



Universidade Federal do Rio de Janeiro

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM DNA  
CIRCULANTE DE PACIENTES COM GLIOMAS MALIGNOS**

MARCELO SOARES DA MOTA E SILVA

Rio de Janeiro  
Maio de 2012

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM DNA  
CIRCULANTE DE PACIENTES COM GLIOMAS MALIGNOS

Marcelo Soares da Mota e Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica (área de concentração Biologia Molecular de Neoplasias Malignas).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Glória da Costa Carvalho

Rio de Janeiro  
Maio de 2012

Silva, Marcelo Soares da Mota e

Estudo do polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em DNA circulante de pacientes com gliomas malignos / Marcelo Soares da Mota e Silva. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2012. xv, 41 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Maria da Glória da Costa Carvalho.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / FM / Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, 2012.

Referências bibliográficas: f. 45-50.

1. Polimorfismo Genético - genética. 2. Glutathione Transferase. 3. Glioma. 4. Astrocitoma. 5. Glioblastoma. 6. Oligodendroglioma. 7. Humanos. 8. Biologia Molecular de Neoplasias Malignas - Tese. I. Carvalho, Maria da Glória da Costa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, FM / Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. III. Título.

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM DNA CIRCULANTE DE PACIENTES COM GLIOMAS MALIGNOS

Marcelo Soares da Mota e Silva

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Glória da Costa Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Biologia Molecular de Neoplasias Malignas.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza – Professor Associado UFRJ

---

Prof. Dr. Clóvis Orlando da Fonseca – Professor Associado UFF

---

Dr<sup>a</sup> Juliana de Saldanha da Gama Fischer Carvalho – Pesquisadora FIOCRUZ

Suplentes:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Celeste Carvalho Siqueira Elia – Professora Titular UFRJ

---

Prof. Dr. Rodrigo Soares de Moura-Neto – Professor Associado UFRJ

Rio de Janeiro, 2 de maio de 2012

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Aderson e Cléa, a quem muito amo e que desde a infância tiveram o cuidado de imprimir em meu caráter qualidades essenciais à minha formação como pessoa e como profissional. O seu carinho foi e é fundamental para a minha felicidade.

À minha esposa Maria Betânia, e aos meus filhos Daniel e Felipe de quem recebo muito amor e incentivo.

***“Sonhar o impossível é o primeiro passo para torná-lo realidade”***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, a quem tudo devo, e que me possibilitou chegar até aqui com a ajuda de pessoas muito especiais, as quais Ele colocou no meu caminho.

Aos meus queridos pais, que sempre lutaram muito pela minha formação em todos os sentidos, suas palavras de incentivo e seus bons conselhos ainda estão bem vivos na minha mente.

À Professora Maria da Glória C. Carvalho, minha orientadora e, que muito me incentivou na minha vida profissional e acadêmica. Sempre foi importantíssimo sentir que ela acreditava em meu potencial, isto elevou minha autoestima e me impulsionou a enfrentar os desafios. Suas muitas palavras de orientação e encorajamento foram imprescindíveis para eu que chegasse até aqui.

Ao Professor Heitor Siffert P. de Souza, pessoa muito gentil e acessível. Muito obrigado por se dispor a ser examinador da minha dissertação e do artigo que foi escrito a partir deste trabalho e, por aceitar fazer parte da banca de defesa desta dissertação.

Ao Professor Clóvis Orlando da Fonseca, pessoa muito prestativa e gentil, sempre disposto a ajudar, não só na vida profissional como também na pessoal, e que muito me honra com sua presença na banca de defesa desta dissertação.

Ao casal de pesquisadores, Dr. Paulo Carvalho e Dra. Juliana Carvalho que têm me ajudado bastante, de diversas maneiras, na minha trajetória acadêmica. Agradeço a presença da Dra. Juliana na banca de defesa desta dissertação.

Ao Professor Rodrigo Moura Neto, que com sua extrema competência e bom

humor me fez perceber que a análise estatística dos dados deste trabalho não era algo tão complicado quanto eu pensava, e que também se dispôs gentilmente a participar como suplente da banca de defesa.

À Professora Celeste Elia, que possui uma capacidade impressionante de motivar aqueles que estão ao seu redor e uma simpatia contagiante. Agradeço pela gentileza em participar das defesas do meu projeto e do exame preliminar da dissertação, bem como, por integrar a banca como suplente.

Aos colegas de Laboratório, Dr. André Soares Rebello, Brenda Bucco Maiolino e Dra. Fernanda Lattario Ribeiro que tiveram participação importantíssima neste trabalho.

À minha esposa, companheira incansável, e aos meus filhinhos, que me proporcionaram muitos momentos alegres quando brincávamos juntos. Isto foi essencial para relaxar nos momentos de “stress”.

Aos meus irmãos, Marcos, Márcia e Marisa; grandes amigos. Seu amor alegra muito a minha vida.

Aos todos os meus tios, em especial à tia Lídia, minha segunda mãe, de quem sempre recebi bons conselhos e incentivo.

A todos os meus primos que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial ao Luiz Cláudio, que muito me incentivou em minha vida acadêmica.

Aos meus sogros e cunhadas, sua ajuda e companheirismo foram essenciais.

À Professora Nathalie Canedo, do Serviço de Patologia do HUCFF, com quem

tive o privilégio trabalhar durante alguns anos, e que sempre teve extrema boa vontade em me auxiliar em diversas áreas necessárias à minha formação acadêmica.

À Professora Thereza Quirico Santos, pessoa extremamente atenciosa e, à sua equipe de alunos que também tiveram participação ativa neste trabalho. Sempre fui muito bem recebido em seu Laboratório na UFF.

À Dra. Carla Maciel, com quem convivi durante poucos anos aqui no Laboratório, mas foi o suficiente para adquirir grande admiração por esta brilhante profissional. É uma das pessoas mais sinceras que eu já conheci. No início da minha carreira acadêmica suas palavras foram de grande incentivo.

A todos os colegas com quem tive a oportunidade de conviver no Laboratório de Expressão Gênica e compartilhar momentos que fizeram parte da minha construção acadêmica.

Às Professoras Yara Furtado e Filomena Aste, que sempre me incentivaram durante a trajetória do meu mestrado e, me passaram dicas super importantes.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Clínica Médica, em especial ao Luís e à Sônia, sempre muito gentis e atenciosos e, à Teresa Gouda, cuja eficiência é notória.

Aos funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho que de alguma forma têm colaborado direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser executado.

À Fundação do Câncer, CAPES, CNPq e FAPERJ por proverem os recursos



financeiros necessários à execução deste trabalho.

Ao Programa de Oncobiologia que me tem proporcionado oportunidades ímpares de conviver com outros grupos de pesquisa, o que enriquece a minha formação.

Aos voluntários que participaram deste trabalho, tanto os pacientes quanto os do grupo controle, o meu muito obrigado por se doarem em prol do desenvolvimento científico, o que permitiu a execução desta pesquisa.

Aos meus amigos, que me querem muito bem e oram pelo meu sucesso.

A todos, que embora não tenham sido nominalmente citados, colaboraram de alguma forma para que este trabalho pudesse ter sido executado. Muito obrigado.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Localização do gene <i>GSTT1</i> no cromossomo 22.....  | 16 |
| <b>Figura 2</b> Localização do gene <i>GSTM1</i> no cromossomo 1.....   | 17 |
| <b>Figura 3</b> Estrutura química da molécula de Glutathiona.....   | 18 |
| <b>Figura 4</b> Vista geral das reações de detoxicação. Uma molécula de benzopireno é detoxificada pela conjugação com a glutathiona e eliminada para fora da célula..... | 19 |
| <b>Figura 5</b> Representação tridimensional da Glutathiona <i>S</i> -transferase <i>teta</i> 1 humana.....   | 20 |
| <b>Figura 6</b> Representação tridimensional da Glutathiona <i>S</i> -transferase <i>mi</i> 1A humana.....  | 21 |
| <b>Figura 7</b> Níveis de DNA circulante em plasma sanguíneo em controles saudáveis e em portadores e linfomas.....   | 22 |
| <b>Figura 8</b> Incidência mundial e taxas de mortalidade dos tumores do sistema nervoso central por cem mil pessoas por ano.....   | 24 |
| <b>Figura 9</b> Taxas de incidência de astrocitomas em vários países e regiões do mundo por cem mil pessoas por ano.....  | 25 |
| <b>Figura 10</b> Imagem de corte histopatológico de tecido corado com hematoxilina-eosina.....  | 26 |
| <b>Figura 11</b> Imagem de tomografia computadorizada de um glioblastoma multiforme (GBM).....  | 27 |
| <b>Figura 12</b> Oligodendroglioma anaplásico em imagem de ressonância magnética.....   | 29 |
| <b>Figura 13</b> ..... Imagem de gel mostrando deleção dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....  | 38 |
| <b>Figura 14</b> Curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....   | 40 |
| <b>Figura 15</b> Curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com a localização tumoral.....   | 41 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> Sequências dos iniciadores usados na genotipagem.....  | 36 |
| <b>Tabela 2</b> Frequências de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em noventa e cinco pacientes e cem indivíduos controle.....                                   | 38 |
| <b>Tabela 3</b> Frequências de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em relação à idade, gênero e tipo tumoral em pacientes com gliomas e indivíduos controle..... | 39 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| AA    | Astrocitoma anaplásico                           |
| AP    | Álcool perfílico                                 |
| EDTA  | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>          |
| GBM   | Glioblastoma multiforme                          |
| GSTM1 | Glutathione <i>S</i> -transferase <i>mi</i> um   |
| GSTT1 | Glutathione <i>S</i> -transferase <i>teta</i> um |
| GSTs  | Glutathione <i>S</i> -transferases               |
| KDa   | Kilodalton                                       |
| NaOH  | Hidróxido de Sódio                               |
| OA    | Oligodendroglioma anaplásico                     |
| OD    | Oligodendroglioma                                |
| OMS   | Organização Mundial da Saúde                     |
| PCR   | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                 |
| RPM   | Rotações por minuto                              |
| SDS   | <i>Sodium dodecyl sulfate</i>                    |
| SNC   | Sistema Nervoso Central                          |
| SNP   | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>            |
| SPSS  | <i>Statistical Package for Social Sciences</i>   |

## RESUMO

### ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM DNA CIRCULANTE DE PACIENTES COM GLIOMAS MALIGNOS

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

As enzimas *GSTM1* (glutathione *S*-transferase *mi* um) e *GSTT1* (glutathione *S*-transferase teta um) apresentam importante participação na detoxicação celular de diversos carcinógenos e, sua ausência pode facilitar o surgimento de tumores malignos. Este estudo investigou a deleção dos genes que codificam estas enzimas (*GSTM1* e *GSTT1* respectivamente) em noventa e cinco portadores de gliomas malignos e em cem indivíduos controle sem história de câncer, comparando as frequências de deleção em ambos os grupos. Neste estudo foi avaliada a relação existente entre deleção e tempo de sobrevida dos pacientes. Também foi investigada a associação entre a localização anatômica do tumor e a sobrevida. A genotipagem foi realizada através da reação em cadeia pela polimerase. Os resultados revelaram uma frequência de deleção de *GSTM1* de 44% nos pacientes e, de 54% no grupo controle, porém esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ( $p = 0,19$ ). Encontrou-se deleção de *GSTT1* em 11,5% dos pacientes e em 36% dos indivíduos controle, sendo esta diferença significativa ( $p = 0,00009$ ). Os pacientes com o gene *GSTM1* deletado tiveram sobrevida média de vinte e três semanas e os sem deleção, trinta e uma semanas ( $p = 0,86$ ). Os pacientes com deleção de *GSTT1* tiveram sobrevida média de dezenove semanas, e os sem deleção, vinte e oito semanas ( $p = 0,0001$ ). A localização tumoral estava disponível para quarenta e quatro pacientes, e destes, vinte e nove, apresentavam tumor lobar, com sobrevida de trinta e três semanas, e quinze, tinham tumor profundo, com sobrevida de trinta e nove semanas ( $p = 0,03$ ). Os resultados deste estudo sugerem que a deleção de *GSTT1* pode estar inversamente relacionada à ocorrência de gliomas malignos, uma vez que nos pacientes a frequência de deleção foi significativamente menor do que no grupo controle. Estes resultados também sugerem que pacientes com tumores lobares apresentam menor sobrevida do que portadores de tumores profundos, e, que a ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* pode diminuir a sobrevida de pacientes com gliomas malignos.

**Palavras-chave** – Glutathione *S*-transferases – Polimorfismo genético – Gliomas – DNA circulante.

## ABSTRACT

Abstract of Dissertation submitted to the Post-Graduate Program in Clinical Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements necessary for obtaining the grade of Master in Clinical Medicine.

The enzymes GSTM1 (glutathione *S*-transferase mu one) and GSTT1 (glutathione *S*-transferase theta one) have important roles in cellular detoxification of various carcinogens. Their absence may facilitate tumors emergence. This paper investigates deletion of the genes which encode these enzymes (*GSTM1* and *GSTT1* genes respectively) in 95 patients with malignant gliomas and in a group of 100 people without cancer, comparing deletion frequencies between the two groups. In this study the relationship between deletion and survival time of patients was evaluated. It was also investigated the association between anatomical tumor location and survival. The genotyping was carried out by polymerase chain reaction. The results showed a *GSTM1* deletion frequency of 44% in patients and 54% in control group, although this difference was not statistically significant ( $p = 0.19$ ). It was found *GSTT1* deletion in 11.5% of patients and 36% of control subjects and this difference was statistically significant ( $p = 0,00009$ ). Patients with *GSTM1* deletion had median survival of 23 weeks and, without deletion, 31 weeks ( $p = 0.86$ ). Patients with *GSTT1* deletion had median survival of 19 weeks, and those with presence of *GSTT1*, 28 weeks ( $p = 0,0001$ ). The tumor location was available for 44 patients, and of these, 29 had lobar tumors with median survival of 33 weeks, and 15 had deep tumors, with survival of 39 weeks ( $p = 0.03$ ). Our results suggest that *GSTT1* deletion may be inversely related to the occurrence of malignant gliomas, since in the patients group, the frequency of deletion was significantly lower than in the control group. The results also suggest that patients with lobar tumors have lower survival than those with deep tumors, and, that the absence of *GSTM1* or *GSTT1* may decrease the survival of malignant glioma patients.

