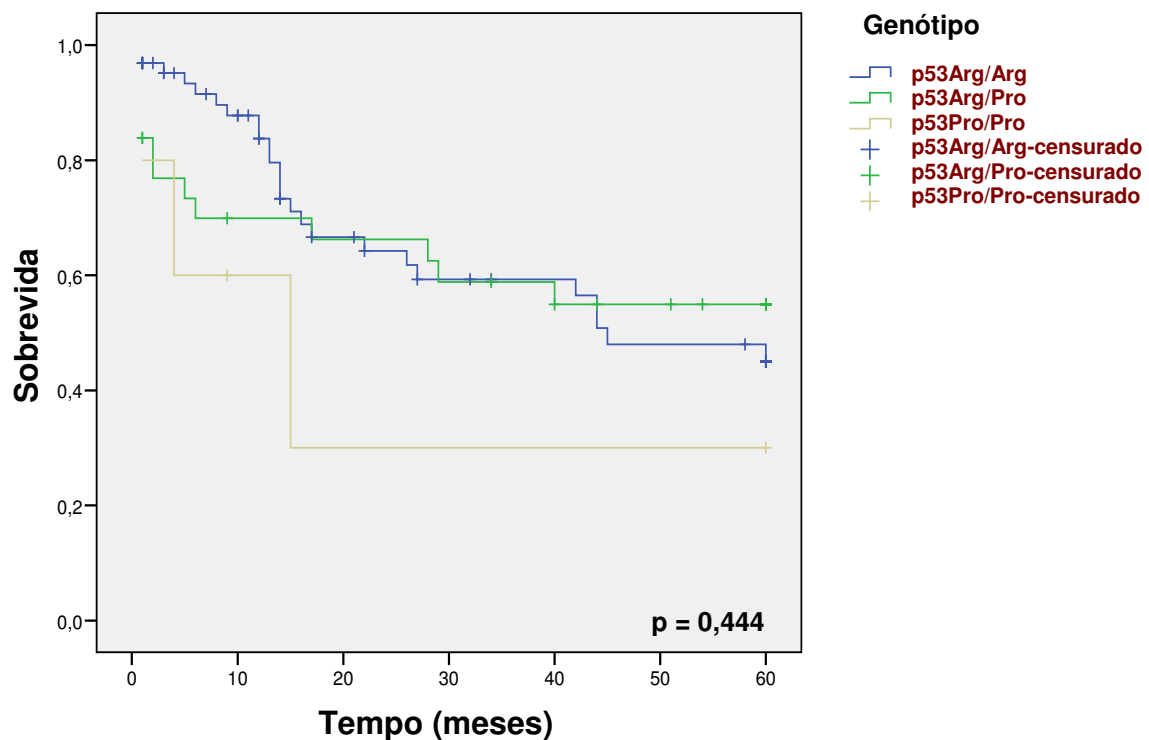
**Figura 11** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação à presença de metástase linfonodal.



**Figura 12** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação à presença de metástase à distância.



O papel prognóstico do polimorfismo do códon 72 de TP53 foi investigado neste estudo e as taxas de sobrevida obtidas para os genótipos p53Arg/Arg e p53Arg/Pro foram de 45% e 54,9%, respectivamente. Os indivíduos portadores do genótipo p53Pro/Pro apresentaram sobrevida em cinco anos mais baixa, com taxa de 30%, entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,444$ ) (Figura 13).



**Figura 13** – Sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles, em relação aos diferentes genótipos analisados (Arg/Arg; Arg/Pro; Pro/Pro).

# DISCUSSÃO

---

Os 100 casos de SPM incluídos neste estudo apresentaram resultados semelhantes aos da literatura com relação às características clínico-patológicas, como gênero, idade, localização, tipo histológico, tamanho do tumor ao diagnóstico, estadiamento clínico, grau tumoral e presença ou ausência de metástases linfonodais e/ou à distância (Hieken *et al.*, 1996; Taubert *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2005; Kotilingam *et al.*, 2006; Sabah *et al.*, 2007; Muret *et al.*, 2008). A média de idade dos indivíduos analisados foi de 48,5 anos e a localização mais freqüente foi a dos membros inferiores (35%). Os três tipos histológicos mais encontrados foram o fibrossarcoma (29%), o leiomiossarcoma (13%) e o lipossarcoma (11%). A maioria dos tumores analisados era maior do que 5 cm, com alto grau de anaplasia, e o estadio III foi o mais freqüente no grupo estudado.

Várias alterações celulares que podem culminar com o desenvolvimento de tumores vêm sendo estudadas em todo o mundo. Inúmeras pesquisas são publicadas anualmente objetivando associar tais modificações à iniciação, promoção e progressão dos cânceres humanos. O gene TP53 está no centro de várias vias regulatórias celulares (Bojesen & Nordestgaard, 2008). As alterações de TP53 já foram relacionadas ao maior risco para o desenvolvimento de inúmeras neoplasias e estão sendo incorporadas na avaliação prognóstica de tumores humanos (Antonescu *et al.*, 2001; Antonescu *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 2006; Achatz *et al.*, 2007; Petitjean *et al.*, 2007a).

O polimorfismo do códon 72 de TP53 é extensivamente estudado por causar impacto na seqüência codificadora do gene, gerando variantes polimórficas com características bioquímicas e biológicas distintas, além de estar associado ao maior risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Lattuada *et al.*, 2004). Este polimorfismo ocorre num domínio rico em prolina, necessário para a supressão do crescimento celular, desempenhando papel importante nos processos apoptóticos (Thomas *et al.*, 1999; Siddique *et al.*, 2005). Entretanto, não foi encontrado na literatura nenhum estudo investigando o polimorfismo de TP53