**Keywords** - Glutathione *S*-transferases - Genetic Polymorphism - Gliomas – Circulating DNA

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  |    |
| 1.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS  | 15 |
| 1.2 OS GENES <i>GSTT1</i> E <i>GSTM1</i>                           | 16 |
| 1.3 AS GLUTATIONA S-TRANSFERASES                                   | 17 |
| 1.3.1 A ENZIMA <i>GSTT1</i>  | 20 |
| 1.3.2 A ENZIMA <i>GSTM1</i>  | 20 |
| 1.4 O DNA CIRCULANTE   | 21 |
| 1.5 OS GLIOMAS MALIGNOS  | 23 |
| 1.5.1 OS ASTROCITOMAS  | 24 |
| 1.5.2 OS OLIGODENDROGLIOMAS  | 28 |
| 1.6 POLIMORFISMO DE <i>GSTT1</i> E <i>GSTM1</i> E GLIOMAS MALIGNOS | 29 |
| 1.7 A LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DOS GLIOMAS MALIGNOS                   | 29 |
| 1.8 FATORES AMBIENTAIS E OCORRÊNCIA DE GLIOMAS MALIGNOS            | 30 |
| 1.9 O QUIMIOTERÁPICO ÁLCOOL PERÍLICO                               | 31 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | 33 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 34 |
| 3.1 GRUPOS DE ESTUDO   | 34 |
| 3.2 O TRATAMENTO COM ÁLCOOL PERÍLICO                               | 34 |
| 3.3 A EXTRAÇÃO DO DNA DOS PACIENTES                                | 34 |
| 3.4 A EXTRAÇÃO DO DNA DOS CONTROLES                                | 35 |
| 3.5 A DETERMINAÇÃO DOS GENES <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>           | 35 |
| 3.5.1 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE            | 35 |
| 3.5.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA                        | 36 |
| 3.5.3 COLORAÇÃO DOS GÉIS PELO NITRATO DE PRATA                     | 36 |
| 3.5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA  | 37 |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | 38 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>   | 42 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>  | 44 |
| <b>7 REFERÊNCIAS</b>   | 45 |
| <b>8 APÊNDICES</b>   |    |
|  | 51 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Polimorfismos genéticos são variações nas sequências de DNA tais como: substituições, deleções/inserções de nucleotídeos, ou, duplicações/deleções de genes. Por definição, os polimorfismos ocorrem numa frequência populacional de pelo menos 1% (MILLER, 2001, p.270). A ocorrência de polimorfismos pode alterar a função das proteínas que são codificadas a partir da sequência do DNA polimórfico e, conseqüentemente, alterar também o fenótipo celular resultante. Os polimorfismos ocorrem, em sua maioria, fora das regiões codificantes dos genes e, neste caso, aparentemente não produzem efeito algum (MILLER, 2001, p.270). Caso o polimorfismo esteja localizado dentro de uma região codificante de um gene, pode haver substituição de aminoácidos no peptídeo codificado por esta região, resultando em alterações proteicas que podem modificar o metabolismo celular. Um polimorfismo dentro de uma região promotora pode alterar a taxa de transcrição do gene. A ocorrência de um polimorfismo localizado no limite entre um *exon* e um *intron* pode levar à produção de proteínas incompletas ou inativas, devido a falhas no processamento do RNA mensageiro. Polimorfismos caracterizados pela deleção total de um gene claramente eliminam qualquer atividade funcional da enzima por ele codificada. Por outro lado, polimorfismos que sejam duplicações de um gene inteiro podem resultar em níveis mais altos de atividade. Existem também substituições de aminoácidos que oriundas dos polimorfismos de nucleotídeo único, mais conhecidos pela sigla *SNPs* (do inglês *single nucleotide polymorphisms*). Alterações na função proteica podem produzir efeitos no fenótipo, que por vezes, são observados somente sob condições específicas, tais como exposição ambiental ou *stress* (MILLER, 2001, p.270).

Os polimorfismos nos genes que codificam enzimas atuantes no metabolismo de carcinógenos podem ser importantes na etiologia de diversos tipos de câncer, dentre os quais, os tumores de pulmão (CARLSTEN, 2008, p.767), de bexiga (FRANEKOVA, 2008, p.2) e os tumores gástricos (CHEN, 2010, p.564). Isto acontece porque a ausência de uma enzima de detoxicação celular, ou o seu funcionamento deficiente pode diminuir a capacidade de metabolizar carcinógenos, o que permite a ação lesiva de substâncias carcinogênicas sobre o DNA celular (AUTRUP, 2000, p.66), tornando aquele organismo potencialmente mais suscetível a desenvolver alguns tipos de tumores malignos, em especial aqueles que estão diretamente ligados à exposição ambiental.



## 1.2 OS GENES *GSTT1* E *GSTM1*

O gene *GSTT1* codifica a enzima GSTT1 (glutathione *S*-transferase teta 1) e está localizado no braço longo do cromossomo 22, precisamente na localização 22q11.23. Para o gene *GSTT1* têm sido descritos três alelos: o *GSTT1*\*A, e o *GSTT1*\*B, nos quais a enzima é codificada (McILWAIN, 2006, p.1642); e um alelo nulo denominado *GSTT1*\*0, que representa a deleção do gene e conseqüentemente a ausência de produção da enzima GSTT1 (HAYES, 2005, p.67). Os alelos *GSTT1*\*A e *GSTT1*\*B são diferentes por um polimorfismo de nucleotídeo único no *exon* 3, sendo que o primeiro codifica GSTT1\*A, a qual apresenta uma treonina no resíduo 104, e o segundo codifica GSTT1\*B, onde a treonina é substituída por uma prolina. A enzima produzida pelo alelo *GSTT1*\*B mostra uma atividade catalítica diminuída quando comparada com a codificada pelo gene *GSTT1*\*A, o que poderia ser atribuído à mudança conformacional induzida pela substituição da treonina por uma prolina (McILWAIN, 2006, p. 1642). O gene *GSTT1* apresenta uma extensão de 8,1 kb (LANDI, 2000, p.249). A figura 1 mostra a localização do gene *GSTT1*.



Figura 1 - Localização do gene *GSTT1* no cromossomo 22 (KENT, 2002, p.996).

A ocorrência do polimorfismo do tipo deleção é bastante frequente para o gene *GSTT1* nas diversas etnias já investigadas. Para populações de caucasianos foram encontrados em estudos realizados nos EUA, entre 15% e 16% de frequência de deleção e, na Europa, entre 11% e 18% (REBBECK, 1997, p.734). Para uma população africana encontrou-se 38% de deleção em investigação realizada na Nigéria, e, numa população de etnia chinesa um estudo descreveu 58% de deleção (REBBECK, 1997, p.734). Em uma investigação realizada na cidade do Rio de Janeiro com população local, oriunda de várias etnias, encontrou-se 25,4% de deleção do gene *GSTT1* (ROSSINI, 2002, p.233).

O gene *GSTM1*, por sua vez, codifica a enzima GSTM1 (glutathione *S*-transferase mi 1), e está localizado no braço curto do cromossomo 1, na localização 1p13.3. Estão descritos para o gene *GSTM1* quatro alelos diferentes: os alelos *GSTM1*\*A e *GSTM1*\*B, que codificam a enzima GSTM1 funcional com atividade normal; o alelo *GSTM1*\*0, onde ocorre a deleção do gene, e, portanto a enzima não é expressa; e o alelo *GSTM1*\*1x2, onde se observa uma superexpressão da enzima GSTM1 devida à duplicação do gene (HAYES, 2005, p.67). Os alelos *GSTM1*\*A e *GSTM1*\*B diferem por uma substituição na posição 519 de uma base “G”

no primeiro alelo por uma base “C” no último, o que não afeta a atividade da enzima que será codificada (HAYES, 2000, p.158). A figura 2 mostra a localização do gene *GSTM1*.



Figura 2 - Localização do gene *GSTM1* no cromossomo 1 (KENT, 2002, p.996).

Também para o gene *GSTM1* tem sido descrita uma alta frequência de deleção. Esta foi encontrada em 49% a 54% em caucasianos nos EUA, 38% a 62% em caucasianos europeus, 22% em nigerianos, 33% a 36% em populações de etnia indiana e entre 64% a 100% em populações nativas da Oceania (REBECK, 1997, p.734). Um estudo brasileiro encontrou 42,1% de frequência de deleção numa população de 591 pessoas residentes no Rio de Janeiro (ROSSINI, 2002, p.233).

É importante ressaltar que a população residente no Rio de Janeiro é altamente miscigenada por ter recebido esta cidade um grande contingente de imigrantes oriundos de diversas nações localizadas na Europa, África e Ásia, além da presença marcante de nativos indígenas na formação de sua população. Acrescente-se a isto a vinda para o Rio de Janeiro de milhões de brasileiros nascidos em outros estados da federação nas últimas décadas do século XX. Tudo isto conferiu a esta cidade um caráter altamente miscigenado e uma variabilidade genética incomum, o que obviamente influencia as frequências de deleção dos genes em estudo.

### 1.3 AS GLUTATIONA S-TRANSFERASES

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem um grupo de enzimas multifuncionais que apresentam papel fundamental na fase II das reações de detoxicação celular. Elas são muito importantes para a metabolização de xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), incluindo os carcinógenos. As GSTs catalisam a conjugação de compostos reativos gerados na fase I com a glutathione reduzida, formando compostos mais hidrossolúveis e facilmente excretáveis pelo organismo (PARL, 2005, p.123). A glutathione é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, que é produzido no ambiente intracelular onde exerce diversas funções importantes (ANDERSON, 1998, p.2). A estrutura química da molécula de glutathione pode ser observada na figura 3.

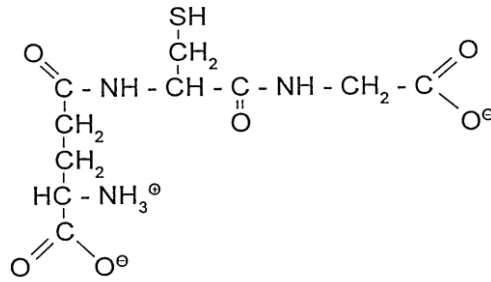


Figura 3 – Estrutura química da molécula de Glutationa (ANDERSON, 1998, p.2).

As GSTs são proteínas muito abundantes no organismo, correspondendo a cerca de 4% do total de proteínas solúveis encontradas no fígado humano (EATON, 1999, p.156). As diferenças qualitativas e quantitativas da ocorrência das GSTs em diferentes órgãos são de particular interesse, uma vez que, podem causar suscetibilidade diferencial dos tecidos aos efeitos tóxicos dos xenobióticos (COMMANDEUR, 1995, p.283). Estas proteínas são de estrutura dimérica, com peso molecular de aproximadamente 25 kDa e são encontradas no citoplasma, nos microsossomos e também nas mitocôndrias (LANDI, 2000, p.248). Dentro das células são montadas combinações homo e heterodiméricas de subunidades de GSTs, estas combinações ocorrem unicamente entre subunidades de uma mesma classe (ROWE, 1997, p.481). As GSTs detoxicam compostos eletrofílicos, tais como: carcinógenos, drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos do estresse oxidativo (CARLSTEN, 2008, P.760). Alternativamente, o produto da conjugação com a glutatona é excretado através da bile ou da urina como ácido mercaptúrico (MAUGARD, 1998, p.366). Além de catalisar reações de conjugação, redução e isomerização, as GSTs citosólicas também se ligam de forma covalente ou não covalente a ligantes hidrofóbicos. Este tipo de atividade contribui para o transporte intracelular, sequestro e distribuição de xenobióticos e hormônios (HAYES, 2005, p.61). Além do seu importante papel na fase II da detoxicação celular, as GSTs são capazes de modular a indução de outras enzimas e proteínas importantes para a fisiologia celular, como é o caso das enzimas de reparo de DNA. Desta forma, participam da manutenção da integridade genômica e, por isto, apresentam relevância na suscetibilidade ao câncer (CARLSTEN, 2008, p.760). A regulação das GSTs citosólicas está sujeita a um complexo conjunto de parâmetros endógenos e exógenos; estes fatores incluem sexo, fatores teciduais específicos, bem como um grande número de agentes xenobióticos, tais como, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, antioxidantes fenólicos, espécies reativas de oxigênio e outros (HAYES, 1995, p.512). As GSTs são do interesse de farmacologistas e toxicologistas porque proveem alvos farmacológicos para tratamentos contra asma e também contra o câncer, além de metabolizar

agentes quimioterápicos antitumorais e muitos outros compostos químicos (HAYES, 2005, p.52). As glutathione *S*-transferases têm emergido como alvos terapêuticos promissores porque isoenzimas específicas (tais como as GSTs) estão superexpressas em uma grande variedade de tumores, e, podem ser importantes na etiologia de outras doenças, tais como, esclerose múltipla, doença neurodegenerativa e asma (TOWSEND, 2003, p.7372). Linhagens celulares tumorais resistentes a quimioterápicos têm mostrado uma superexpressão de isoenzimas GSTs. Esta superexpressão leva a uma acelerada detoxicação da droga e, conseqüentemente, leva à aquisição de resistência à mesma (McILWAIN, 2006, p.1639). Em humanos, as glutathione *S*-transferases são divididas em oito classes que recebem seus nomes com o uso de letras do alfabeto grego, sendo conhecidas como: *alfa*, *mi*, *teta*, *pi*, *zeta*, *sigma*, *kapa* e *qui* (também chamada de *ômega*) (FRANEKOVA, 2008, p.2). Esta classificação está baseada no compartilhamento de mais de 60% de identidade dentro de cada classe, no que diz respeito à sequência de aminoácidos (McILWAIN, 2006, p.1639), bem como à especificidade por substratos, afinidade química e comportamento cinético da enzima (LANDI, 2000, p.248). A figura 4 mostra uma representação esquemática das reações de detoxicação celular com suas respectivas fases I, II e III. Nesta representação, é ressaltada a conjugação pela glutathione, embora existam vários outros tipos de reações de conjugação que ocorrem no ambiente intracelular.

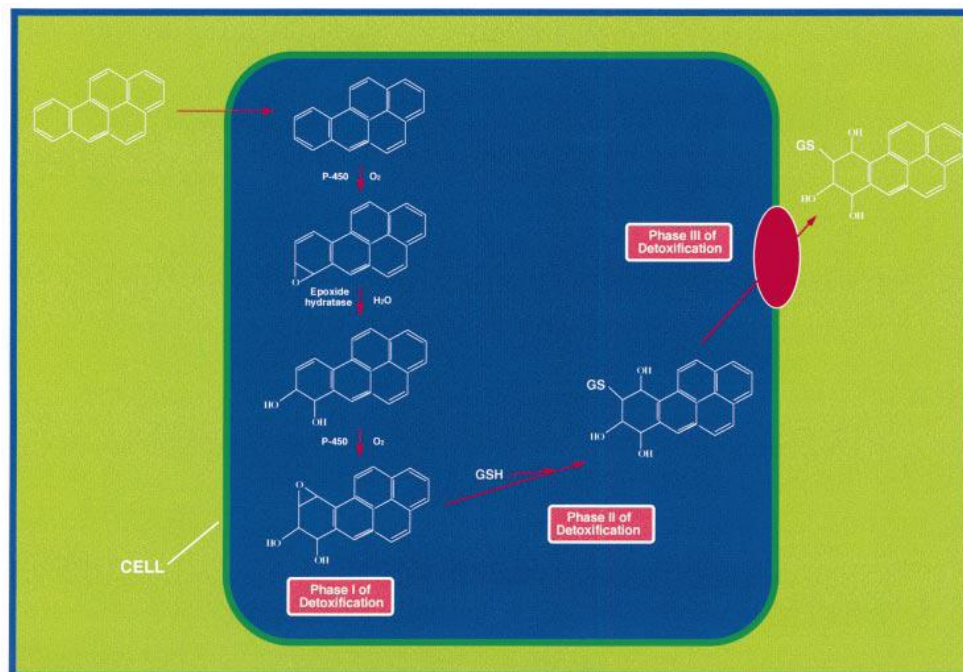


Figura 4 - Vista geral das reações de detoxicação. Uma molécula de benzopireno é detoxicada pela célula através da conjugação com a glutathione, e, em seguida, é eliminada para fora da célula (SHEEHAN, 2001, p.2).

### 1.3.1 A ENZIMA GSTT1

A GSTT1 humana é uma enzima homodimérica onde cada subunidade apresenta 25,3 kDa de peso molecular (LANDI, 2000, p.249). Esta enzima detoxica alguns hidrocarbonetos reativos, tais como o óxido de etileno (JEONG, 2003, p.194). A GSTT1 também está envolvida no metabolismo de diversos outros agentes químicos, tais como, agentes metilantes, pesticidas e solventes industriais. Estudos *in vitro* sugerem que a GSTT1 protege as células de produtos tóxicos gerados nas reações da fase I da detoxicação celular (RAIMONDI, 2006, p.1028). No organismo humano a enzima GSTT1 é expressa em diversos tecidos: nos pulmões, intestinos, cérebro, sangue, rins e fígado, dentre outros (LANDI, 2000, p.273). A figura 5 mostra uma representação da estrutura tridimensional da enzima GSTT1.

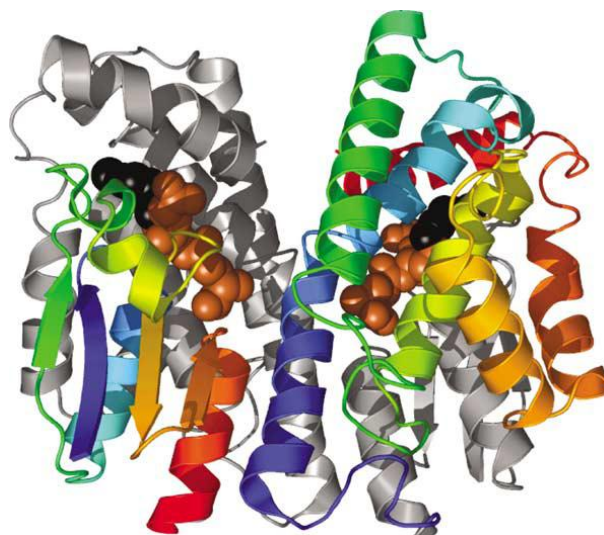


Figura 5 – Representação tridimensional da glutatona *S*-transferase *teta* 1 humana (TARS, 2005, p.98).

A ausência da expressão de GSTT1 tem sido associada ao risco de câncer de bexiga (SRIVASTAVA, 2004, p.430), de cavidade oral (SREELEKHA, 2001, p.597), e de pulmão (HOSGOOD, 2007, p.137). Também se acredita que possa influenciar a suscetibilidade ao meningioma (LAI, 2005, p.1784), e parece estar relacionada a um aumento no risco de se desenvolver leucemia mielóide aguda (YE, 2005, p.980).

### 1.3.2 A ENZIMA GSTM1

A enzima GSTM1 catalisa a detoxicação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos oriundos da combustão de substâncias orgânicas que reconhecidamente são

agentes mutagênicos e estão presentes na fumaça gerada pelas indústrias, nos gases emitidos por veículos automotores, bem como na fumaça produzida pela queima do tabaco (AUTRUP, 2000, p.69), (BELPOMME, 2007, p.419). Por estar envolvida na detoxicação do benzopireno e de outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no cigarro, a GSTM1 tem sido objeto de diversos estudos relacionando a sua ausência com neoplasias malignas ligadas ao hábito tabágico, dentre as quais, o câncer de pulmão e o de bexiga (CARLSTEN, 2008, 759), (ENGEL, 2002, p.96). Na literatura científica também se sugere que pessoas com deleção do gene *GSTM1* (e que, portanto não apresentam expressão da enzima GSTM1) estão em risco aumentado para desenvolver câncer de estômago (CHEN, 2010, p.564). A figura 6 mostra uma representação tridimensional da enzima GSTM1.

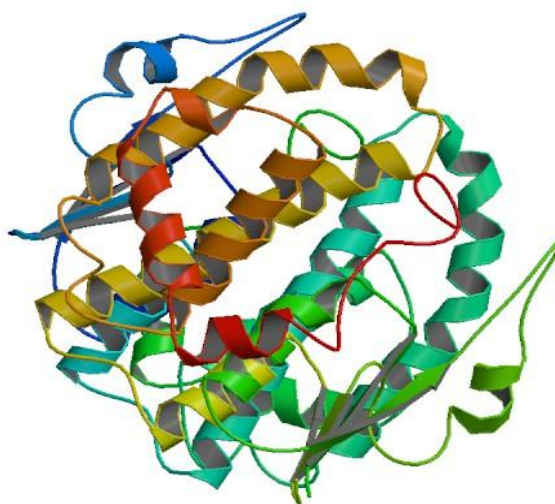


Figura 6 – Representação tridimensional da glutatona S-transferase M1A humana (*Protein Data Bank*).

#### 1.4 O DNA CIRCULANTE

Entende-se por DNA circulante aquele que se encontra circulando livre no plasma ou soro sanguíneos, exteriormente à célula (FLEISCHHACKER, 2007, p.181). Sabe-se que o DNA circulante pode ser encontrado tanto em condições patológicas, quanto em condições favoráveis de saúde (STROUN, 2000, p.161). A presença de DNA extracelular no plasma sanguíneo foi inicialmente descrita em 1948 (LO, 2001, p.2). Em 1977 foi descrito que pacientes portadores de câncer apresentavam níveis aumentados de concentração de DNA circulante no soro sanguíneo (LEON, 1977, p.646). Foi descrito também que pacientes com doença metastática apresentavam níveis ainda mais aumentados deste tipo de DNA, sendo que, em alguns casos, os níveis de DNA circulante decresciam após terapia bem sucedida contra o câncer (LEON, 1977, p.646). Posteriormente, em 1989, Stroun e colaboradores



encontraram no DNA circulante em plasma sanguíneo de pacientes com câncer, as mesmas características encontradas no DNA das células tumorais, sugerindo que este DNA circulante era de origem tumoral (STROUN, 1989, p.318). Isto veio a ser confirmado anos mais tarde quando foram publicados dois trabalhos que relatavam a presença de mutações associadas ao tumor no DNA circulante de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica, leucemia mielogênica aguda (VASIOUKHIN, 1994, p.774) e câncer pancreático (SORENSEN, 1994, p.67). Diversas alterações têm sido detectadas em DNA circulante, tais como: mutações pontuais, alterações de microsatélite, polimorfismos de nucleotídeo único, sequências hipermetiladas, sequências de rearranjo genômico, bem como a presença de DNA viral (FLEISCHHACKER, 2007, p.188). Num estudo realizado na Itália, com cento e quarenta e dois pacientes portadores de linfomas de diversos tipos, foram encontrados níveis de DNA circulante em plasma sanguíneo significativamente maiores ( $p < 0,01$  para todos os tipos estudados) do que em indivíduos controle saudáveis, conforme pode ser observado na figura 7 (HOHAUS, 2009, p.1408).

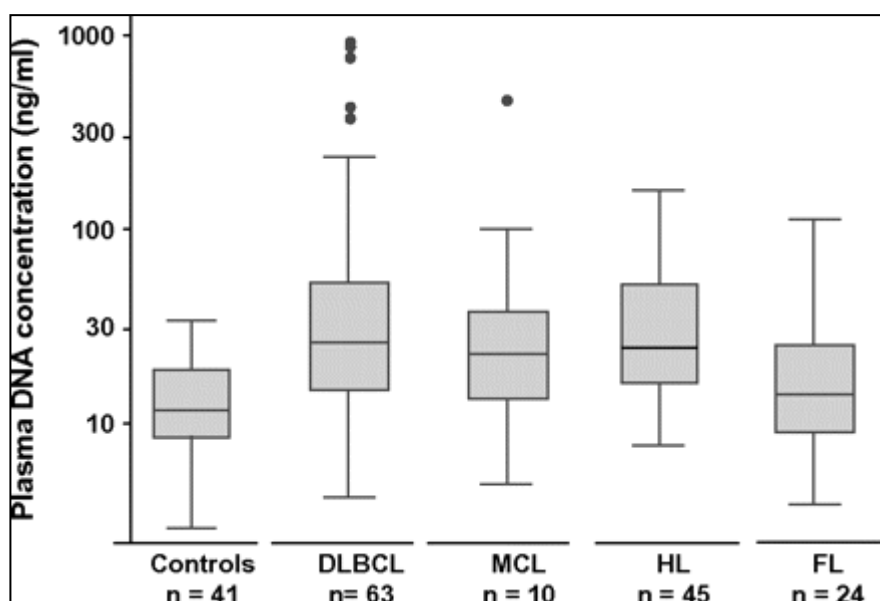


Figura 7 - Níveis de DNA circulante em plasma sanguíneo em controles saudáveis e em portadores de linfomas. DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*); MCL (*mantle cell lymphoma*); FL (*follicular lymphoma*); HL (*Hodgkin's lymphoma*), (HOHAUS, 2009, p.1408).

Todo este conhecimento científico sugere que alterações no DNA circulante em plasma sanguíneo poderiam ser possíveis biomarcadores para o diagnóstico de câncer. Além disto, o sangue periférico, donde se obtém o plasma, é de coleta simples, rápida e pouco

invasiva. É um dos anseios antigos da medicina o desenvolvimento de um teste sanguíneo de execução simples que permita o diagnóstico de câncer em estágios iniciais (SIDRANSKY, 2000, p.3).

### 1.5 OS GLIOMAS MALIGNOS

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são relativamente raros, estando entre 1% e 2%, aproximadamente, de todos os neoplasmas malignos. Dentre os tumores do SNC, os gliomas são os mais frequentes (MUNSHI, 2009, p.127). Gliomas são tumores que se originam nas células da glia, as quais são as células-suporte do SNC e apresentam grande versatilidade. Estas células desempenham funções de suma importância tais como: migração, proteção neural, proliferação, orientação axonal e efeitos tróficos (NDUBAKU, 2007, p.182). Os gliomas malignos são caracterizados por crescimento invasivo e difuso e, podem exibir diversos graus de diferenciação dentro de um mesmo tumor (RAMNARAYAN, 2007, p.49), (KYRITSIS, 2009, p.104), sendo um grupo heterogêneo de tumores neuroectodermiais. Os gliomas podem apresentar crescimento lento ou rápido e, são mais frequentemente diagnosticados em homens do que em mulheres (BENSON, 2008, p.185), (OHGAKI, 2005, p.96). Os gliomas são agrupados de acordo com sua origem celular, e recebem um grau com base nas suas características histopatológicas. Astrócitos, oligodendrócitos, e células endimiais são os tipos celulares da glia, os quais podem originar respectivamente os astrocitomas, os oligodendrogliomas e os endimomas (GRIER, 2006, p.681). Estes gliomas correspondem a mais de 70% de todos os tumores cerebrais (OHGAKI, 2005, p.93), cuja incidência tende a ser maior nos países desenvolvidos e industrializados, em relação aos países em desenvolvimento (OHGAKI, 2005, p.94). A figura 8 mostra, a nível mundial, a incidência e a mortalidade dos tumores do SNC. A carcinogênese dos gliomas envolve uma complexa combinação de características genéticas constitutivas que predisõem ao câncer em associação com fatores de risco ambiental e alterações genéticas somáticas que ocorrem no curso da vida. Esta combinação de alterações pode conduzir as células gliais a uma proliferação anormal e à transformação maligna (KYRITSIS, 2009, p.104). Nos últimos anos têm sido encontradas diversas alterações cromossômicas, genéticas e epigenéticas (estas últimas são alterações que ocorrem na expressão do gene, sem que a sequência do DNA esteja alterada) que estão associadas aos diferentes tipos histológicos e graus de malignidade dos gliomas (SARKAR, 2009, p.108).