em sarcomas de partes moles do adulto. O estudo desse polimorfismo em SPM é de grande importância médica, uma vez que possíveis associações entre os diferentes tipos polimórficos de p53 e o prognóstico dos pacientes poderiam ser realizadas, auxiliando na condução dos esquemas terapêuticos administrados.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o polimorfismo do códon 72 de TP53 como potencial fator prognóstico em pacientes adultos com sarcomas de partes moles. As freqüências alélicas para os casos e controles foram, respectivamente, de 79,5% e 74,1%, para p53Arg e de 20,5% e 25,9% para p53Pro. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,267$ ) entre os grupos analisados. Esse padrão de freqüências demonstra uma maior prevalência do alelo p53Arg, tanto nos casos como nos controles. As freqüências genóticas para casos e controles foram, respectivamente, de 64% e 60% para homocigotos p53Arg/Arg, de 31% e 28,2% para heterocigotos p53Arg/Pro e de 5% e 11,8% para homocigotos p53Pro/Pro, não havendo diferença estatística significativa entre as populações estudadas ( $p = 0,308$ ). Outras análises visando associar o polimorfismo do códon 72 de TP53 ao desenvolvimento de neoplasias também demonstraram freqüências similares (Bonafé *et al.*, 2003; Brenna *et al.* 2004; Cortezzi *et al.*, 2004; Lima JM *et al.*, 2006). Nosso estudo corrobora com as evidências de que o alelo p53Arg é o mais comum nas populações latino-americanas (Gallo *et al.*, 2005). Entretanto, os dados sobre as freqüências gênicas e genóticas da literatura mundial são conflitantes, fato que pode ser atribuído às diferenças étnicas entre as populações estudadas. Além das características étnicas, outros fatores que podem contribuir para a divergência de resultados nos mais variados estudos, incluem o tamanho amostral, o tipo de amostra utilizada como fonte de DNA, as técnicas de detecção utilizadas e as variações inter-laboratoriais dos protocolos usados (Brenna *et al.*, 2004).

A oscilação ou deriva genética, atuando em conjunto com a seleção natural, envolve flutuações aleatórias nas freqüências de alelos, devido a erros de amostragem, havendo a tendência de fixar-se um ou outro alelo, especialmente em populações muito pequenas (Mettler & Gregg, 1973). Dessa maneira, a deriva genética também pode estar associada à discrepância dos resultados encontrados na literatura, uma vez que a estabilidade das freqüências alélicas varia conforme o tamanho das populações. Os erros de

amostragem podem ocorrer devido ao fato de se utilizarem populações relativamente pequenas, como a que incluímos em nosso trabalho.

No presente estudo, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o polimorfismo do códon 72 de TP53 e as características clínico-patológicas estudadas, como gênero, idade agrupada, localização, histologia, tamanho do tumor, estadiamento, grau histológico tumoral, presença e ausência de metástases. A distribuição dessas características não foi significativamente diferente entre as variantes polimórficas, indicando que a importância de cada característica clínico-patológica não depende do genótipo presente em cada paciente analisado. Isso pode indicar que as variantes polimórficas de TP53 não estão associadas ao desenvolvimento mais precoce dos SPM e também não influenciam no tamanho e no grau tumoral. Elas também não parecem estar relacionadas ao desenvolvimento de metástases regionais e/ou à distância. De maneira similar, Xu *et al.*, 2005, Lima J *et al.*, 2006, Yi *et al.*, 2006, Toyama *et al.*, 2007, também não encontraram diferenças estatísticas significativas entre as características clínico-patológicas de pacientes portadores de outras neoplasias e as variantes polimórficas de TP53. Neste estudo, a faixa etária mais acometida, tanto nos indivíduos homocigotos p53Arg/Arg, como nos heterocigotos p53Arg/Pro, foi a de 40-49 anos. A incidência de SPM em indivíduos p53Pro/Pro foi maior na faixa etária dos 50-59 anos. Contudo, nossos dados não permitem afirmar que o alelo p53Arg esteja associado ao desenvolvimento mais precoce dos SPM ( $p = 0,149$ ).

A evolução dos SPMs pode ser predita por alguns fatores prognósticos bem definidos, como o tamanho do tumor, o grau histológico e o tipo histológico, além de presença de metástases linfonodais ou à distância (Manoel *et al.*, 2008).

A sobrevida global em 5 anos para o grupo estudado foi de 48,1% e os pacientes com tumores de baixo grau apresentaram maior sobrevida (68,8%) do que aqueles que apresentavam tumores de alto grau (32,6%). Quando comparamos as taxas de sobrevida aos estadiamentos tumorais, verificamos que a sobrevida era inversamente proporcional aos estádios, ou seja, quanto maior o estágio, menor a sobrevida esperada para pacientes com SPM. O estadiamento da doença ao diagnóstico foi um fator prognóstico significativo em nossa série de casos ( $p < 0,001$ ), confirmando relatos de que ele é um dos

fatores prognósticos mais importantes para SPM (Kotilingam *et al.*, 2006). Os dados encontrados por nosso estudo são compatíveis com as informações já relatadas previamente na literatura (Latorre & Franco, 1999; Kotilingam *et al.*, 2006; Skubitz & D'Adamo, 2007). A maioria dos pacientes avaliados não apresentou metástases linfonodais e/ou à distância e essas variáveis representaram um importante fator prognóstico em nossa série.

A sobrevida dos pacientes cujos tumores apresentaram o genótipo p53Pro/Pro (30%) foi menor quando comparada ao grupo de pacientes com os genótipos p53Arg/Arg e p53Arg/Pro (45% e 54,9%, respectivamente). Entretanto, quando consideramos o p estatístico como  $p < 0,005$ , essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,444$ ) e, portanto, não podemos afirmar que o genótipo homocigoto p53Pro/Pro influencie a sobrevida dos pacientes com SPM. Com base nos dados analisados em nossa série, a variável p53Pro/Pro representou um fator de confusão estatística, pois o número total de indivíduos portadores deste genótipo foi muito pequeno (5 casos). É provável que o aumento do grupo amostral possa resultar em algum significado prognóstico, já que a sobrevida em cinco anos para os indivíduos com SPM que apresentam o genótipo p53Pro/Pro foi consideravelmente inferior aos demais genótipos analisados. Outra possibilidade é que o valor prognóstico das variantes de TP53 tenha sido subestimado, uma vez que mutações nesses alelos podem ocorrer (Nelson *et al.*, 2005; Petitjean *et al.*, 2007a) e, desta forma, alterar o padrão de resposta à terapia dos pacientes analisados em nosso estudo. Pacientes portadores do genótipo selvagem p53Pro/Pro responderiam de maneira diferenciada, quando comparados àqueles portadores do genótipo p53Pro/Pro mutante. A proteína p53 mutante pode inibir as atividades normais da p53 selvagem, como os mecanismos de apoptose, alterando o padrão de resposta aos tratamentos quimioterápicos (Petitjean *et al.*, 2007a). As mutações do gene TP53 são menos frequentes em pacientes portadores do alelo p53Arg (Siddique & Sabapathy, 2006). O seqüenciamento direto do éxon 4 do gene TP53 nos SPM poderia ajudar nessa avaliação.