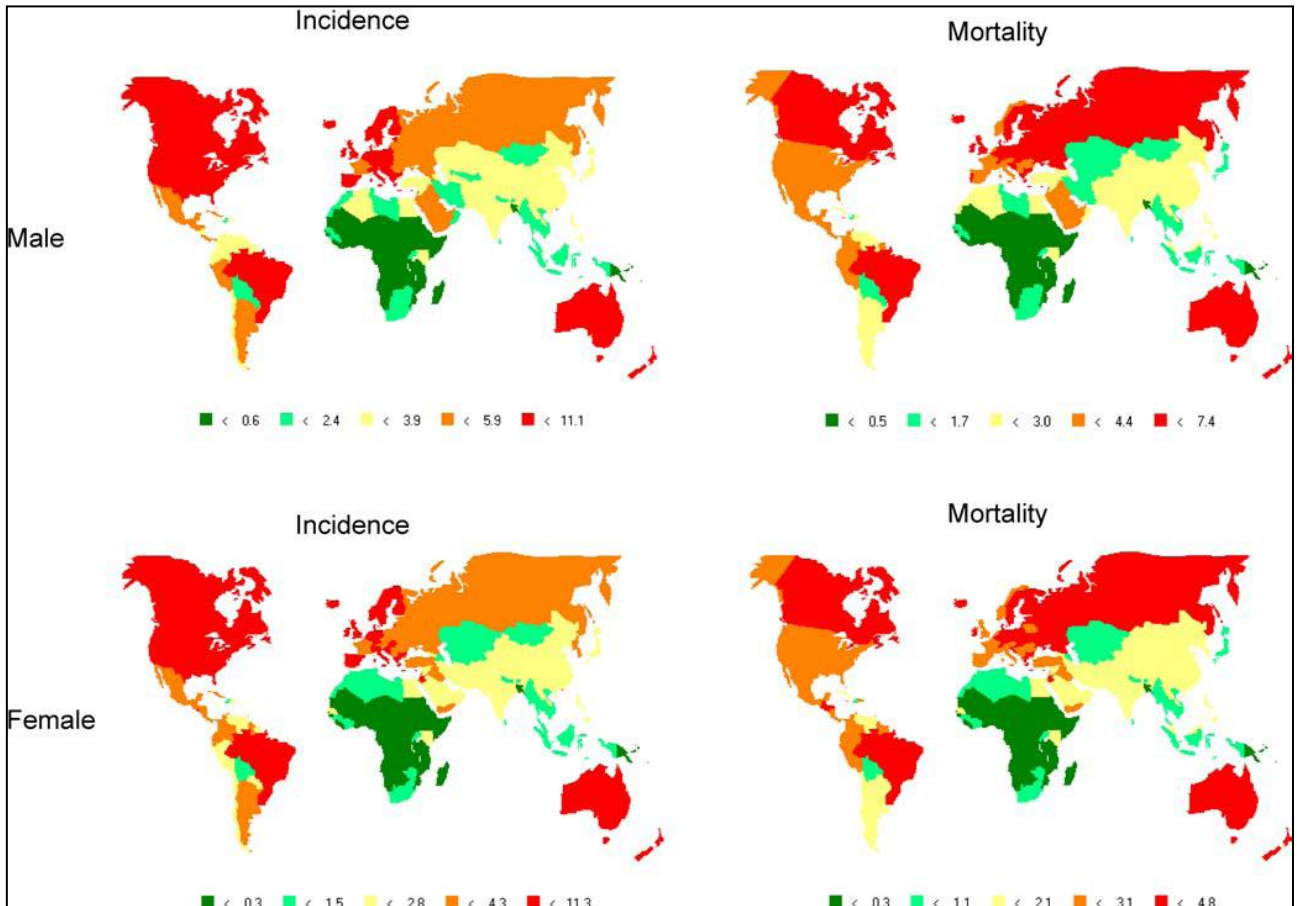


Figura 8 - Incidência mundial e mortalidade dos tumores do sistema nervoso central por 100.000 pessoas por ano (OHGAKI, 2005, p.94).

### 1.5.1 OS ASTROCITOMAS

Dentre os gliomas malignos, os astrocitomas são os tumores que apresentam maior frequência, correspondendo a mais de 50% dos casos (SARKAR, 2009, p.109). A figura 9 mostra a incidência dos astrocitomas em vários países e regiões do mundo. De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), dentro dos astrocitomas podem ser destacadas as seguintes subdivisões: astrocitoma pilocítico (OMS grau I), astrocitoma difuso (OMS grau II), astrocitoma anaplásico (OMS grau III) e glioblastoma multiforme (OMS grau IV). O glioblastoma multiforme (GBM) corresponde ao astrocitoma de grau IV, mas recebe nomenclatura diferenciada por possuir características muito específicas (SARKAR, 2009, p.109).

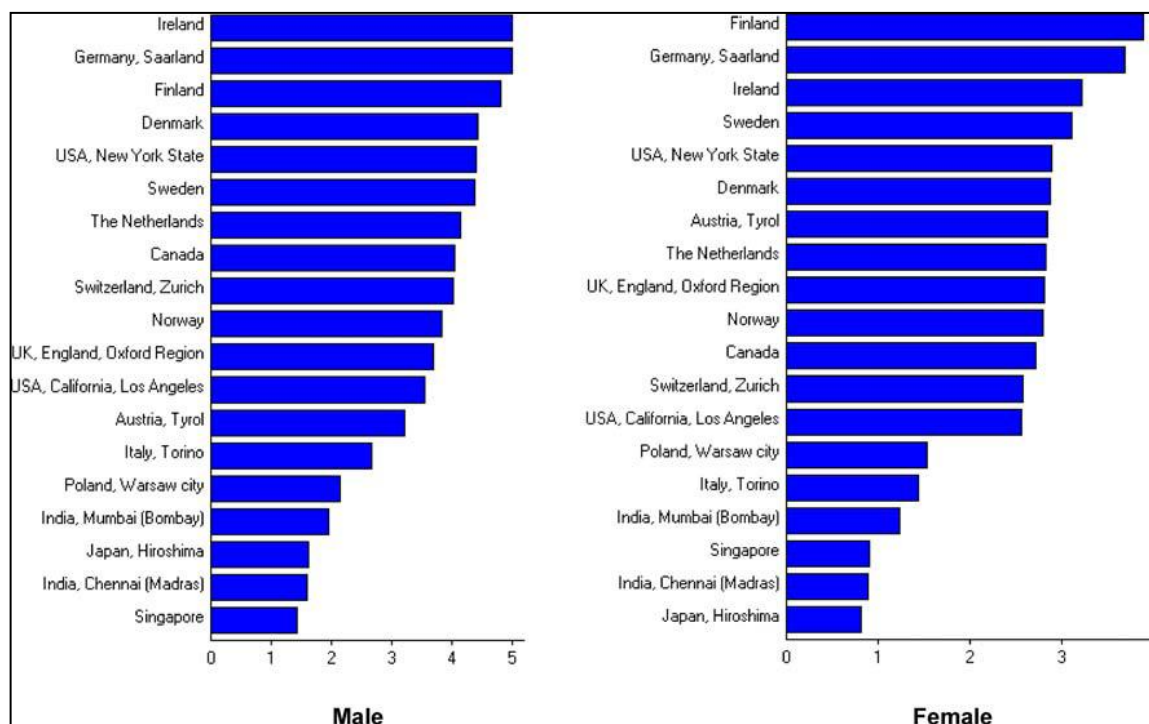


Figura 9 - Taxas de incidência de astrocitomas em vários países e regiões do mundo por cem mil pessoas por ano (OHGAKI, 2005, p. 95).

Os astrocitomas pilocíticos (OMS grau I) são relativamente circunscritos, apresentam crescimento lento, ocorrendo em crianças e adultos jovens e afetam mais comumente o cerebelo. Histologicamente os astrocitomas de grau I apresentam padrão bifásico. Sua frequência é de 5% a 6% de todos os tumores cerebrais (SARKAR, 2009, p.109). A média de idade em que é diagnosticado o astrocitoma pilocítico é de dezessete anos (OHGAKI, 2005, p.96), e a taxa de sobrevivência é considerada alta para gliomas malignos, com mais de 80% dos pacientes ainda vivo dez anos após o diagnóstico (GRIER, 2006, p.687).

Os astrocitomas difusos (OMS grau II) são infiltrantes, em geral acometem adultos jovens, na terceira ou quarta década de sua vida (SMITS, 2002, p.253-254). Apresentam-se como massas nos hemisférios cerebrais, com epicentro repousando predominantemente na massa branca do cérebro, embora também seja comum o envolvimento do córtex. Estes tumores são caracterizados pelo alto grau de diferenciação e pelo crescimento lento, todavia, apresentam tendência intrínseca à progressão maligna para astrocitomas anaplásicos e por fim para glioblastomas.

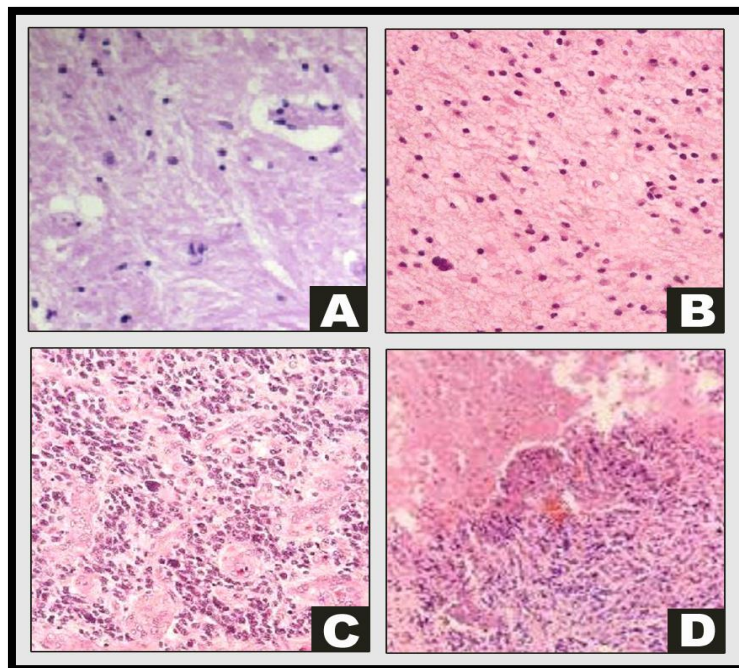


Figura 10: Imagem de corte histopatológico de tecido corado com hematoxilina-eosina. **A** – tecido sadio caracterizado por camada endotelial única; **B** – Astrocitoma difuso (grau II), caracterizado por aumento de células gliais com atipia nuclear; **C** - Astrocitoma anaplásico (grau III) caracterizado por hiperplasia de células gliais e atipia nuclear; **D** - Glioblastoma multiforme (grau IV) caracterizado por proliferação vascular, aspecto glomerulóide e necrose endotelial única. (FISCHER, JSG 2010)

A incidência dos astrocitomas difusos corresponde de 10% a 15% de todos os tumores cerebrais (SARKAR, 2009, p.109). A média de idade em que é feito o diagnóstico é de quarenta e sete anos e a sobrevida média está em torno de setenta e sete meses (OHGAKI, 2005, p.96).

Os astrocitomas anaplásicos (OMS grau III) localizam-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais, semelhantemente aos astrocitomas difusos, porém ocorrem numa faixa etária um pouco mais elevada (de 45 a 50 anos). A sobrevida média dos pacientes está em torno de trinta meses (OHGAKI, 2005, p.96). Eles são histologicamente caracterizados por apresentarem atipia nuclear, aumento de celularidade e significativa atividade proliferativa. Os astrocitomas anaplásicos tendem a progredir para glioblastomas secundários (REIFENBERGER, 2004, p. 659).

Os glioblastomas multiformes (OMS grau IV) podem se desenvolver em qualquer idade, mas a grande maioria dos glioblastomas ocorre em pacientes adultos, com pico de incidência entre cinquenta e setenta anos (REIFENBERGER, 2004, p.659).

Microscopicamente, os glioblastomas são tumores altamente anaplásicos, compostos por células de morfologias distintas. A atipia nuclear é geralmente marcante, e, uma intensa atividade mitótica incluindo formas atípicas é uma característica proeminente. A presença de proliferação microvascular patológica e/ou necrose é essencial para o diagnóstico (REIFENBERGER, 2004, p.659). Os glioblastomas podem ser de origem primária, se desenvolvendo de forma muito rápida, sem nenhuma evidência clínica, radiológica ou morfológica de terem progredido a partir de astrocitomas de grau menor. Podem também ser de origem secundária, desenvolvendo-se a partir de astrocitomas de baixo grau ou anaplásicos (KLEIHUES, 1999, p.44). Em relação a pacientes portadores de outros tumores cerebrais, pacientes portadores de GBM apresentam as piores taxas de sobrevida em todas as faixas etárias (WRENSCH, 2002, p.282), e a despeito dos avanços nas técnicas de cirurgia, radioterapia e quimioterapia para tumores cerebrais, a sobrevida destes pacientes ainda permanece extremamente pobre (OHGAKI, 2004, p.6896) estando a sobrevida média em torno de sete meses (HESS, 2004, p.2295).

A figura 11 mostra a imagem de um glioblastoma multiforme recorrente em tomografia computadorizada.



Figura 11 – Imagem de tomografia computadorizada exibindo um glioblastoma multiforme (FONSECA, 2005, p.S1:6)

### 1.5.2 OS OLIGODENDROGLIOMAS

Os oligodendrogliomas (OD) são tumores infiltrantes e difusos (SARKAR, 2009, p.112) que se originam nos oligodendrócitos. Recebem o grau II na classificação da OMS. Eles podem ocorrer em qualquer localização, porém quase nunca são encontrados no tronco cerebral, no cerebelo ou na medula espinhal. Eles são bastante incomuns em crianças. A maioria dos oligodendrogliomas de grau II se apresenta como massas localizadas nos hemisférios cerebrais em adultos jovens ou pessoas de meia idade. O prognóstico é significativamente melhor que o dos astrocitomas (PERRY, 2003, p.173). A sobrevida média dos pacientes é de cerca de cento e cinco meses (HESS, 2004, p.2295).

Os oligodendrogliomas com características focais ou difusas de malignidade e com prognóstico menos favorável são classificados como oligodendrogliomas anaplásicos (OMS grau III), e ocorrem aproximadamente de sete a oito anos mais tarde que os de grau II. Estes tumores desenvolvem-se preferencialmente no lobo frontal, e com menor frequência no lobo temporal. O oligodendroglioma anaplásico (OA) pode ocorrer como progressão de um OD de grau II, bem como pode se desenvolver sem nenhuma evidência de haver progredido de um tumor de menor grau pré-existente. As características do OA ligadas à malignidade são: elevada celularidade, atipia citológica marcante, alta atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose (SARKAR, 2009, p.112). O prognóstico para os portadores de OA é bem pior do que o esperado para os pacientes com OD de grau II, estando a sobrevida média para os pacientes com OA em 36 meses (HESS, 2004, p.2295).

A figura 12 exhibe um oligodendroglioma anaplásico em imagem de ressonância magnética.

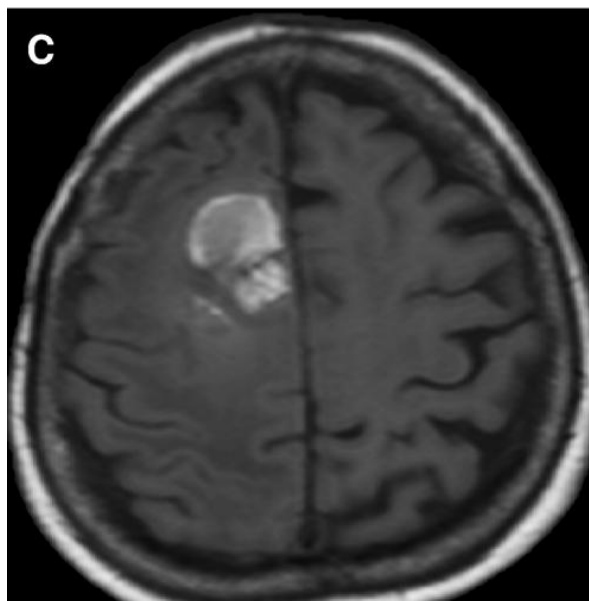


Figura 12 - Oligodendroglioma anaplásico em imagem de ressonância magnética (FONSECA, 2006, p.613).

#### 1.6 POLIMORFISMO DE *GSTT1* E *GSTM1* E GLIOMAS MALIGNOS

Tem sido descrita na literatura científica uma possível associação entre o polimorfismo em genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos e uma maior suscetibilidade aos gliomas malignos (OHGAKI, 2005, p.102). Um estudo de caso-controle realizado nos EUA mostrou um aumento no risco de oligodendrogliomas associado com a deleção de *GSTT1* (OHGAKI, 2005, p.102). Em outro trabalho foi encontrado um aumento significativo na frequência do alelo não deletado do gene *GSTM1* em astrocitomas pediátricos de alto grau, sugerindo que o polimorfismo deste gene possa executar algum papel na suscetibilidade a tumores cerebrais desta natureza (EZER, 2002, p.133).

#### 1.7 A LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DOS GLIOMAS MALIGNOS

Os gliomas tipicamente desenvolvem-se na substância branca lobar, ou na substância cinzenta profunda do cérebro (RAMNARAYAN, 2007, p.49). Estudos baseados em modelos matemáticos de proliferação e migração de gliomas têm levantado a hipótese da existência de padrões diferenciados para tumores de localização lobar em contraste com os de localização profunda (FONSECA, 2009, p.558). De acordo com estes estudos, o crescimento dos gliomas malignos que se desenvolvem na substância cinzenta profunda do cérebro apresenta um intervalo de tempo maior, quando comparado ao observado para os tumores da substância branca lobar, onde a migração e a invasão seriam mais rápidas (FONSECA, 2010, p.8). A hipótese levantada por modelos matemáticos tem sido confirmada por estudos experimentais

com pacientes (RAMNARAYAN, 2007, p.49), (FONSECA, 2009, p.557) onde se tem provado que independentemente do tamanho do tumor ao tempo do diagnóstico, os gliomas de alto grau localizados na substância cinzenta profunda estão relacionados a um maior tempo de sobrevida quando comparados aos tumores que se localizam na substância branca lobar (FONSECA, 2009, p.558).

Neste estudo foi levada em consideração a localização anatômica dos gliomas dos pacientes para os quais se dispunha desta informação para avaliar se, neste grupo de pacientes, seria confirmada a tendência demonstrada na literatura científica de uma maior sobrevida para os portadores de gliomas com localização profunda.

## 1.8 FATORES AMBIENTAIS E OCORRÊNCIA DE GLIOMAS MALIGNOS

A influência dos fatores ambientais na gênese de diversas neoplasias malignas já é conhecida há décadas, especialmente por meio de estudos epidemiológicos que trabalham com quantidades expressivas de pacientes, minimizando possíveis vieses experimentais. Pode-se citar como exemplo a relação entre o câncer de pulmão e o hábito tabágico, que é um fator ambiental já de muito tempo identificado como o principal fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia (CARLSTEN, 2008, p.760), (DANAIEI, 2005, p.1787). A estreita relação entre a influência de fatores ambientais e o desenvolvimento de tumores malignos ressalta a importância da ação das enzimas de detoxicação (dentre elas a *GSTT1* e a *GSTM1*). Essas enzimas atuam na proteção da integridade genômica catalisando o metabolismo de substâncias carcinogênicas, que, caso não fossem excretadas, poderiam causar lesões no DNA celular. Estes danos poderiam acumular-se dando início a um clone tumoral. Desta forma, o estudo da frequência de deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* está inserido no contexto da relação entre carcinogênese e ação de fatores ambientais. O fato de estes genes apresentarem altas taxas de deleção nas populações já estudadas realça a relevância deste tipo de investigação, uma vez que, em todo o mundo, grandes parcelas da população apresentam deleção de pelo menos um destes genes. No que diz respeito aos tumores cerebrais, ainda se sabe pouco sobre sua etiologia, e o único fator de risco já estabelecido é a exposição à radiação ionizante terapêutica utilizada para tratar alguns tumores que ocorrem em crianças (FISHER, 2007, p.877). Em particular, crianças tratadas com radiação X para leucemia linfoblástica aguda mostram um risco significativamente elevado para desenvolver gliomas e tumor neuroectodermal primitivo (OHGAKI, 2005, p.93). Portanto existe um campo aberto para a pesquisa de outros fatores ambientais que possam



estar envolvidas no desenvolvimento destes tumores. Apesar de não serem conhecidos, é muito provável que existam outros fatores ambientais importantes para a carcinogênese dos tumores cerebrais, em especial os gliomas que são os de maior frequência. Esta hipótese é reforçada pelo conhecimento que já existe de que os países de maior industrialização apresentam níveis bem mais altos de incidência de gliomas malignos.

### 1.9 O QUIMIOTERÁPICO ÁLCOOL PERÍLICO

O álcool perílico (AP) é um composto natural com propriedades quimioterápicas. Em contraste com os quimioterápicos de uso corrente, os compostos naturais inibem a proliferação de células transformadas e normalizam a atividade dos sinais envolvidos no crescimento celular, tais como: instabilidade genética, expressão anormal de genes, transdução anormal de sinal, comunicação intercelular anormal e angiogênese, sem destruir as propriedades estruturais das células normais (FONSECA et al, 2003, p.51). Também chamado de 4-isopropenil-ciclohexanocarbinol, o AP é um monoterpeneo, consistindo de duas unidades isoprênicas formadas pela via do mevalonato (BELANGER, 1998, p.448). Ele é encontrado em pequenas concentrações nos óleos essenciais de alguns vegetais, tais como, hortelã, cerejas, sementes de aipo, cominho, e várias outras plantas (KELLOFF, 1996, p.9). Em estudos com animais, o AP tem provocado a regressão de tumores de pâncreas, de mama, e de fígado; e tem se mostrado um possível agente quimiopreventivo para câncer de cólon, pele e pulmão. Nestes estudos, observou-se a possibilidade de o AP ser usado como um agente quimioterápico para neuroblastoma, câncer de próstata e câncer de cólon. O álcool perílico é ativo em induzir apoptose em células tumorais sem afetar as células normais, e pode reverter células tumorais a um estado anterior diferenciado (BELANGER, 1998, p.448). Embora o mecanismo pelo qual o AP exerça sua atividade anticancerígena ainda não esteja claramente elucidado, diversas atividades potencialmente importantes relacionadas a esta droga têm sido observadas em estudos pré-clínicos, incluindo efeitos celulares tais como uma parada precoce da fase G1 do ciclo celular e a indução de apoptose, efeitos bioquímicos tais como a inibição da modificação pós-translacional de proteínas envolvidas na transdução de sinal e na regulação gênica diferencial (FONSECA, 2006, p.S1:5). Foi observado *in vitro* que o álcool perílico inibe seletivamente pequenas proteínas G, incluindo o proto-oncogene p21-*ras*, através do bloqueio pós-translacional da isoprenilação. Isoprenilação é a ligação pós-translacional de grupamentos isoprenóides a proteínas-alvo específicas. A isoprenilação é crucialmente importante para o tráfego e sinalização de proteínas celulares (COLE; VASSAR,



2008, p.118). Proteínas *ras* não isopreniladas não se associam com a membrana plasmática e são incapazes de promover transformação celular (AZZOLI, 2003, p.494).

A administração do álcool perfílico pela via intranasal apresenta diversas vantagens, dentre as quais, o fato de ser um método rápido, confortável e não invasivo (o que facilita a adesão ao tratamento por parte do paciente), a rica vasculatura e alta permeabilidade da mucosa nasal que acentuam a absorção do agente terapêutico, o fato de ultrapassar a barreira hemato-encefálica reduzindo a exposição do SNC a efeitos colaterais sistêmicos, o fato de não requerer nenhuma modificação do agente terapêutico, a rapidez com que os níveis sistêmicos e a atividade farmacológica são alcançados (FONSECA et al, 2007, p.12). O potencial antitumoral do álcool perfílico contra GBM foi avaliado num estudo conduzido por Fonseca e colaboradores onde quatro pacientes portadores de glioblastomas multiformes recorrentes receberam administração de álcool perfílico por via intranasal, e, após três meses de tratamento, três destes pacientes mostravam um tamanho de tumor estável, sugerindo uma inibição no crescimento tumoral (FONSECA, 2006, p.S1:6).

## 2 OBJETIVOS

### **Objetivo principal:**

Este trabalho explora a relação entre a deficiência de proteção enzimática celular, carcinogênese de gliomas malignos e sobrevida de pacientes portadores destas neoplasias após quimioterapia com o álcool perfílico. A importância deste estudo é corroborada pelo fato de apresentarem os gliomas malignos, na maioria das vezes, um mau prognóstico, com sobrevida curta e, em geral, qualidade de vida bastante ruim.

### **Objetivos secundários:**

- 1 - Determinar as frequências do polimorfismo do tipo deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em noventa e cinco pacientes portadores de gliomas malignos e cem indivíduos saudáveis.
- 2 – Comparar as frequências de deleção de ambos os grupos para avaliar se a ocorrência de gliomas malignos pode ter relação com a deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1*.
- 3– Avaliar se o tempo de sobrevida dos pacientes está relacionado com a deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1*.
- 4 – Para os pacientes cuja localização tumoral está disponível, avaliar se o tempo de sobrevida têm relação com a localização anatômica do tumor.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 GRUPOS DE ESTUDO**

Este é um estudo do tipo caso-controle, onde o grupo de pacientes é composto de noventa e cinco portadores de gliomas malignos recorrentes que foram arrolados para esta investigação pelo Laboratório de Patologia Celular (Universidade Federal Fluminense), que atuou em conjunto com o Laboratório de Controle da Expressão Gênica (Universidade Federal do Rio de Janeiro), onde foi desenvolvido este trabalho. Dentre os pacientes havia cinquenta e dois homens e quarenta e três mulheres, com idades variando entre 19 e 83 anos (idade média: 53,4 anos). Dos noventa e cinco pacientes, setenta e um foram diagnosticados com glioblastoma multiforme, treze com astrocitoma anaplásico e onze com oligodendroglioma. Os tumores foram detectados através de tomografia computadorizada e/ou imagem de ressonância magnética, e o diagnóstico foi realizado por exame histopatológico. O grupo controle era composto de cem indivíduos saudáveis, trinta e seis homens e sessenta e quatro mulheres, com idades variando entre 20 e 97 anos (idade média: 42,4 anos). Os pacientes e os indivíduos controles assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participarem do estudo (vide apêndice B). Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 25000.009267/2004-25), tendo sido a sua aprovação lavrada no parecer N° 1336/2004 desta comissão.

#### **3.2 O TRATAMENTO COM ÁLCOOL PERÍLICO**

Os pacientes deste estudo foram tratados com o álcool perílico, um composto natural com propriedades quimioterápicas. A administração do álcool perílico foi realizada por via intranasal (inalação), na dose de 55 mg quatro vezes ao dia, totalizando 220 mg/dia.

#### **3.3 A EXTRAÇÃO DO DNA DOS PACIENTES**

Após a coleta do sangue periférico dos pacientes portadores de gliomas malignos foi feita a separação do plasma sanguíneo através de centrifugação. A partir do plasma fez-se a extração do DNA circulante com o uso do kit comercial “QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood mini kit”, do fabricante QIAGEN, de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante.

### 3.4 A EXTRAÇÃO DO DNA DOS CONTROLES

Foi coletado o escovado da mucosa oral fazendo-se movimentos giratórios de fricção na face interna de ambas as bochechas dos indivíduos controle. A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rebello & Carvalho (REBELLO, 2008, p.165), onde cada escova contendo o material biológico foi mergulhada num tubo cônico de centrifugação de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão de lise celular (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 10mM; NaCl 10mM; SDS 2%) e 15µL de proteinase K a 10 mg/mL. Para retirar o material biológico da escova foram feitos movimentos circulares desta contra a parede interna do tubo. O material foi então incubado por duas horas a 56°C. Após a incubação acrescentou-se 500µL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) a cada tubo, e agitou-se por cerca de um minuto. Depois da agitação os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM durante cinco minutos. Em seguida retirou-se a fase aquosa (fase superior) de cada tubo e transferiu-se para outro tubo onde foram acrescentados 15 µL de NaCl 5M e 1.000 µL de etanol a 95%, misturando-se o conteúdo do tubo por inversão. O material foi então incubado a -20°C por no mínimo uma hora e centrifugado durante vinte minutos a 8.000 RPM. Após esta centrifugação o sobrenadante de cada tubo foi aspirado e os tubos foram mantidos abertos para secagem à temperatura ambiente. Por fim, o *pellet* de DNA foi ressuspenso em 26µL de água milli-Q e estocado a -20°C para uso posterior.

### 3.5 A DETERMINAÇÃO DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1*

#### 3.5.1 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

A deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi detectada através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex. Na reação de PCR, além dos genes em estudo, também foi usado o gene *p53* (*exon 5*) como um controle interno para confirmar a eficácia da extração e da amplificação do DNA. As sequencias dos iniciadores usados na reação de PCR podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores usados na genotipagem

| Gene         | Iniciador                                    | Tamanho do produto amplificado |
|--------------|--|--------------------------------|
| <i>GSTM1</i> | (D) 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'             | 220 pb                         |
|              | (R) 5' GTGGGCTCAAATATACGGTGG 3'              |                                |
| <i>GSTT1</i> | (D) 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'            | 450 pb                         |
|              | (R) 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'               |                                |
| <i>p53</i>   | (D) 5' GCAACCAGCCCTGTCGTGTCTCCA 3'           | 274 pb                         |
|              | (R) 5' GGAATTCTGTTCACCTTGTGCCCTGACTTTCAAC 3' |                                |

Para a amplificação foi utilizada a metodologia descrita por Joseph e colaboradores (JOSEPH, 2006, p.413) com algumas adaptações, onde inicialmente foi feita uma etapa de desnaturação do DNA a 95°C por cinco min., seguida de trinta ciclos de 95°C por trinta seg., 64°C por um min., e 72°C por um min. Isto foi seguido por uma etapa de extensão final de 72°C por cinco min.

### 3.5.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O produto amplificado da PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na concentração de 10%. Em todos os géis, aplicou-se em um dos poços o padrão de DNA *100 bp ladder*<sup>®</sup> da Invitrogen, e nos demais poços, as amostras do produto amplificado da PCR.