As possíveis associações entre o polimorfismo do códon 72 de TP53 e o prognóstico dos tumores, de maneira geral, é de grande interesse clínico, pois pode evidenciar um novo fator prognóstico para pacientes com câncer. Alguns

estudos demonstraram que a isoforma p53Arg apresenta melhor poder apoptótico (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003). A observação de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem por meio da indução de apoptose levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo e sua aplicação no tratamento do câncer. Evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma característica marcante da maioria dos tumores malignos (Grivicich *et al.*, 2006). O polimorfismo do códon 72 pode modular a apoptose dependente de p53 e modificar a sensibilidade a agentes quimioterápicos (Toyama *et al.*, 2007).

A apoptose pode ser preferencialmente a primeira linha de defesa do organismo ao estresse genotóxico em populações portadoras do alelo p53Arg. Essa idéia é apoiada por dados clínicos que demonstram que pacientes portadores desta mesma variante, sem mutações do gene TP53, respondem de maneira mais satisfatória à quimioterapia e sobrevivem mais, quando comparados aos portadores do alelo p53Pro (Sullivan *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2006). Contraditoriamente, p53Pro induz o bloqueio do ciclo celular em G1 e a ativação dos mecanismos de reparo p53-dependentes de forma mais eficaz que p53Arg (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Siddique *et al.*, 2006; Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen & Nordestgaard, 2008). Um mecanismo de reparo mais eficiente previne instabilidades genéticas nas células, dificultando a formação de câncer. Entretanto, alguns estudos associaram o alelo p53Pro ao prognóstico desfavorável para certas neoplasias como o câncer de mama (Toyama *et al.*, 2007), carcinoma hepatocelular (Zhu *et al.*, 2005), câncer de pulmão (Nelson *et al.*, 2005) e câncer gástrico (Yi & Lee, 2006).

Deve-se notar, contudo, que ambas isoformas de p53 são capazes de promover mecanismos de reparo e apoptose, mas com eficiências diferentes. Por este motivo, o polimorfismo do códon 72 pode servir como um modificador genético, permitindo a sintonia dos processos biológicos, como consequência de uma adaptação ecológica e/ou evolutiva (Siddique *et al.*, 2006). Cada variante polimórfica pode ter sido selecionada evolutivamente para uma dada função específica. Pode-se levantar a hipótese de que, sob determinado sinal de estresse celular, um indivíduo portador da variante p53Arg responderia preferencialmente desencadeando mecanismos de apoptose celular, enquanto

que aqueles que abrigam o alelo p53Pro desencadeariam o reparo da célula afetada.

Conforme já abordado, o tratamento cirúrgico oferece as maiores chances de cura para os pacientes com SPM. Um mecanismo de apoptose mais eficiente não deve auxiliar nessa modalidade terapêutica, já que a ressecção cirúrgica do tumor não é diretamente influenciada pelo metabolismo celular. Entretanto, a maioria dos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos são embasados na indução de morte e/ou citotoxicidade nas células tumorais. As radiações ionizantes empregadas pela radioterapia promovem ruptura das cadeias de DNA e a maioria das drogas utilizadas na quimioterapia altera o metabolismo das células, interferindo no ciclo celular. A proteína p53 possui papel crucial nesses mecanismos, pois pode desencadear a promoção dos processos apoptóticos em resposta aos danos celulares. A presença de um indutor apoptótico mais forte e eficiente pode promover uma melhor resposta do paciente à terapia adjuvante administrada. Neste contexto, o tratamento neoadjuvante pré-operatório com radioterapia e/ou quimioterapia ofereceria melhor chance de cura, pois promoveria cito-redução, diminuindo o tamanho do tumor e facilitando a cirurgia.

É possível que pacientes portadores do alelo p53Arg, respondam de forma mais satisfatória às modalidades terapêuticas usadas para os SPM. Como a maioria dos casos incluídos em nossa série é portadora do genótipo p53Arg/Arg, poderíamos prever que os tratamentos de quimioterapia e radioterapia administrados a esse grupo sejam mais eficientes. Entretanto, as informações coletadas sobre os esquemas de tratamento administrados aos pacientes incluídos neste estudo, não foram suficientes para investigarmos uma possível associação entre as variantes polimórficas de TP53 e a resposta às diversas modalidades terapêuticas.

Um aspecto interessante de nossa análise de sobrevida, em termos de frequência relativa, é que a sobrevida em cinco anos foi maior para os pacientes heterozigotos p53Arg/Pro. Como esses indivíduos possuem ambas as variantes de TP53, poderia-se prever que os mecanismos de apoptose e de reparo para esse grupo seriam igualmente mais eficientes. Contudo, é possível que exista uma expressão diferencial das variantes de TP53 e que esta influenciaria no prognóstico desses indivíduos. O primeiro estudo a indicar a

expressão seletiva dos alelos polimórficos do códon 72 de TP53 em tumores foi realizado por Siddique e colaboradores (2005). Esse estudo demonstrou que indivíduos asiáticos heterozigotos expressam preferencialmente o alelo p53Pro, enquanto que os caucasianos expressam prevalentemente a variante p53Arg. Entretanto, quando os autores avaliaram a expressão dos alelos em pacientes heterozigotos com câncer de mama, eles observaram que o alelo p53Arg era o mais expresso, sugerindo uma ativação seletiva dessa variante. Esses dados em conjunto sugerem que o alelo p53Arg esteja associado à maior suscetibilidade ao câncer de mama.

As variantes polimórficas de TP53 possuem atividades biológicas e funcionais diferenciadas e ambas podem ser igualmente importantes para a manutenção da integridade genômica. A resposta ao estresse celular é influenciada pelo tipo de agressão e pela sua intensidade e, deste modo, a importância de cada isoforma de TP53 pode variar de acordo com o tipo de resposta mais adequada à agressão celular. É possível hipotetizar que a combinação das atividades de p53Arg x p53Pro possa determinar a suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer.

Os SPM são um grupo heterogêneo de tumores raros e o câncer é uma doença multifatorial e de múltiplas etapas. O polimorfismo do códon 72 de TP53 pode influenciar na suscetibilidade, na iniciação e na progressão tumoral, uma vez que seus alelos polimórficos possuem atividades diferenciadas. Indivíduos homozigotos p53Pro/Pro geralmente possuem expectativa de vida mais elevada do que os portadores dos demais genótipos, fato que supera os efeitos deletérios de uma maior suscetibilidade ao câncer, pois seus mecanismos de reparo são mais eficientes. Alguns estudos tentaram indicar que homozigotos p53Arg/Arg desenvolvem tumores mais precocemente (Oliveira, 2005). Entretanto, a relação entre determinado genótipo de TP53 e o desenvolvimento mais precoce das neoplasias ainda não foi estabelecida. Essa associação é muito importante para prever a origem esporádica e/ou hereditária dos tumores. Entretanto, pode-se inferir que, na verdade, são os pacientes heterozigotos que poderiam atingir melhor prognóstico global, como já foi constatado por nosso estudo, já que eles possuem ambas as variantes, p53Arg e p53Pro. Mas o mecanismo pelo qual essas variantes da via de p53 se relacionam com o gênero, com o estresse ambiental e com a genética do tumor



para afetar o prognóstico dos cânceres em humanos, ainda necessita ser elucidado com mais clareza.