### 3.5.3 COLORAÇÃO DOS GÉIS PELO NITRATO DE PRATA

Após a eletroforese do produto de PCR os géis foram corados pelo método do nitrato de prata, que consiste numa etapa inicial de fixação do DNA onde o gel é banhado por dez

minutos em uma solução de 0,8% de ácido acético glacial e 10% de etanol absoluto em água destilada, seguida por uma etapa de impregnação pelo nitrato de prata numa concentração de 0,2% em água destilada por dez minutos após a qual se lava com água destilada por 15 seg. para retirar o excesso de nitrato de prata, e por fim o gel é banhado na solução de revelação composta de Na OH a 3% e formaldeído a 0,8% em água até o nítido aparecimento das bandas.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa SPSS versão 15.0 foi utilizado para a realização da análise de dados deste estudo. O Teste Exato de Fisher (bicaudal) e o *Odds Ratio* foram utilizados para comparar os dois grupos (pacientes e indivíduos controle) de acordo com os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*. Para determinar a associação entre os genótipos e idade, sexo, e tipo tumoral utilizou-se o Teste Exato de Fisher (bicaudal). O Teste-G para amostras independentes (Williams) foi usado para determinar a relação entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* e a sobrevida média dos pacientes e também a relação entre a localização tumoral e a sobrevida. Para analisar a associação entre sobrevida acumulada e os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, bem como a relação entre sobrevida acumulada e localização tumoral foi utilizado o estimador Kaplan-Meier.

## 4 RESULTADOS

A figura 14 mostra a imagem de um dos géis que foram preparados na parte experimental deste estudo. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são visualizados respectivamente como bandas de 220 e de 450 pares de bases (pbs) e o gene *p53* (exon 5) como uma banda de 274 pbs.

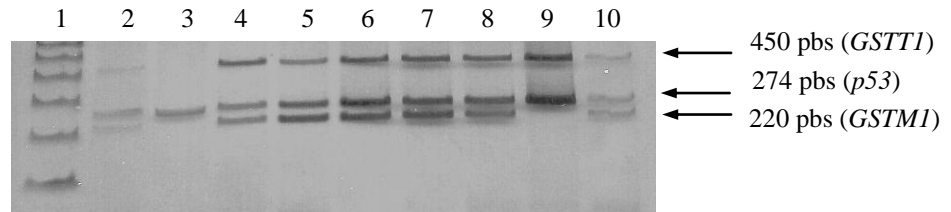


Figura 13 – Raia 1: 100 bp ladder; raias 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 10: sem deleção de *GSTT1* ou *GSTM1*; raia 3: deleção de *GSTT1* e *GSTM1*; raia 9: deleção de *GSTM1*

As frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nos pacientes e nos indivíduos controle são mostradas na tabela 2. Encontrou-se deleção de *GSTM1* em 42 (44%) pacientes e em 54 (54%) indivíduos controle, porém esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ( $p = 0,19$ ). Entretanto, a deleção de *GSTT1* foi detectada em 11 (12%) dos pacientes e em 36 (36%) dos indivíduos controle. Esta diferença se mostrou altamente significativa ( $p = 0,00009$ ).

Tabela 2 - Frequências de *GSTM1* e *GSTT1* em 95 pacientes e 100 indivíduos controle

| Genótipos                | Pacientes n (%) | Controles n (%) | Odds Ratio         | Valor p  |
|--------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------|
| <i>GSTM1</i> nulo        | 42 (44)         | 54 (54)         | 0.67 (0.38 - 1.18) | 0.19     |
| <i>GSTM1</i> presente    | 53 (56)         | 46 (46)         | 1.00 (referência)  |          |
| <i>GSTT1</i> nulo        | 11 (12)         | 36 (36)         | 0.23 (0.11- 0.49)  | 0.00009  |
| <i>GSTT1</i> presente    | 84 (88)         | 64 (64)         | 1.00 (referência)  |          |
| <i>GSTM1/T1</i> nulo     | 3 (3)           | 20 (20)         | 0.10 (0.02 - 0.36) | 0.000085 |
| <i>GSTM1/T1</i> presente | 45 (47)         | 30 (30)         | 1.00 (referência)  |          |

Realizou-se a análise da relação entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* e idade, sexo e tipo tumoral. Estes resultados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Frequências de *GSTMI* e *GSTTI* em relação à idade, gênero e tipo tumoral em pacientes com gliomas e indivíduos controle

|                     | Pacientes<br>(N = 95) | Controles<br>(N = 100) | <i>GSTMI</i> nulo |           | <i>GSTMI</i> presente |           | <i>GSTTI</i> nulo |           | <i>GSTTI</i> presente |           | <i>GSTMI/TI</i> nulo |           | <i>GSTMI/TI</i> presente |           |
|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-----------|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|-----------------------|-----------|----------------------|-----------|--------------------------|-----------|
|                     |                       |                        | Pacientes         | Controles | Pacientes             | Controles | Pacientes         | Controles | Pacientes             | Controles | Pacientes            | Controles | Pacientes                | Controles |
| <b>Idade</b>        |                       |                        |                   |           |                       |           |                   |           |                       |           |                      |           |                          |           |
| <50 anos            | 35 (36.8)             | 56 (56.0)              | 18 (18.9)         | 32 (32.0) | 17 (17.9)             | 24 (24.0) | 4 (4.2)           | 23 (23.0) | 31 (32.6)             | 33 (33.0) | 2 (2.1)              | 14 (14.0) | 15 (15.8)                | 15 (15.0) |
| ≥50 anos            | 60 (63.2)             | 44 (44.0)              | 24 (25.3)         | 22 (22.0) | 36 (37.9)             | 22 (22.0) | 7 (7.4)           | 13 (13.0) | 53 (53.8)             | 31 (31.0) | 1 (1.0)              | 6 (6.0)   | 30 (31.6)                | 15 (15.0) |
| <i>P</i> valor      | 0.0096                |                        | 0.149             |           | 0.065                 |           | 0.164             |           | 0.094                 |           | 1                    |           | 0.228                    |           |
| <b>Gênero</b>       |                       |                        |                   |           |                       |           |                   |           |                       |           |                      |           |                          |           |
| Masculino           | 52 (54.7)             | 36 (36.0)              | 23 (24.2)         | 19 (19.0) | 29 (30.5)             | 17 (17.0) | 5 (5.3)           | 13 (13.0) | 47 (49.5)             | 23 (23.0) | 0 (0)                | 7 (7.0)   | 24 (25.3)                | 11 (11.0) |
| Feminino            | 43 (45.3)             | 64 (64.0)              | 19 (20.0)         | 36 (36.0) | 24 (25.3)             | 28 (28.0) | 6 (6.3)           | 24 (24.0) | 37 (38.9)             | 40 (40.0) | 3 (3.2)              | 13 (13.0) | 21 (22.1)                | 18 (18.0) |
| <i>P</i> valor      | 0.0097                |                        | 0.062             |           | 0.107                 |           | 0.724             |           | 0.029                 |           | 0.525                |           | 0.237                    |           |
| <b>Tipo tumoral</b> |                       |                        |                   |           |                       |           |                   |           |                       |           |                      |           |                          |           |
| GBM                 | 71 (74.7)             |                        | 35 (36.8)         |           | 36 (37.9)             |           | 6 (6.3)           |           | 55 (57.9)             |           | 1 (1.0)              |           | 31 (32.6)                |           |
| AA                  | 13 (13.7)             |                        | 3 (3.2)           |           | 10 (10.5)             |           | 4 (4.2)           |           | 9 (9.5)               |           | 2 (2.1)              |           | 8 (8.4)                  |           |
| OA                  | 11 (11.6)             |                        | 4 (4.2)           |           | 7 (7.4)               |           | 1 (1.0)           |           | 10 (10.5)             |           | 0 (0)                |           | 6 (6.3)                  |           |
| <i>P</i> valor      |                       |                        | 0.170             |           |                       |           | 0.171             |           |                       |           | 0.170                |           |                          |           |

GBM: glioblastoma multiforme, AA: astrocitoma anaplásico, OA: oligodendroglioma anaplásico



Com relação à sobrevida média, os pacientes sem deleção de *GSTM1* ou *GSTT1* mostraram um aumento quando comparados aos pacientes com deleção. Os pacientes com deleção de *GSTM1* apresentaram sobrevida de 23,2 semanas, e os sem deleção, 31,3 semanas, todavia esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ( $p = 0,86$ ). Os pacientes com *GSTT1* ausente tiveram sobrevida média de 18,7 semanas, e os que apresentavam *GSTT1* presente, 28,4 semanas, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0001$ ). As taxas de sobrevida foram calculadas através do estimador Kaplan-Meier e as curvas podem ser observadas na figura 14.

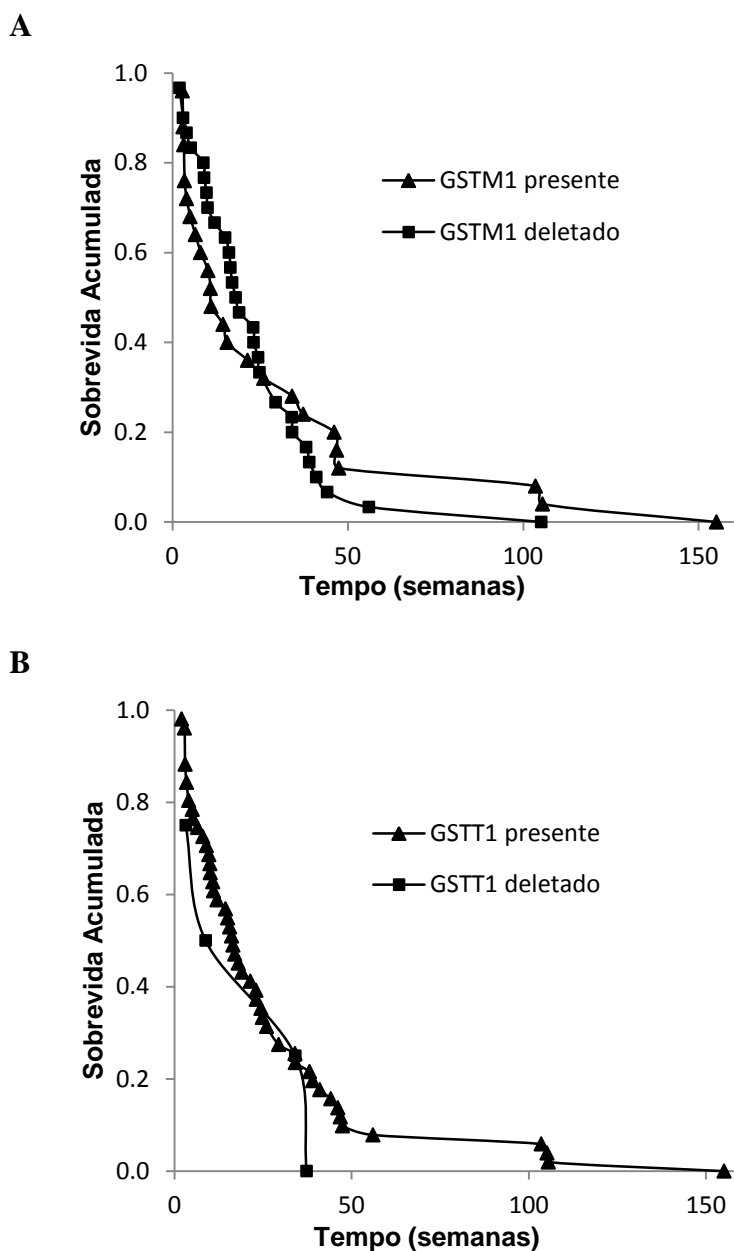


Figura 14 - Curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com os genótipos *GSTM1* (A) e *GSTT1* (B)

A influência da localização anatômica do tumor sobre o tempo de sobrevida média dos pacientes também foi investigada neste estudo. A localização tumoral estava disponível para quarenta e quatro pacientes, e destes, 29 apresentavam tumores lobares com sobrevida de 33 semanas. Tumores profundos foram encontrados em 15 pacientes com sobrevida de 39 semanas. Esta diferença nos tempos de sobrevida é estatisticamente significativa ( $p = 0,03$ ). O gráfico de Kaplan-Meier visualizado na figura 15 mostra as curvas de sobrevida dos pacientes com tumores profundos e lobares.

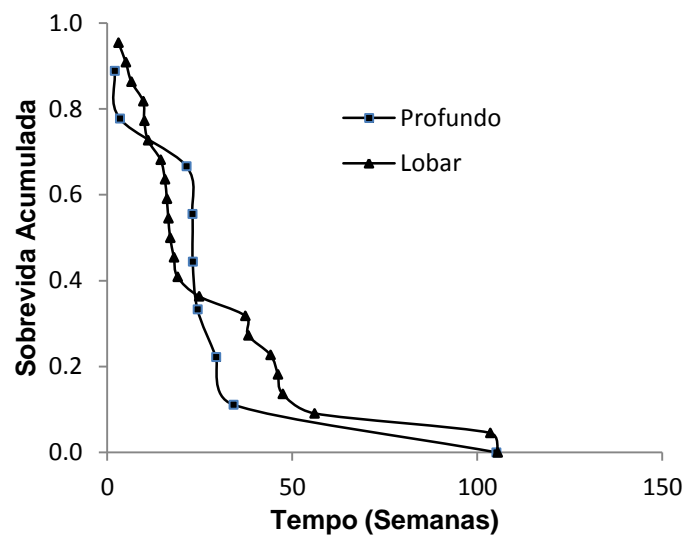


Figura 15 - Curvas de sobrevida de quarenta e quatro pacientes de acordo com a localização tumoral

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a ocorrência de gliomas malignos não está relacionada à deleção de *GSTM1*. Foi detectada a deleção deste gene em 44% dos pacientes, e em 54% dos indivíduos pertencentes ao grupo controle. Todavia, feita a análise estatística, esta diferença não se mostrou significativa ( $p = 0,19$ ). Este resultado está de acordo com o que foi encontrado por Wiencke e colaboradores num estudo que comparava a prevalência da deleção de *GSTM1* em 158 pacientes com gliomas malignos e em 157 indivíduos controle, mostrando que a prevalência era similar tanto em casos (53%) quanto em controles (50%), *Odds Ratio* = 1,1; IC de 95% = 0,7 – 1,7 (WIENCKE, 1997, p.1431). Por outro lado, num estudo conduzido por Ezer e colaboradores foi mostrada uma significativa diminuição na frequência de deleção de *GSTM1* em astrocitomas pediátricos de alto grau (35% de deleção em pacientes e 49% nos controles,  $p < 0,002$ ), no entanto, esta diferença não foi observada entre adultos (54% em pacientes e 49% em controles,  $p = 0,14$ ) (EZER, 2002, p.128). Os resultados que encontramos para gliomas malignos diferem do que é descrito em alguns artigos a respeito da deleção de *GSTM1* em pacientes portadores de tumores de bexiga (ENGEL, 2002, p.104), pulmão (CARLSTEN, 2008, p.766) e estômago (CHEN, 2010, p. 562). Nesses trabalhos foi relatada uma possível associação positiva entre a deleção de *GSTM1* e a ocorrência de tais tumores.

Neste estudo foi encontrada a frequência de deleção de 12% para o gene *GSTT1* nos pacientes portadores de gliomas malignos e de 36% nos indivíduos do grupo controle. Esta diferença se mostrou altamente significativa ( $p = 0,00009$ ), sugerindo uma provável associação negativa entre a deleção de *GSTT1* e a ocorrência de gliomas malignos. Num trabalho conduzido por Ezer e colaboradores foram descritos 13% de deleção de *GSTT1* num grupo de 220 pacientes com tumores cerebrais, majoritariamente gliomas; e 18% no grupo controle ( $p = 0,054$ ) (EZER, 2002, p.129). Okeu e colaboradores encontraram 16% de deleção de *GSTT1* em 278 portadores de gliomas malignos num estudo apenas com pacientes (OKEU, 2004, p.2620). Em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, com 591 voluntários sem história de câncer, Rossini encontrou 25,4% de deleção do gene *GSTT1* (ROSSINI, 2002, p.233). Nosso resultado para gliomas difere do que foi descrito em artigos que correlacionam positivamente a deleção de *GSTT1* com um risco aumentado para os tumores de bexiga (SRIVASTAVA, 2001, p.430), cavidade oral (SREELEKHA, 2001, p.597) e pulmão (HOSGOOD, 2007, p.134). Acredita-se que a ausência deste gene também possa estar

relacionada a um risco aumentado para meningioma (LAI, 2005, p.1784). Em um estudo do tipo caso-controle, Cabral e colaboradores não acharam associação entre a deleção de *GSTT1* e o desenvolvimento de câncer de pulmão (41% nos pacientes e 47,2% nos indivíduos controle,  $p = 0,52$ ) (CABRAL, 2010, p.265).

No tocante à localização dos gliomas, observou-se neste estudo uma diminuição na sobrevida de pacientes com tumores de localização lobar (33 semanas) em relação aos que portavam tumores profundos (39 semanas), e esta diferença se mostrou estatisticamente significativa ( $p = 0,03$ ). O aumento da sobrevida nos pacientes com gliomas de localização profunda já tem sido descrito na literatura científica. Em um estudo com 67 portadores de gliomas malignos, Fonseca e colaboradores encontraram uma sobrevida significativamente maior ( $p = 0,0093$ ) em pacientes com tumores situados na substância cinzenta profunda cérebro do que em portadores de tumores lobares (FONSECA, 2009, p.557). Outro estudo conduzido por Ramnarayan avaliou 121 portadores de gliomas malignos, e seus resultados sugerem que pacientes com tumores localizados na substância cinzenta profunda apresentam sobrevida significativamente maior do que portadores de tumores com localização lobar ( $p = 0,0083$ ) (RAMNARAYAN, 2007, p.49). Estes dois trabalhos mostram resultados que reforçam o que encontramos, confirmando a tendência de maior tempo de sobrevida nos pacientes com gliomas de localização profunda, quando comparados aos portadores de tumores lobares.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi encontrada uma frequência de deleção de *GSTM1* de 44% nos pacientes e, de 54% no grupo controle, não sendo significativa essa diferença ( $p = 0,19$ ).
- Encontrou-se deleção de *GSTT1* em 11,5% dos pacientes e em 36% dos indivíduos controle, sendo esta diferença significativa ( $p = 0,00009$ ).
- Os resultados deste estudo sugerem que a deleção de *GSTT1* está inversamente relacionada à ocorrência dos gliomas investigados.
- Para os pacientes deste estudo, a deleção de *GSTT1* está associada à uma menor sobrevida ( $P = 0,0001$ ).
- Em confirmação ao que tem sido descrito na literatura científica, mostramos que a sobrevida de pacientes com gliomas de localização na massa cinzenta profunda é maior do que a de pacientes com tumores localizados na massa branca lobar.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, Clare, v.111-112, p.1-14, 1998.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutation Research**, Amsterdam, v.464, p.65-76, 2000.
- AZZOLI, C.G. et al. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Heidelberg, v.51, p.493-498, 2003.
- BELANGER, J.T. Perillyl alcohol: applications in oncology. **Alternative Medicine Review**, Napa, v.3, p.448-457, 1998.
- BELPOMME, D. et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environmental Research**, Amsterdam, v.105, p.414-429, 2007.
- BENSON, V.S. et al. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours Million Women Study cohort. **British Journal of Cancer**, London, v.99, p.185-190, 2008.
- CARLSTEN, C. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic huge review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.167, p.759-774, 2008.
- CHEN, B. et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and gastric cancer: an updated analysis. **Archives of Medical Research**, New York, v.41, p.558-566, 2010.
- COLE, S.L.; VASSAR, R. Intraneuronal  $\beta$ -amiloid-induced neurodegeneration and Alzheimer's dementia. In: SUN, M.K. (Ed.). **Research progress in Alzheimer disease and dementia**. New York: Nova Science Publisher Inc. 2008. V.3, p.118.
- COMMANDEUR, J.N.M.; STIJNTJES, G.J.; VERMEULEN, N.P.E. Enzymes and transport system involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v.47, p.271-330, 1995.
- DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioral and environmental risk factors. **Lancet**, London, v.366, p.1784-1793, 2005.
- EATON, D.L.; BRAMMLER, T.K. Concise review of glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **TOXICOLOGICAL SCIENCES**, Reston, v.49, p.156-164, 1999.
- ENGEL, L.S. et al. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.156, p.95-109, 2002.
- EZER, R. et al. Identification of glutathione S-transferase (GST) polymorphisms in brain tumors and association with susceptibility to pediatric astrocytomas. **Journal of Neuro-Oncology**, Dordrecht, v.59, p.123-134, 2002.

FISHER, J.L. et al. Epidemiology of brain tumors. **Neurologic Clinics**, Philadelphia, v.25, p.867-890, 2007.

FLANAGAN, J.U. et al. A homology model for the human theta-class glutathione transferase T1-1. **PROTEINS: Structure, Function and Genetics**, New York, v.33, p.444-454, 1998.

FLEISCHHACKER, M.; SCHMIDT, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – A survey. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1775, p.181-232, 2007.

FONSECA, C.O. et al. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. **Surgical Neurology**, New York, v.66, p.611-615, 2006.

FONSECA, C.O. et al. Correlação da topografia tumoral e edema peritumoral com a resposta terapêutica à administração intranasal do álcool perfílico nos gliomas malignos recidivos. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, São Paulo, v.29, p.7-13, 2010.

FONSECA, C.O. et al. Correlation of tumor topography and peritumoral edema of recurrent malignant gliomas with therapeutic response to intranasal administration of perillyl alcohol. **Invest New Drugs**, Dordrecht, v.27, p.557-564, 2009.

FONSECA, C.O. et al. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. **Surgical Neurology**, New York, v.65, p.S1:2-S1:9, 2006.

FONSECA, C.O.; SANTOS, T.Q.; FERNANDES, J.; CARVALHO, M.G.C.; GATASS, C.R. Biologia molecular dos glioblastomas: perspectivas terapêuticas do monoterpeneo álcool perfílico. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, São Paulo, v.14, p.46-54, 2003.

FRANEKOVA, M. et al. Gene polymorphisms in bladder cancer. **Urologic Oncology**, New York, v.26, p.1-8, 2008.

GRIER, J.T.; BATCHELOR, T. Low-grade gliomas in adults. **The Oncologist**, Durham, v.11, p.681-693, 2006.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.45, p.51-88, 2005.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, London, v.30, p.445-600, 1995.

HAYES, J.D.; STRANGE, R.C. Glutathione *S*-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, Basel, v.61, p.154-166, 2000.

HESS, K.R.; BROGLIO, K.R.; BONDY, M.L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. **Cancer**, Heboken, v.101, p.2293-2299, 2004.

HOHAUS, S. et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. **Annals of Oncology**, Oxford, v.20, p.1408-1413, 2009.

HOSGOOD, H.D.; BERNDT, S.I.; LAN, Q. GST genotypes and lung cancer susceptibility in Asian populations with indoor air pollution exposures: a meta-analysis. **Mutation Research**, Amsterdam, v.636, p.134-143, 2007.

JEONG, H.J. et al. Association between glutathione *S*-transferase M1 and T1 polymorphisms and increased risks for bladder cancer in Korean smokers. **Cancer Letters**, Clare, v.202, p.193-199, 2003.

JOSEPH, T. et al. Germline genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian cervical cancer: associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. **Gynecologic Oncology**, New York, v.101, p.411-417, 2006.

KELLOFF, G.J. et al. New agents for cancer chemoprevention, **Journal of Cellular Biochemistry**, Heboken, v.26S, p.1-28, 1996.

KENT, W. J.; SUGNET, C.W.; FUREY, T.S.; ROSKIN, K.M.; PRINGLE, T.H.; ZAHLER, A.M.; HAUSSLER, D. The Human Genome Browser at UCSC, **Genome Research**, New York, v.12, p.996-1006, 2002. Disponível em <<http://genome.ucsc.edu>>. Acesso em 13 jan. 2011.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, Houston, v.1, p.44-51, 1999.

KYRITSIS, A. P. et al. Inherited predisposition to glioma. **Neuro-Oncology**, Houston, v.12, p.104-113, 2009.

LAI, R.; CREVIER, L.; THABANE, L. Genetic polymorphisms of glutathione *S*-transferase and the risk of adult brain tumors: a meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v.14, p.1784-1790, 2005.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v.463, p.247-283, 2000.

LEON, S.A. et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. **Cancer Research**, Philadelphia, v.37, p.646-650, 1977.

LISKA, D.J. The detoxification enzyme systems. **Alternative Medicine Review**, Napa, v.3, p.187-198, 1998.

LO, Y.M.D. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.945, p.1-7, 2001.

MAUGARD, C.M.; CHARRIER, J.; BIGNON, YJ. Allelic deletion at glutathione *S*-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. **Chemico-Biological Interactions**, Clare, v.111-112, p.365-375, 1998.

Mc ILWAIN, C.C.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Glutathione *S*-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene**, London, v.25, p.1639-1648, 2006.

MILLER, M.C.; MOHRENWEISER, H.W.; BELL, D.A. Genetic variability in susceptibility



and response to toxicants. **Toxicology Letters**, Clare, v.120, p.269-280, 2001.

MUNSHI, A.; JALALI, R. Therapy for glioma: Indian perspective. **Indian Journal of Cancer**, Mumbai, v.46, p.127-131, 2009.

NDUBAKU, U.; BELLARD, M.E. Glial cells: old cells with new twists. **Acta histochemica**, Amsterdam, v.110, p.182-195, 2007.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Research**, Philadelphia, v.64, p.6892-6899, 2004.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v.109, p.93-108, 2005.

PARL, F.F. Glutathione *S*-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, Clare, v.221, p.123-129, 2005.

PERRY, A. Pathology of low-grade gliomas: an update of emerging concepts. **Neuro-Oncology**, Houston, v.5, p.168-178, 2003.

RAIMONDI, S. et al. Meta- and pooled analysis of *GSTT1* and lung cancer: a HuGE-GSEC review. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.164, p.1027-1042, 2006.

RAMNARAYAN, R. et al. Overall survival in patients with malignant glioma may be longer with tumors located in deep grey matter. **Journal of Neurological Sciences**, Amsterdam, v.260, p.49-56, 2007.

REBBECK, T.R. Molecular epidemiology of the human glutathione *S*-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.6, p.733-743, 1997.

REBELLO, A.S.; CARVALHO, M.G.C. Metodologia para estudo do polimorfismo do gene da enzima álcool desidrogenase. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.7, p.163-168, 2008.

REIFENBERGER, G.; COLLINS, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v.82, p.656-670, 2004.

RIPPLE, G.H. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.6, p.390-396, 2000.

ROSSINI, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.1, p.233-240, 2002.

ROWE, J.D.; NIEVES, E.; LISTOWSKY, I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione *S*-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. **Biochemical Journal**, London, v. 325, p.481-486, 1997.

SARKAR, C.; JAIN, A.; SURI, V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas.

**Indian Journal of Cancer**, Mumbai, v.46, p.108-119, 2009.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, London, v.360, p.1-16, 2001.

SIDRANSKY, D. Circulating DNA, what we Know and what we need to learn. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v.906, p.1-4, 2000.

SMITS, A. Low-grade gliomas: clinical and pathobiological aspects. **Histology and Histopathology**, Murcia, v.17, p.253-260, 2002.

SORENSEN, G.D. et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v.3, p.67-71, 1994.

SREELEKHA, T.T. et al. Genetic polymorphism of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian oral cancer. **Oral Oncology**, London, v.37, p.593-598, 2001.

SRIVASTAVA, D.S.L.; MITTAL, A.K.B.; MITTAL, R.D. Polymorphism of *GSTM1* and *GSTT1* genes in bladder cancer: a study from North India. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.78, p.430-434, 2004.

STRANGE, R.C. et al. Glutathione *S*-transferase family enzymes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 482, p.21-26, 2001.

STROUN, M. et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. **Oncology**, Basel, v.46, p.318-322, 1989.

STROUN, M. et al. The origin and mechanism of circulating DNA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.906, p.161-168, 2000.

TARS, K. et al. Structural basis of suppressed catalytic activity of wild-type human glutathione transferase T1-1 compared to its W234R mutant. **Journal of Molecular Biology**, London, v.355, p.96-105, 2006.

TOWSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of glutathione-*S*-transferase in anti cancer drug resistance. **Oncogene**, New York, v.22, p.7369-7375, 2003.

VASIOUKHIN, V. et al. Point mutations of the *N-ras* gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, London, v.86, p.774-779, 1994.

WIENCKE, J.K.; WRENSCH, M.R.; MIIKE, R.; ZUO, Z.; KELSEY, K.T. Population-based study of glutathione *S*-transferase mu gene deletion in adult glioma cases and controls. **Carcinogenesis**, ?City?, v. 18, p. 1431-1433, 1997.

WRENSCH, M. et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-Oncology**, Houston, v.4, p.278-299, 2002.

YE, Z.; SONG, H. Glutathione *S*-transferase polymorphisms (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Cancer, London**, v.41, p.980-989, 2005.