# CONCLUSÕES

---

O presente estudo nos permite concluir que:

- 1) As freqüências gênicas para o polimorfismo do códon 72 do gene TP53, para casos e controles, foram, respectivamente de 79,5% e 74,1%, para p53Arg e de 20,5% e 25,98% para p53Pro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as freqüências obtidas para os grupos estudados ( $p = 0,267$ ).
- 2) As freqüências genotípicas encontradas, para casos e controles, foram, respectivamente, de 64% e 60% para homozigotos p53Arg/Arg, de 31% e 28,2% para heterozigotos p53Arg/Pro e de 5% e 11,8% para homozigotos p53Pro/Pro, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos avaliados ( $p = 0,308$ ).
- 3) A sobrevida em cinco anos para os pacientes com sarcomas de partes moles cujos tumores eram portadores dos genótipos p53Arg/Arg e p53Arg/Pro foi maior (45% e 54,9%, respectivamente), quando comparados àqueles portadores do genótipo p53Pro/Pro (30%). Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,444$ ).
- 4) Nenhuma associação estatisticamente significativa foi demonstrada entre as variantes polimórficas de TP53 e as características clínico-patológicas dos casos de SPM estudados, como: gênero, faixa etária, idade agrupada, localização do tumor, tipo histológico, tamanho, grau tumoral e presença de metástases linfonodais e à distância.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, Ladanyi M. Prognostic Impact of p53 Status in Ewing Sarcoma. **Cancer** 2000; 89(4): 783-792.
2. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett.** 2007 Jan 8;245(1-2):96-102. Epub 2006 Feb 21.
3. Alimirah F, Panchanathan R, Chen J, Zhang X, Ho SM, Choubey D. Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53. **Neoplasia.** 2007 Dec;9(12):1152-9.
4. Amaral JD, Castro RE, Solá S, Steer CJ, Rodrigues CM. p53 Is a Key Molecular Target of Ursodeoxycholic Acid in Regulating Apoptosis. **J Biol Chem.** 2007; 282 (47): 34250-34259.
5. Ambrosini-Spaltro A, Vaira V, Braidotti P, Rovati MPL, Ferrero S, Bosari S. Carcinosarcoma of the colon: report of a case with morphological, ultrastructural and molecular analysis. **BMC Cancer.** 2006 12; 6: 185.
6. Andreassen A, Oyjord T, Hoving E, Holm R, Flørenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Høie J, Bruland OS, Børresen AL, Fodstad O. p53 Abnormalities in Different Subtypes of Human Sarcomas. **Cancer Res** 1993; 53(3): 468-471.
7. Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, Leung DH, Woodruff JM, Brennan MF, Bridge JÁ, Neff JR, Goldblum JR, Ladanyi M. Prognostic Impact of P53 Status, TLS-CHOP Fusion Transcript Structure, and Histological Grade in Myxoid Liposarcoma: A Molecular

- and Clinicopathologic Study of 82 Cases. **Clin Cancer Res.** 2001; 7: 3977-3987.
8. Antonescu CR. The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. **Histopathology** 2006; 48(1): 13-21.
  9. Balmaña J, Nomdedéu J, Díez O, Sabaté JM, Balil A, Pericay C, López López JJ, Brunet J, Baiget M, Alonso C. Description of a new TP53 gene germline mutation in a family with the Li-Fraumeni syndrome. Genetic counselling to healthy mutation carriers. **Med Clin (Barc).** 2002 Oct 19;119(13):497-9.
  10. Bastian D, Ramaswamy A, Barth PJ, Gerdes B, Ernst M, Bartsch D. Malignant Fibrous Histiocytoma of the Pancreas: A Case Report With Genetic Analysis. **Cancer** 1999; 85(11): 2352-2358.
  11. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. **Nat Genet.** 2006 Oct;38(10):1133-41. Epub 2006 Sep 10.
  12. Bhattacharya P; Duttgupta C; Sengupta S. Proline Homozygosity in codon 72 of *p53*: a risk genotype for papillomavirus related cervical cancer in Indian women. **Cancer Letters** 2002; 188:207-211.
  13. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. **Cell Cycle.** 2008 Jan;7(2):158-163. Epub 2007 Nov 1.
  14. Bonafé M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C, Marzi E, Trapassi C, Storci G, Olivieri F, Franceschi C. Retention of the p53 Codon 72 Arginine Allele Is Associated with a Reduction of Disease-

- Free Survival in Arginine/Proline Heterozygous Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res** 2003; 9: 4860-4564.
15. Bond GL, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. **Oncogene** 2007; 26(9): 1317-1323.
16. Borden EC; Baker LH; Bell RS; Bramwell V; Demetri GD; Eisenberg BL; Fletcher CDM; Fletcher JA; Ladanyi M; Meltzer P; O'Sullivan B; Parkinson DR; Pisters PWT; Saxman S; Singer S, Sundaram M; van Oosterom AT; Verweij J; Waalen J; Weiss SW; Brennan MF. Soft Tissue Sarcomas of Adults: State of Translational Science. **Clin Cancer Res Jun** 2003; 9: 1941-1956.
17. Bougeard G, Baert-Deurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, Frebourg T. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet.** 2006; 43(6): 531-533.
18. Brenna SMF, Silva IDCG, Zeferino LC, Pereira J, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prevalence of codon 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer. **Genet Mol Biol** 2004; 27(4): 496-499.
19. Brentani MM; Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. São Paulo, **Tecmedd**; 2003.
20. Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Maia R. p53 e as hemopatias malignas. **Rev. Bras. Cancerol.** 2002; 48(3): 419-427.
21. Chammas R. Aspectos Fisiopatológicos da Disseminação de Sarcomas. In: Lopes A. Sarcomas de partes moles. Rio de Janeiro, **Medsj**; 1999. pp. 31-40.

22. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. **N Engl J Med**. 2005; Aug 18; 353 (7):701-11. Review.
23. Cortezzi SS, Provazzi PJ; Sobrinho JS; Mann-Prado JC; Reis PMP; Freitas SEN; Filho JFG; Fukuyama EE; Cordeiro JA; Cury PM; Maniglia JV; Villa LL; Tajara EH; Rahal P. Analysis of pappilomavirus prevalence and *TP53* polymorphism in head and neck squamous cells carcinomas. **Cancer Genet and Cytogenet** 2004; 150: 44-49.
24. Das P, Kotilingam D, Korchin B, Liu J, Yu D, Lazar AJ, Pollock RE, Lev D. High prevalence of p53 exon 4 mutations in soft tissue sarcoma. **Cancer**. 2007; 109 (11): 2323-2333.
25. Dirix, Luc Y. MD; Van Oosterom, Allan T. MD, PhD. Soft tissue sarcoma in adults. Review. **Curr. Opin. Oncol**. 1999 Jul; 11 (4):285-95.
26. Donehower LA. P53: guardian AND suppressor of longevity? **Exp Gerontol** 2005; 40: 7-9.
27. Dumont P, Leu JI, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. **Nature Genetics** 2003; 33: 357-365.
28. Ferreira FO, Lopes A. Aspectos Biomoleculares e Prognósticos. In: Lopes A. Sarcomas de partes moles. Rio de Janeiro, **Medsa**; 1999. pp. 181-186.
29. Fett-Conte A, Salles ABC. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2002; 24(2): 85-89.
30. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Vol. 5 of the World Health Organization classification of tumours. Lyon, France: **IARC Press**, 2002.

31. Furuwatari C, Yagi A, Yamagami O, Ishikawa M, Hidaka E, Ueno I, Furihata K, Ogiso Y, Katsuyama T. A Comprehensive System to Explore p53 Mutations. **Am J Clin Pathol** 1998; 110: 368-373.
32. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. **Mutat Res.** 2005; 589(3): 192-207.
33. Graadt van Roggen JF, Boveé JVMG, Morreau J, Hogendoorn PCW. Diagnostic and prognostic implications of the unfolding molecular biology of bone and soft tissue tumors. **J Clin Pathol** 1999; 52(7): 481-489.
34. Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.* eds. AJCC cancer staging manual. 6<sup>th</sup> ed. New York: **Springer-Verlag**, 2002.
35. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Canc.** 2007; 53(3):335-343.
36. Grobmyer SR, Luther N, Antonescu CR, Singer S, Brennan MF. Multiple Primary Soft Tissue Sarcomas. **Cancer** 2004; 101(11):2633-5.
37. Guimarães PEM, Costa MCR. SNPs – sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 2002; 26, p. 24 - 27.
38. Hamú CS; Oliveira MVP; Silva AMTC; Silva CC; Cruz AD. Polimorfismo do gene TP53 no códon 72 em pacientes com suspeita de LMC. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** 2007; 29(4): 346-350.
39. Harris SL, Gil G, Robins H, Hu W, Hirshfield K, Bond E, Bond G, Levine AJ. Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005 Nov 8;102(45):16297-302. Epub 2005 Oct 31.

40. Hieken TJ, Das Gupta TK. Mutant p53 Expression: A Marker of Diminished Survival in Well-differentiated Soft Tissue Sarcoma. **Clin Cancer Res** 1996; 2: 1391-1395.
41. INCA/MS: Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde (2005). Estimativas 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro.
42. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. **Cancer Statistics**, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
43. Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. **J Cell Sci.** 2001; 114(Pt 23): 4139-4140.
44. Klumb CE; Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** 2002, 24(2): 111-125.
45. Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, Hayashi K, Kaneko Y, Kamoshita S, Hanada R, Yamamoto K, Hongo T, Yamada M, Tsuchida Y. Mutations of the *p53* Gene Are Involved in Ewing's Sarcomas but not in Neuroblastomas. **Cancer Res** 1993; 53: 5284-5288.
46. Kotilingam D; Lev DC; Lazar AJF; Pollock RE. Soft tissue sarcoma: evolution and change. **CA Cancer J Clin.** 2006; 56; 282-291.
47. Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia: A Meta-Analysis Review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2004; 13 (1): 11-22.
48. Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian Virus 40-Transformed Cells Express New Species of Proteins Precipitable by Anti-Simian Virus Tumor Serum. **J Virol.** 1979; 31(2): 472-483.



49. Kudawara I, Matsumine A, Ohzono K. Analysis of germline and tumor mutations of p53 gene in familial occurrence of soft tissue sarcomas. **J Surg Oncol.** 2007 Mar 15;95(4):347-50.
50. Latorre MRDO, Franco EL. Epidemiologia dos Sarcomas. In: Lopes A. Sarcomas de partes moles. Rio de Janeiro, **Medsa**; 1999. pp. 2-18.
51. Lattuada D, Viganò P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M, Di Blasio AM. Analysis of the codon 72 polymorphism of the *TP53* in patients with endometriosis. **Mol Hum Reprod** 2004; 10(9): 651-654.
52. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death Differ** 2006; 13: 1027-1036.
53. Li YZ, Lu DY, Tan WQ, Wang JX, Li PF. p53 Initiates Apoptosis by Transcriptionally Targeting the Antiapoptotic Protein ARC. **Mol Cell Biol.** 2008; 28 (2): 564-574.
54. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM, Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arq. Gastroenterol.** 2006; 43(1): 8-13.
55. Lima MAP, Rabenhorst SHB. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Rev Bras Cancer** 2006; 52(1): 87-96.
56. Lyakhov IG, Krishnamachari A, Schneider TD. Discovery of novel tumor suppressor p53 response elements using information theory. **Nucleic Acids Res.** 2008 May 21. [Epub ahead of print].
57. Madhumalar A, Smith DJ, Verma C. Stability of the core domain of p53: insights from computer simulations. **BMC Bioinformatics.** 2008;9 Suppl 1:S17.

58. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. **Genes Dev.** 2007; 21 (1): 43-48.
59. Malmer B, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Henriksson R. p53 Genotypes and Risk of Glioma and Meningioma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2005; 14(9): 2220-2223.
60. Manoel WJ. Imunodeteção da Proteína p53 em Sarcomas de Partes Moles no Adulto. [Dissertação de mestrado]. Goiânia, 2007.
61. Manoel WJ, Sarmiento BJQ, Silveira Júnior LP, Abreu DCB, Neto IPA, Ferreira EC. Sarcomas de Partes Moles: Resultados do Tratamento dos Tumores de Baixo Grau. **Rev Bras Canc** 2008; 54(1): 17-24.
62. Mettler LE, Gregg TG. Genética de Populações e Evolução. São Paulo, **Polígono/EDUSP**, 1973; pp. 149-170.
63. Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scoble HJ, Cavenee WK. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. **Proc Natl Acad Sci** 1990; 87:5863-5867.
64. Muret J, Yacoub M, Terrier P, Drusch F, Laplanche A, Gaudin C, Richon C, LePéchoux C, Le Cesne A, Lejeune FJ, Tursz T, Fouret P, Bonvalot S, Chouaib S. p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan. **Ann Oncol.** 2008; 19 (4): 793-800.
65. Murphy ME. Polymorphic variants in the p53 pathway. **Cell Death Differ** 2006; 13(6): 916-920.
66. Nelson HH, Wilkojmen M, Marsit CJ, Kelsey KT. *TP53* mutation, allelism and survival in non-small cell lung cancer. **Carcinogenesis** 2005; 26(10): 1770-1773.

67. Oliveira MVP. Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do gene *p53* no Carcinoma Laríngeo. [Dissertação de mestrado] Universidade Federal de Goiás; 2005.
68. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. **Clin Cancer Res.** 2006 Feb 15;12(4):1157-67.
69. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 – the first twenty years. **Cell Mol Life Sci** 1999; 55: 9-11.
70. Ørsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. **J Exp Med.** 2007 Jun 11;204(6):1295-301. Epub 2007 May 29.
71. Özören N, El-Deiry WS. Introduction to cancer genes and growth control. In: DNA Alterations in Cancer – genetic and epigenetic changes. **Eaton Publishing Natick** 2000; p. 03 - 35.
72. Passaglia LMP. Mutação e mecanismos de reparo. In: Zaha A. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre, **Mercado Aberto**; 2003; pp. 149-178.
73. Petitjean A, Achatz MIW, Børresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26(15): 2157-2165 (A).
74. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC

- TP53 database. **Hum Mutat.** 2007; 28(6): 622-9. (Versão R12, Novembro de 2007) (B).
75. Pinto FN, Prudente FVB, Gonçalves MS, Silva PDV, Del Giglio A. Mutação do gene p53 induzindo predisposição hereditária ao câncer: relato de um caso da síndrome de Li-Fraumeni. **Rev Med** 2002; 81(1/4): 42-6.
76. RCBPGO, 1996 a 2000, Relatório interno. Janeiro, 2006.
77. Ribeiro Jr U, Safatle-Ribeiro AV. p53 na prática clínica: sim ou não? **Arq Gastroenterol** 2006; 43(1): 6-7.
78. Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21 (WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2007; 15 (1): 64-69.
79. Sauer M, Bretz AC, Beinoraviciute-Kellner R, Beitzinger M, Burek C, Rosenwald A, Harms GS, Stiewe T. C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. **Nucleic Acids Res.** 2008 Apr; 36(6):1900-12. Epub 2008 Feb 11.
80. Savage SA; Burdett L; Troisi R; Douglass C; Hoover RN; Chanock SJ. Germ-Line Genetic Variation of *TP53* in Osteosarcoma. **Pediatr. Blood. Cancer.** 2006 DOI 10.1002/pbc.21077.
81. SBC: Sociedade Brasileira de Cancerologia. Partes Moles. <http://www.sbcancer.org.br/final/artigossetor.asp?idart=9>. Acesso em 07/08/2007.
82. Schneider-Stock R, Ziegeler A, Haeckel C, Franke DS, Rys J, Roessner A. Prognostic Relevance of p53 Alterations and Mib-1 Proliferation Index

- in Subgroups of Primary Liposarcomas. **Clin Cancer Res** 1999; 5: 2830-2835.
83. Siddique MM, Balram C, Fiszter-Maliszewska L, Aggarwal A, Tan A, Tan P, Sôo KC, Sabapathy K. Evidence for Selective Expression of the p53 Codon 72 Polymorphisms: Implications in Cancer Development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14(9): 2245-2252.
84. Siddique M, Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**. 2006; 25: 3489-3500.
85. Skubitz KM, D'Adamo DR. Sarcoma. **Mayo Clin Proc**. 2007; 82(11): 1409-1432.
86. Silva AMTC. Avaliação epidemiológica, citogenética e molecular de carcinoma da laringe. [Dissertação de mestrado] Universidade Federal de Goiás, 2003.
87. Simpson AJG. A Genética de Sarcomas de Partes Moles e sua Aplicação à Clínica. In: Lopes A. Sarcomas de partes moles. Rio de Janeiro, **Medsa**; 1999. pp. 19-30.
88. Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppl M, Driel MA, Bartels SJ, Akkers RC, Denissov S, Stunnenberg HG, Lohrum M. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. **Nucleic Acids Res**. 2008 May 12. [Epub ahead of print].
89. Smith JM, Stubbert LJ, Hamill JD, McKay BC. The contribution of transactivation subdomains 1 and 2 to p53-induced gene expression is heterogeneous but not subdomain-specific. **Neoplasia**. 2007 Dec;9(12):1057-65.

90. Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA. *p53* codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. **Oral Oncol.** 2001; 37(6): 572-8.
91. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the *p53* codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. **Int J Mol Med.** 2007; 20(5): 731-741.
92. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of *p53* polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature** 1998; 393: 229-234.
93. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, Hiller L, Farrel PJ, Smith P, Lu X, Crook T. Polymorphism in wild-type *p53* modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. **Oncogene.** 2004; 23(19): 3328-3337.
94. Sutcliffe JE, Brehm A. Of flies and men; *p53*, a tumor suppressor. **FEBS Lett.** 2004; 567(1): 86-91.
95. Taubert H; Meye A; Würfl P. Prognosis is Correlated with *p53* Mutation Type for Soft Tissue Sarcoma Patients. **Cancer Research.** 1996 Sept; 56:4134-4136.
96. Taylor AC; Shu L; Danks MK; Poquette CA; Shetty S; Thayer MJ; Houghton PJ; Harris LC. *p53* Mutation and MDM2 Amplification Frequency in Pediatric Rhabdomyosarcoma Tumors and Cell Lines. **Medical and Pediatric Oncology.** 2000 35:96-103.
97. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two Polymorphic Variants of Wild-Type *p53* Differ Biochemically and Biologically. **Mol Cell Biol** 1999; 19(2): 1092-1100.

98. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, Iwase H, Iwata H, Takahashi S, Yamashita H, Fujii Y. Association of *TP53* codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. **Breast Cancer Res.** 2007; 9(3): R34.
99. Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS. Apoptotic Actions of p53 Require Transcriptional Activation of PUMA and Do Not Involve a Direct Mitochondrial/Cytoplasmic Site of Action in Postnatal Cortical Neurons. **J Neurosci.** 2007; 27(45):12198-12210.
100. van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJ, Brandt BW, Slagboom PE, Westendorp RG; Long Life study group. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. **Exp. Gerontol.** 2005; 40(1-2):11-5.
101. van Oijen MGCT, Slootweg PJ. Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene *p53*. **Clin Cancer Res** 2000; 6: 2138-2145.
102. Végran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebucci M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic surviving splice variants in breast cancer. **Oncogene.** 2007 Jan 11;26(2):290-7. Epub 2006 Jul 17.
103. Veprintsev DB, Fersht AR. Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. **Nucleic Acids Res.** 2008 Mar;36(5):1589-98. Epub 2008 Jan 30.
104. Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson L, Brossard J, Brodeur GM, Pelletier J, Gros P. Absence of *p53* Gene Mutations in Primary Neuroblastomas. **Cancer Res.** 1993; 53: 5269-5273.
105. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of *p53* mutations. **Cell Mol Life Sci** 1999; 54: 64-75.

106. Wang P, Yu J, Zhang L. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104 (10): 4054-4059.
107. Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Lin B, Lu Y, Xie Y. p53 Codon 72 Polymorphism Predicts the Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11(20): 7328-7333.
108. Yi SY, Lee WJ. A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: Difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12(40): 6536-6539.
109. Zeng J, Yan J, Wang T, Mosbrook-Davis D, Dolan KT, Christensen R, Stormo GD, Haussler D, Lathrop RH, Brachmann RK, Burgess SM. Genome wide screens in yeast to identify potential binding sites and target genes of DNA-binding proteins. **Nucleic Acids Res.** 2008 Jan;36(1):e8. Epub 2007 Dec 17.
110. Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Dong H, Zhu GS, Wu MC. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in chinese population. **World J Gastroenterol** 2005; 11(2): 289-292.



# Anexos

**Anexo 1** - Classificação de Sarcomas de Partes Moles Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Traduzido, baseado em Fletcher et al, 2002.

	<b>TUMOURS</b>	<b>CÓDIGO</b>
TUMORES GORDUROSOS	Lipossarcoma Desdiferenciado	8858/3
	Lipossarcoma Mixóide	8852/3
	Lipossarcoma de Células Redondas	8853/3
	Lipossarcoma Pleomórfico	8854/3
	Lipossarcoma Mixóide	8855/3
	Lipossarcoma, não especificado	8850/3
TUMORES FIBROBLASTICOS / MIOFIBROBLASTICOS	Fibrossarcoma do Adulto	8810/3
	Mixofibrossarcoma	8811/3
	Sarcoma Fibromixóide de Células Fusiformes	8811/3
	Hialinizantes de Baixo Grau	
	Fibrossarcoma epitelióide esclerosante	8810/3
TUMORES FIBROHISTIOCITICOS	Fibrohistiocitoma maligno pleomórfico / Sarcoma pleomórfico indiferenciado	8830/3
	Fibrohistiocitoma maligno de células gigantes / Sarcoma pleomórfico indiferenciado de células gigantes	8830/3
	Fibrohistiocitoma maligno inflamatório / Sarcoma pleomórfico indiferenciado com proeminente inflamação	8830/3
TUMORES DE MUSCULOS LISOS	Leiomiomasarcoma (excluindo pele)	8890/3
TUMORES PERIVASCULARES (PERICITICOS)	Tumor glômico maligno	8711/3
TUMORES DE MUSCULOS ESQUELÉTICOS	Rabdomiossarcoma embrionário (incl. células fusiformes, botriode, anaplásico)	8910/3
	Rabdomiossarcoma Alveolar (Incluindo: sólido, anaplásico)	8912/3
		8910/3
	Rabdomiossarcoma pleomórfico	8920/3
		8901/3
TUMORES VASCULARES	Sarcoma de Kaposi	9140/3
	Hemangioendotelioma epitelióide	9133/3
	Angiossarcoma de partes moles	9120/3
TUMORES DE DIFERENCIAÇÃO INCERTA	Sinoviossarcoma	9040/3
	Sarcoma epitelióide	8804/3
	Sarcoma alveolar de partes moles	9581/3
	Sarcoma de células claras de partes moles	9044/3
	Condrossarcoma mixóide extraesquelético	9231/3
	PNET / Tumor de Ewing extraesquelético pPNET	
	Tumor de Ewing extraesquelético	
	Tumor desmoplásico de células redondas pequenas	9364/3
	Tumor rabdóide extrarenal	9260/3
	Mesenchimoma maligno	8806/3
	Neoplasias com diferenciação de células claras perivascular (PEComa)	8963/3
	tumor miomelanocítico de células claras	8990/3
		8800/3

**Anexo 2 – Ficha de coleta de dados clinicopatológicos de sarcoma de partes moles (SPM) – Hospital Araújo Jorge – ACCG**

BANCO DE DADOS RETROSPECTIVO  
SARCOMAS DE PARTES MOLES  
HOSPITAL ARAÚJO JORGE –ACCG  
DEPARTAMENTO DE TECIDO CONJUNTIVO E ORTOPEDIA

Número

**I. IDENTIFICAÇÃO**

1. Prontuário: \_\_\_\_\_ 2. Nome: \_\_\_\_\_  
3. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 4. Sexo:  1. Masc  2. Fem 5. Idade: \_\_\_\_\_

**II. LOCALIZAÇÃO/DIAGNÓSTICO/ESTADIAMENTO**

6. Localização:  1. cabeça e pescoço  2. tórax  3. parede abdominal  4. retroperitônio  5. pelve  
 6. intra-abdominal  7. membro superior  8. membro inferior  9. outros: \_\_\_\_\_  
7. Biópsia fora:  1. Sim  Não 8. Cirurgia fora:  1. Sim  2. Não 9. Dor local:  1. Sim  2. Não  
10. Histologia/IHQ:  1. fibrossarcoma  2. FHM  3. lipossarcoma  4. leiomiossarcoma  5. rabiomiossarcoma  
 6. linfangio/ssarcoma  7. Kaposi  8. sarcoma sinovial  9. sarcoma epitelióide  
 10. TON  11. GIST  12. Ewing  12. PNET  13. paraganglioma  
 14. sarcoma alveolar  15. sarcoma SOE  16. outros: \_\_\_\_\_  
11. Estadiamento: \_\_\_\_\_ 12. Tamanho: \_\_\_\_\_ cm 13. Linfonodos:  1. Sim  2. Não  
14. Grau:  1. baixo  2. alto 15. Metástase:  1. Sim  2. Não 16. Ressecção de metástase:  1. Sim  2. Não  
17. Sítio metastático:  1. pulmão  2. fígado  3. cérebro  4. osso  5. NA  6. outros: \_\_\_\_\_

**III. NEOADJUVÂNCIA**

18. Radioterapia neoadjuvante:  1. Sim  2. Não 19. Dose: \_\_\_\_\_ Gy  
20. Quimioterapia neoadjuvante:  1. Sim  2. Não 21. Droga principal: \_\_\_\_\_

**IV. TRATAMENTO CIRÚRGICO**

22. Cirurgia:  1. Preservação  2. Amputação/ressec. órgão 22. Margem:  1. livre  2. comprometida  3. NA  
23. Complicações:  1. Sim  2. Não 24. Tipo:  1. Infecção  2. Deiscência  3. outras: \_\_\_\_\_

**V. ADJUVÂNCIA/TRATAMENTO EXCLUSIVO CURATIVO**

25. Radioterapia adjuvante:  1. Sim  2. Não 26. Dose: \_\_\_\_\_ Gy  
27. Quimioterapia adjuvante:  1. Sim  2. Não 28. Droga principal: \_\_\_\_\_

29. Trat. paliativo inicial:  1. Sim  2. Não 30. Tipo:  1. RT  2. QT  3. Cirurgia  4. Combinado: \_\_\_\_\_

**VI. EVOLUÇÃO**

30. Recorrência:  1. Sim  2. Não 31. Padrão:  1. local  2. local+distância  3. distância  
32. Sítio metastático:  1. pulmão  2. fígado  3. cérebro  4. osso  5. não  6. outros: \_\_\_\_\_  
33. Ressecção de metástase:  1. Sim  2. Não 34. Tempo para recorrência: \_\_\_\_\_ meses  
35. Situação atual:  1. vivo s/doença  2. vivo c/doença  3. perda de seguimento  4. óbito  
36. Tempo de seguimento \_\_\_\_\_ meses 37. Admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 38. Última consulta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Apenas sarcomas de partes moles. Se tratamento paliativo(29), apenas itens I, II e VI36-39. NA=não avaliável; TON=tumor de origem neural; GIST= tumor estromal gastrointestinal; PNET=tumor neuroectodérmico

**Anexo 3** - Autorização do autor Silva, AMTC para a utilização das ilustrações neste documento

De: Prof. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, M.Sc.  
Professor das Disciplinas de Genética e Biologia Molecular  
Departamento de Biologia  
Universidade Católica de Goiás  
A/C: Priscilla Silva Rosa de Almeida, Esp.  
Aluna do Programa de Pós-graduação Mestrado em Genética  
Universidade Católica de Goiás

Goiânia, 15 de abril de 2008.

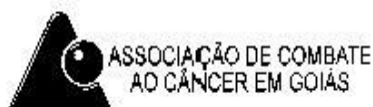
Cara Priscilla,

Saudações cordiais. Fico honrado em poder contribuir para o enriquecimento de sua dissertação de mestrado. Neste contexto, autorizo a utilização das ilustrações originais de minha dissertação de mestrado, denominada "*Avaliação Epidemiológica, Citogenética e Molecular de Carcinomas da Laringe*", para os fins científicos e educacionais de sua dissertação mediante citação da referência.

Atenciosamente,

Prof. Antônio Márcio

**Anexo 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG (CEPACCG)**



**PROTODLO CEPACCG Nº 010/08**

Goiânia, 09/10/2008



**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Biomédica – Priscila Silva Rosa de Almeida

**ORIENTADORA:** Dra. Vera Aparecida Saddi

**TÍTULO:** Polimorfismo do Códon 72 do Gene P53 em Sarcomas de Partes Moles

**Área Temática:** Grupo III

**Área de Conhecimento:** Ciências Biológicas

**Local de Realização:** Hospital Araújo Jorge/ACCG - Anatomia Patológica

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, após a análise das respostas às pendências, aprovou o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

  
**Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi**  
Coordenadora do CEP/ACCG

Rua 239 nº206 Setor Universitário · Goiânia · GO  
Fone: (62) 3243-7000 · Fax: (62) 3218-5513 · CEP 74605-070  
www.accg.org.br

## Apêndice

**Apêndice 1** – Distribuição dos pacientes com SPM por genótipo em relação à faixa etária, localização do tumor e tipo histológico.

Fatores	p53Arg/Arg		p53Arg/Pro		p53Pro/Pro		p
	n	%	n	%	n	%	
<b>Faixa etária</b>							
19-29	6	9,4	6	19,4	0	0,0	0,149
30-39	12	18,8	4	12,9	0	0,0	
40-49	15	23,4	10	32,3	1	20,0	
50-59	10	15,6	8	25,8	3	60,0	
60-69	11	17,2	2	6,5	1	20,0	
>70	10	15,6	1	3,2	0	0,0	
Total	64	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Localização</b>							
Cabeça e Pescoço	2	3,1	3	9,7	0	0,0	0,449
Tórax	10	15,6	4	12,9	0	0,0	
Parede abdominal	2	3,1	0	0,0	0	0,0	
Retroperitônio	9	14,1	6	19,4	3	60,0	
Pelve	2	3,1	0	0,0	0	0,0	
Intra-abdominal	5	7,8	5	16,1	1	20,0	
Membro superior	9	14,1	2	6,5	1	20,0	
Membro inferior	24	37,5	11	35,5	0	0,0	
Outros	1	1,6	0	0,0	0	0,0	
Total	64	100,0	31	100,0	5	100,0	
<b>Tipo Histológico</b>							
Fibrossarcoma	22	34,4	7	22,6	0	0,0	0,123
Fibrohistiocitoma							
Maligno	0	0,0	1	3,2	0	0,0	
Lipossarcoma	8	12,5	3	9,7	0	0,0	
Leiomiossarcoma	5	7,8	6	19,4	2	40,0	
Rabdomiossarcoma	3	4,7	0	0,0	0	0,0	
Linfangiossarcoma	3	4,7	2	6,5	0	0,0	
Sarcoma de Kaposi	5	7,8	0	0,0	0	0,0	
Sarcoma Sinovial	1	1,6	0	0,0	0	0,0	
Tumor de Origem Neural	3	4,7	1	3,2	2	40,0	
Tumor do Estroma Gastrointestinal	1	1,6	0	0,0	0	0,0	
Tumor neuroendócrino periférico	0	0,0	1	3,2	0	0,0	
Sarcoma SOE	9	14,1	9	29,0	1	20,0	
Outros	4	6,3	1	3,2	0	0,0	
Total	64	100,0	31	100,0	5	100,0	