## ARTIGO ORIGINAL

ISSN 1677-5090

© 2010 Revista de Ciências Médicas e Biológicas

## Estudo do polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes portadores de gliomas malignos<sup>1</sup>

### *Study of GSTT1 and GSTM1 genes polymorphism in malignant glioma patients*

Marcelo Soares da Mota e Silva<sup>2</sup>, Maria da Glória da Costa Carvalho<sup>3</sup>, Clovis Orlando da Fonseca<sup>4</sup>, Thereza Quirico Santos<sup>5</sup> Brenda Maiolino Bucco<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Os autores estão gratos às professoras Maria Christina Soares Rebello e Nathalie Henriques Silva Canedo pela revisão e críticas do texto. O suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho veio da Fundação Ary Frazzini e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). <sup>2</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>3</sup>Professora Adjunta; Chefe do Laboratório de Controle da Expressão Gênica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. <sup>4</sup>Professor Associado – Serviço de Neurocirurgia – Universidade Federal Fluminense. <sup>5</sup>Professora Titular – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biologia – UFF. <sup>6</sup>Graduanda em Medicina – UFRJ; Aluna de Iniciação Científica.

#### Resumo

Polimorfismos são variações na sequência de nucleotídeos do DNA genômico tais como deleções, inserções e outras. Os polimorfismos podem provocar alteração na função proteica e no fenótipo. Eventualmente pode ocorrer a deleção de ambos os alelos de um determinado gene e, nesse caso, a proteína que seria codificada pelo gene não será expressa. Essa situação é bastante frequente para os genes *GSTT1* e *GSTM1* que codificam enzimas de detoxicação (glutathione S-transferase teta 1, e, glutathione S-transferase mu 1, respectivamente). Considerando que as enzimas de detoxicação têm um papel fundamental na biotransformação de xenobióticos, essa falta da expressão poderia acarretar uma menor proteção e, conseqüentemente, uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças de perfil citotóxico, em especial o câncer. Este trabalho analisou o perfil genotípico de uma população de 30 pacientes portadores de gliomas malignos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*. Os tipos tumorais foram: vinte e quatro glioblastomas multiformes, três astrocitomas anaplásicos grau II, dois oligodendrogliomas e um astrocitoma anaplásico grau III. Os objetivos deste estudo foram comparar o genótipo dos 30 pacientes para os genes *GSTT1* e *GSTM1* com o encontrado em uma população de 65 sujeitos-controle teoricamente saudáveis, bem como, nos pacientes, relacionar a presença ou deleção desses genes com o tempo de sobrevida. Os resultados sugerem que o genótipo *GSTT1* nulo poderia conferir uma maior proteção contra o desenvolvimento dessas malignidades cerebrais e também indicam uma possível relação entre o genótipo e o tempo de sobrevida para portadores desses gliomas.

**Palavras-chave:** Polimorfismo – Glutathione S-transferases – Genes de detoxicação – Xenobióticos – Gliomas.

#### Abstract

Polymorphisms are sequence variations in genomic DNA, including deletions, insertions and others and can cause change in protein function and in the phenotype. Eventually, deletion of both alleles of a gene can occur. In this case, the protein encoded by the gene would not be expressed. This situation is very frequent in *GSTT1* and *GSTM1* genes, which codify detoxification enzymes (glutathione S-transferase theta 1 and glutathione S-transferase mu 1 respectively). Considering the fundamental role of detoxification enzymes in xenobiotic biotransformation, the absence of these enzymes could result in reduced protection and consequently lead to a higher susceptibility to diseases with cytotoxic profile, cancer in special. This work analyzed the genotypic profile of 30 patients with malignant gliomas for the *GSTT1* and *GSTM1* genes and compared the patients' genotype for *GSTT1* and *GSTM1* genes with the genotype of 65 health controls. We also correlated the genotypic alterations with the survival in one year of follow-up. The tumor types were: twenty-four glioblastoma multiforme, three anaplastic astrocytoma grade II, two oligodendroglioma and one anaplastic astrocytoma grade III. The results suggest that the *GSTT1* null genotype could lead to protection against brain malignancies development and increased survival for brain tumors patients.

**Keywords:** Polymorphism – Glutathione S-transferases – Detoxification genes – Xenobiotic – Gliomas.

#### INTRODUÇÃO

##### Os tumores cerebrais

Qualquer um dos diversos tipos celulares do cérebro pode sofrer mutações e dar origem a um tumor. Os

tumores cerebrais são caracterizados pelo tipo celular afetado (ARMSTRONG et al., 2007). No cérebro, podem ocorrer tumores primários (os de origem cerebral), ou tumores secundários (os que se originam em outro sítio, mas formam metástase cerebral). Neste trabalho, foram incluídos trinta pacientes portadores de gliomas primários, que são tumores que se originam nas células da glia, as quais dão suporte aos neurônios, participam da sua nutrição, além de possuírem um papel de proteção. Desses trinta pacientes, vinte e quatro eram

Recebido em 30 de março de 2010; revisado em 01 de dezembro de 2010.

Correspondência / Correspondence: Marcelo Soares da Mota e Silva. Laboratório de Controle da Expressão Gênica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. Bloco G, Avenida Carlos Chagas Filho, 373 - Cidade Universitária. 21941-902. Rio de Janeiro – RJ – Brasil. Tel.: (21) 2562-6511. E-mail: motamarc@biof.ufrj.br

## APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UFF – Universidade Federal Fluminense

Unidade de Pesquisas Clínicas, Serviço de Neurocirurgia do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo da Fase II do Álcool Perílico em Pacientes Com Glioblastoma Multiforme Recidivo  
INFORMAÇÕES

Você está sendo convidado (a) a participar voluntariamente de um estudo clínico com uma droga quimioterápica. Antes de concordar em participar desse estudo de pesquisa, é importante que você leia e compreenda este documento. Ele descreve o propósito do estudo, os procedimentos, precauções, desconfortos e possíveis riscos associados com o estudo juntamente com os possíveis benefícios que você poderá obter participando deste estudo. Ele também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento.

Você possui um tumor intracraniano, que no seu caso pode não ser possível a retirada completa através de uma nova cirurgia, ou novo tratamento radioterápico e quimioterápico. Portanto, um novo tipo de tratamento será realizado em sua doença, mais especificamente com a utilização de um medicamento quimioterápico (álcool perílico). Estudos em animais têm demonstrado que este medicamento tem ação na redução do tamanho dos tumores e em seres humanos a sua toxicidade se caracterizou por problemas gastrointestinais (enjôo, náusea, arrotos e diarreia).

Este estudo clínico em que você está sendo convidado a participar também proporcionará que pesquisas sejam realizadas em laboratório, mais especificamente com amostras de exames de sangue antes e após a realização da quimioterapia. A realização dessa pesquisa laboratorial não implicará nenhum procedimento adicional a você, pois a realização de biópsias, cirurgia, envio de material para anatomia patológica, radioterapia e quimioterapia já fazem parte da rotina no tratamento do tumor cerebral. Essas pesquisas servirão para compreendermos os mecanismos que levam a morte do tumor pelo tratamento, permitindo assim, que possamos no futuro, prever aqueles pacientes que podem ter maior ou menor benefício com este tratamento. Também serão investigados todos os possíveis efeitos em seu organismo decorrentes dessa medicação quimioterápica. Dessa forma, você será solicitado à realização de exames laboratoriais e de imagem durante todo o período de tratamento.

O médico responsável por este estudo ou um membro de sua equipe discutirá com você os requisitos para a participação neste estudo.

Para a sua participação neste estudo você irá visitar seu médico para fazer a sua história clínica completa e exames físicos que incluirá sua altura, peso, pressão arterial, pulso e temperatura assim como exames de sangue e urina. Perguntarão sobre sua história médica e que outras medicações você está tomando. Você realizará exames de imagens, que podem incluir tomografia computadorizada de crânio e ressonância nuclear magnética de crânio, que avaliarão a extensão da sua doença. Antes de iniciar o tratamento com o álcool perílico serão feitas perguntas sobre seu estado geral e todas as medicações que você está tomando. Seu médico ou outro membro de sua equipe perguntará algumas questões específicas sobre seus sintomas relacionados à doença.

A resposta de sua doença ao tratamento bem como a presença de qualquer efeito colateral será avaliada antes de cada aplicação da quimioterapia, por meio de exames, de avaliação de sintomas (queixas) e possíveis reações ao tratamento. A resposta da sua doença ao tratamento

também será avaliada através de exames de imagem.

A medicação que será utilizada, monoterpeno álcool perílico, demonstra resultados em experimentos de laboratórios e em animais. Está sendo utilizado para outros tumores malignos, como próstata, pulmão ovário, cólon e para teste de toxicidade.

Caso aceite participar desse estudo, a medicação será distribuída a você para que seja utilizada em sua residência, sem a necessidade de internação. O álcool perílico será utilizado por via inalatória com o auxílio de nebulizador e uma máscara que será acoplada a ele. Em um primeiro momento serão utilizadas 23 gotas durante quatro vezes ao dia e, posteriormente, essa dose será ajustada com a progressão do tratamento.

Deve-se ressaltar que o álcool perílico pode levar a uma série de efeitos colaterais como náusea, enjôo, arrotos, diarreia, fadiga e inapetência. O seu tratamento com o álcool perílico será suspenso caso esta droga esteja de algum modo sendo prejudicial a você.

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar do estudo ou pode interromper sua participação quando quiser, sem qualquer penalidade ou perda dos benefícios aos quais já tinha direito.

Sua participação também pode ser interrompida a qualquer momento pelo médico do estudo. Se isso ocorrer pode ser devido a uma reação ao tratamento proposto no qual você tenha apresentado, devido a novas informações sobre a segurança ou eficácia da medicação ou pelo encerramento do estudo.

A droga e os procedimentos do estudo serão fornecidos sem nenhum custo a você. Você receberá informações sobre sua saúde proveniente de todos os exames físicos e testes de laboratório feito neste estudo. Você será informado (a) pelo seu médico de qualquer nova descoberta ocorrida a respeito de sua doença ou das drogas administradas durante o tratamento.

Suas informações médicas serão mantidas confidenciais pelo médico do estudo e sua equipe e não serão disponibilizadas para publicidade a menos que sua violação seja exigida por lei. Os dados obtidos deste estudo não o identificam individualmente e poderão ser publicados ou entregues às autoridades regulatórias.

Seus registros médicos originais podem ser revisados pelo colaborador e/ou seus representantes, pelo Comitê de Ética do estudo e pelas autoridades regulatórias com o objetivo de verificar os procedimentos do estudo e/ou os dados. Suas informações médicas serão arquivadas e processadas em computador.

Assinando este documento de consentimento, você autoriza a revisão dos registros, o arquivamento das informações e a transferência dos dados como descrito acima. Para participar do estudo, você ou seu representante legal deve assinar e datar a página de assinaturas.

Os telefones do médico responsável pelo estudo, para ser contactado pelo paciente ou pelos familiares, em caso de qualquer intercorrência, são: 2491-6741; 2568-9040; 9954-9554.

Responda as perguntas a seguir, marcando resposta SIM ou NÃO.

1. Você leu o Termo de Consentimento? ( ) SIM ( ) NÃO
2. Foram respondidas todas as perguntas sobre o estudo e sobre a sua doença?  
( ) SIM ( ) NÃO
3. Você se sente completamente esclarecido (a) sobre o estudo? ( ) SIM ( ) NÃO
4. Você entendeu que pode sair do estudo a qualquer momento? ( ) SIM ( ) NÃO

5.Você entendeu que se sair do estudo isso não afetará seu tratamento médico nessa instituição? ( )SIM ( )NÃO

6.Você recebeu uma cópia deste Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente para guardar com você? ( ) SIM ( ) NÃO

7.Você concorda em fazer parte desse estudo? ( ) SIM ( ) NÃO

Você está sendo informado sobre todos os aspectos significativos sobre o estudo; sabendo que em nenhum modo seu nível de cuidados será afetado. Se durante o seu tratamento novas descobertas sobre a sua doença ocorrerem você será devidamente informado (a).

---

Assinatura do paciente ou representante legal

---

Assinatura de quem obteve o Consentimento

Data: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_



APÊNDICE C – COMPROVANTE DE ARTIGO SUBMETIDO EM PERIÓDICO  
INDEXADO NA BASE PUBMED

Elsevier Editorial System(tm) for Cancer Genetics  
Manuscript Draft

Manuscript Number: CG-D-12-00084

Title: Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms upon survival rate of patients with malignant glioma treated with intranasal perillyl alcohol

Article Type: Original Article

Keywords: Glutathione S-transferases; Genetic Polymorphism; Glioma; Perillyl alcohol

Corresponding Author: Prof. Dr. THEREZA QUIRICO-SANTOS, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Fluminense Federal University

First Author: Marcelo M Silva, M.Sc.

Order of Authors: Marcelo M Silva, M.Sc.; Clovis O Da Fonseca, Ph.D.; Rodrigo S Moura-Neto, Ph.D.; Juliana F Carvalho, Ph.D.; THEREZA QUIRICO-SANTOS, Ph.D.; Maria G Carvalho, Ph.D.

Abstract: GSTM1 (glutathione S-transferase mu one) and GSTT1 (glutathione S-transferase theta one) are enzymes critical for detoxification of endogenous and environmental carcinogens, and constitutive GST gene polymorphisms may be associated with increased risk for cancer development. This explorative study conducted in a Brazilian population with malignant glioma aimed to verify whether GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms would influence the response to intranasal administration of perillyl alcohol (POH) and the survival rate. The cohort included 95 patients with recurrent malignant glioma included in the Phase I/II clinical trial with POH, and 100 matched healthy control subjects. GSTM1 deletion was similar in patients with glioma (44%) and healthy controls (54%) but GSTT1 deletion occurred in 11.5% patients contrasting with 36% in controls. Longer survival rate was associated with lack of GSTM1 deletion (31 weeks) but positive deletion for GSTT1 (28 weeks) and poor survival rate with GSTM1 deletion (23 weeks) and lack of GSTT1 deletion (19 weeks). Lower frequency of GSTT1 deletion ( $p = 0.00009$ ) in glioma patients than healthy controls indicates that GSTT1 deletion may exert a protective role against gliomagenesis, and influence therapeutic response to intranasal POH treatment and overall survival especially considering tumor topography.

Suggested Reviewers: Judith Schwartzbaum Ph.D.

Researcher, Division of Epidemiology and Biometrics, Ohio State University, USA  
schwartzbaum.1@osu.edu

She is a reference in the area, with several publications related to risk factors for brain tumors.

M. Fatih Okcu MD, PhD

Division of Cancer Prevention, The University of Texas  
mfokcu@txccc.org

He has many publications in the area of GST polymorphisms and gliomas.

Francis Ali-Osman

Department of Surgery, Duke University  
francis.aliosman@duke.edu

He has publications concerning Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance