**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DO GENE SUPRESSOR
DE TUMOR PTEN EM TUMORES DO SISTEMA
NERVOSO**

ALINE CADURIN CUSTÓDIO

Dissertação apresentada junto ao
Departamento de Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo para a obtenção do grau de
Mestre.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cacilda Casartelli

**Ribeirão Preto
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela oportunidade que reservou para mim e pela capacidade que me foi concebida para executá-lo.

Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram, a todos meus familiares que acreditaram em mim, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Cacilda Casartelli pela orientação e por ter me confiado a realização deste trabalho. Também à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e ao Departamento de Genética.

Aos amigos do Laboratório de Oncogenética pelo apoio, pelas sugestões dadas, pelos momentos de descontração, Juliana, Nacibe, Marise, Leo e Giovanny.

À minha grande amiga Luciana, a qual nunca vou esquecer, por sempre estar ao meu lado me ajudando, apoiando, pela sua confiança, companherismo e pela sua amizade sincera.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Oncogenética Márcio e Vanderci (Cuca) pela dedicação e zelo na preparação do material, pelo incentivo e momentos de descontração e à Dona Francisca, responsável pela limpeza dentro do laboratório.

Ao Sidney por ser um grande amigo e ter me ajudado em vários momentos de minha vida e na realização deste trabalho.

Às minhas duas lindas sobrinhas que amo tanto quanto fossem minhas filhas, que em muitas ocasiões me fizeram esquecer os problemas.

À CAPES, FAPESP, CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro. A todos vocês, e aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

CUSTÓDIO, A.C. Avaliação Molecular Do Gene Supressor De Tumor PTEN Em Tumores Do Sistema Nervoso. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

O câncer é uma doença potencialmente letal. Os tumores se desenvolvem em células que estão se dividindo. Sua iniciação ou progressão está associada com o acúmulo de alterações genéticas. Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas, mutações, polimorfismos e modificações epigenéticas. O câncer se desenvolve quando mecanismos de defesa do organismo sofrem alterações. Os tumores do sistema nervoso representam aproximadamente 2% de todos os tipos de câncer. O papel central do sistema nervoso e as conseqüências funcionais da perda de neurônios podem explicar a severidade dos tumores cerebrais. A formação dos tumores do cérebro humano é um processo complexo, envolvendo um acúmulo de alterações genéticas. Os genes supressores de tumor estão envolvidos na formação de tumores. Sua perda, inativação ou disfunção leva a célula a se dividir desordenadamente, surgindo assim tumores e neoplasias no local onde elas ocorrem. O objetivo deste trabalho foi fazer uma triagem de ocorrência de polimorfismos conformacionais no gene supressor de tumor PTEN em 50 amostras de tumores de Sistema Nervoso. Nenhuma alteração mutacional foi encontrada. Nossos resultados se assemelham aos da literatura em relação à ausência de alterações no gene PTEN em tumores benignos; em relação aos glioblastomas, a literatura cita uma alta frequência de alterações no gene PTEN, mas não encontramos nenhuma alteração nas 9 amostras estudadas. Outro mecanismo como por exemplo a metilação da região promotora, poderia estar envolvido na inativação desse gene nos tumores analisados.

ABSTRACT

CUSTÓDIO. A. C. Molecular Evaluation Of The Tumor Suppresor Gene PTEN In Tumors Of The Nervous System. Dissertação de Mestrado - College of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Cancer is a potentially lethal illness. Tumors develop in cells that are dividing. Its initiation or progression is associated with the accumulation of genetic alterations. These alterations can be chromosome aberrations, mutations, polymorphisms and epigenetic modifications. The cancer develops when mechanisms of defence of the organism are altered. The tumors of the nervous system represent approximately 2% of all the types of cancer. The central role of the nervous system and the functional consequences of the loss of neurons can explain the severity of the cerebral tumors. The formation of the tumors of the human brain is a complex process, involving an accumulation of genetic alterations. The tumor suppressor genes are involved in the formation of tumors. If there is a loss, inactivation or dysfunction, the cell will divide disorderly, and tumors and other neoplasias will appear in the place where they occur. The objective of this work was to make a selection of the occurrence of conformational polymorphisms in the tumor suppressor gene PTEN in 50 samples of tumors of Nervous System. No mutational alteration was found. Our results are similar to the ones of the literature in relation to the absence of alterations in gene PTEN in benign tumors; in relation to glioblastomas, literature cites a high frequency of alterations in gene PTEN, but we did not find any alteration in the 9 studied samples. Another mechanism as, for example, the methylation of the promoter region, could be involved in the inactivation of this gene in the analyzed tumors.

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

AKT	Serine/Threonine Kinase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAK	Focal Adhesions Kinase
FISH	In Situ Fluorescence Hybridization (hibridização <i>in situ</i> - fluorescência)
Kd	Kilodalton
LOH	Loss of Heterozygosity (perda de heterozigose)
MDM2	Murine double Minute 2
MMAC1	Mutated in Multiple Advanced Cancers
NF1	Neurofibromatose 1
NF2	Neurofibromatose 2
Ng	Nanograma
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PDGFRA	Plated-Derived Growth- Factor Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol 3' - Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 3, 4 Biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate
Shc	SH2 domain containing transforming protein
SNC	Sistema Nervoso Central
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism (polimorfismo conformacional de fita simples)

TEP1	Transforming growth factor [TGF]- Regulated and Ephetelial cell enriched
VHL	Von Hippel-Lindau

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
GENES SUPRESSORES DE TUMOR	03
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO HUMANO	05
TUMORES ASTROCÍTICOS	09
Astrocitoma de Baixo Grau (I – II)	10
Astrocitoma de Alto Grau (III - IV)	11
TUMORES DAS MENINGES	13
Meningiomas	13
Hemangioblastomas	14
Rabdomiossarcoma	15
TUMORES DE NERVOS PERIFÉRICOS	15
Schwanoma	15
TUMORES DA REGIÃO SELAR	17
Craneofaringeoma	17
TUMORES EMBRIONÁRIOS	17
Meduloblastoma	17
GENE PTEN	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
Extração de DNA	25
Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	25
Análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)	28
4. RESULTADOS	29

5. DISCUSSÃO	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença potencialmente letal em mamíferos. Os tumores se desenvolvem em células que estão se dividindo (Campisi, 2005). Sua iniciação ou progressão está associada com o acúmulo de alterações genéticas. Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas, mutações, polimorfismos e modificações epigenéticas (Albertson *et al.*, 2003). O câncer se desenvolve quando mecanismos de defesa do organismo sofrem alterações (Campisi, 2005).

As células cancerosas invadem o tecido vizinho ao local em que elas se originaram. Essa invasão permite que as células penetrem na corrente sanguínea ou vasos linfáticos, formando tumores secundários, ou metástases, em outros locais do corpo (Thiery, 2002; Mareel and Leroy, 2003; Ministério da Saúde, 2005).

A formação de um tumor geralmente é lenta, podendo levar alguns anos para que uma célula prolifere e dê origem a um tumor palpável. Esse processo é composto por vários estágios como: iniciação, em que os genes sofrem ação de fatores cancerígenos; promoção, quando os agentes onco-promotores atuam na célula já alterada; e progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula (Ministério da Saúde, 2005).

A perda do controle da proliferação celular é uma característica das células tumorais, ocasionando assim a displasia e às vezes, a anaplasia. Alguns dos fatores principais relacionados a esse fenômeno são mutações com perda de função dos genes supressores de tumor e ativação dos proto-oncogenes. Mutações que potencializam as atividades dos proto-oncogenes, convertendo-os em oncogenes, induzem um crescimento celular anormal. Inversamente, mutações genéticas que inativam genes supressores liberam as células da repressão imposta por estes genes, permitindo o crescimento irrestrito de células cancerígenas (Weinberg, 1991, Campisi, 2005). A imortalidade celular é também

uma das características das células tumorais, comum a quase todas as neoplasias malignas (Harley, 2002). As células somáticas normais apresentam uma capacidade replicativa limitada (Hayflick and Moorhead, 1961), enquanto que as células tumorais podem se replicar infinitamente *in vitro* e *in vivo* (Harley *et al.*, 1994; Harley, 2002). Essas células resultam de mutações em genes que mantêm a estabilidade genética de células normais. Sua transformação em um tumor maligno ocorrerá através do acúmulo de mutações em classes específicas de genes que, de alguma forma, estão envolvidos na regulação da proliferação celular (Nowell, 1974; Loeb *et al.*, 2003; Campisi, 2005).

Podemos considerar que uma célula cancerosa é aquela que perdeu a capacidade de controlar seu crescimento e divisão. Essas células possuem características marcantes como: desrespeito aos sinais de parada de proliferação celular, diferenciação celular, capacidade de sustentar a proliferação celular, fuga da apoptose, capacidade de proliferação e angiogênese (Hanahan and Weinberg, 2000).

O câncer também pode ser considerado um evento epigenético. Mudanças epigenéticas como a metilação do DNA são excelentes candidatos para explicar como certos fatores ambientais podem aumentar o risco de câncer. Os eventos de metilação podem levar à instabilidade cromossômica, ativação de seqüências parasitas endógenas, perda do *imprinting*, formação de aneuploidias e mutações, podendo contribuir para o silenciamento transcricional de genes supressores tumorais (Esteller and Herman, 2002; Campisi, 2005).

GENES SUPRESSORES DE TUMOR

A perda, a inativação ou disfunção de genes supressores de tumor leva a célula a se dividir desordenadamente, surgindo assim tumores e neoplasias no local onde elas ocorrem (Payne *et al.*, 2005). Os supressores de tumor são detectados por deleções, mutação, inativação em células primordiais ou em células somáticas, levando ao surgimento de um tumor (Louro *et al.*, 2002; Payne *et al.*, 2005).

Os genes supressores de tumor apresentam um padrão hereditário autossômico recessivo, pois a inativação de apenas uma das cópias do alelo não é suficiente para levar a célula ao desenvolvimento de um tumor (Diamandis, 1997; Michor *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2005). Estudos moleculares em cânceres hereditários identificaram e definiram a natureza recessiva dos genes supressores tumorais (Scherr, 2004). Knudson (1971), utilizando o retinoblastoma (RB1) como modelo, postulou que ele é desencadeado por duas lesões sucessivas (tais eventos seriam mutações, embora um evento epigenético não possa ser descartado) no genoma celular. No retinoblastoma familiar, o indivíduo herdaria de seus progenitores uma das duas mutações e a outra ocorreria como um evento somático. No retinoblastoma esporádico, ambas as lesões ocorreriam na linhagem de células da retina como mutações somáticas ocorrendo *de novo*, mas longos períodos após a concepção. Knudson (1971, 1983, 1985, 1987, 1991, 1993), descreveu como a inativação de genes supressores de tumor poderia levar ao desenvolvimento de tumores: primeiro, mutações em células germinativas de apenas um único alelo predisõem à formação de tumores e segundo, mutações ou inativações em células somáticas no outro alelo, que ocorrem durante a vida do indivíduo, resultam na formação de um tumor.

Os genes supressores atuam em uma ampla cadeia de atividades em uma célula normal. Apesar de sua função normal não garantir a proteção contra o câncer, seu

envolvimento em cascatas sinalizadoras, processo de degradação protéica, “*checkpoints*”, detecção e reparo de danos no DNA, diferenciação e migração, angiogênese e outras respostas ao estresse ilustram o amplo espectro de processos celulares nos quais esses genes participam e que podem ser desregulados nas células cancerígenas (Sherr, 2004).

Os produtos dos genes supressores de tumores são importantes componentes de sinalização intercelular permitindo que a célula receba e processe sinais inibidores ao seu redor. A perda de componentes críticos para esta sinalização leva a célula a perder a capacidade de responder a certos sinais inibidores de proliferação, mesmo que estes sinais ainda estejam presentes no meio ambiente intracelular (Weinberg, 1991, 1994; Michor et al., 2004; Payne *et al.*, 2005).

TUMORES DO SISTEMA NERVOSO HUMANO

Os tumores do sistema nervoso representam aproximadamente 2% de todos os tipos de câncer (Kleihues *et al.*, 2002). A cada ano, cerca de 127.000 novos casos de câncer de cérebro e do sistema nervoso central são diagnosticados no mundo (Brandes 2003). Em crianças, os tumores de sistema nervoso central são a segunda causa de morte devido a câncer, perdendo apenas para leucemia (Kaatsch *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2000; Rickert, 2003). Em adultos, a incidência de tumores do sistema nervoso aumenta com o avanço da idade (Kleihues *et al.*, 2002).

O papel do sistema nervoso e as consequências funcionais da perda de neurônios podem explicar a severidade dos tumores cerebrais, mesmo que primários. Apesar do pequeno número de tumores cerebrais em comparação a outros mais frequentes como tumores de colón, pulmão e mama, a mortalidade que causam é altamente significativa. Esses tumores, mesmo que benignos, podem ser letais devido às suas propriedades infiltrantes e à sua tendência em malignizar com o passar do tempo (Behin *et al.*, 2003). A formação dos tumores do cérebro humano é um processo complexo, envolvendo um acúmulo de alterações genéticas.

No Brasil, os casos de tumores de Sistema Nervoso Central (SNC), representados pelo câncer de encéfalo, constituem 2,4% do total de casos ocorridos, sendo que a mortalidade entre homens varia de 0,31 a 4,22 e entre as mulheres 0,41 a 3,19 para cada 100.000 homens e 100.000 mulheres entre os anos 1995 a 1999 (Ministério da Saúde, 2005).

Nas neoplasias do Sistema Nervoso Central, as classificações histopatológicas são extensas e embasadas primariamente na morfologia descritiva. Como a histogênese desses

tumores é muito heterogênea e peculiar, existe uma grande dificuldade na caracterização dos diversos subgrupos (Gilbertson, 2002).

Uma das classificações mais aceitas é a da Organização Mundial de Saúde (Kleihues *et al.*, 2002) (quadro 1), baseada na premissa de que cada tipo de tumor se origina de um tipo celular específico e os tumores são classificados em graus de malignidade com implicações terapêuticas e prognósticas. Através da citogenética e biologia molecular os pesquisadores incorporaram alterações em cromossomos e/ou em genes na classificação tumoral.

A classificação molecular está se mostrando muito útil, tanto para o diagnóstico, como para a orientação terapêutica e prevenção. As informações adquiridas com o auxílio da Biologia Molecular poderão ser utilizadas em novas abordagens terapêuticas, como na imunoterapia e na terapia gênica.

Quadro 1: Nova Classificação dos tumores que afetam o SNC de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO) (Kleihues *et al.*, 2002).

TUMORES DE TECIDO NEUROEPITELIAL	
TUMORES ASTROCITÁRIOS	
Astrocitoma Difuso	9400/3 ¹
Fibrilar	9420/3
Protoplasmático	9410/3
Gemistocístico	9411/3
Astrocitoma anaplásico	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Glioblastoma de células gigantes	9441/3
Gliossarcoma	9442/3
Astrocitoma pilocítico	9421/1
Xantoastrocitoma pleomórfico	9424/3
Astrocitoma de células gigantes subependimário	9384/1
TUMORES OLIGODENDROGLIAIS	
Oligodendroglioma	9450/3
Oligodendroglioma anaplásico	9451/3
TUMORES EPENDIMÁRIOS	
Ependimoma	9391/3
Celular	9391/3
Papilar	9393/3
Tanicitico	9391/3
De células claras	9391/3

Ependimoma anaplásico	9392/3
Ependimoma mixopapilar	9394/1
Subependimoma	9383/1
GLIOMAS MISTOS	
Oligoastrocitoma	9382/3
Oligoastrocitoma anaplásico	9382/3
TUMORES DO PLEXO CORÓIDE	
Papiloma do plexo coróide	9390/0
Carcinoma do plexo coróide	9390/3
TUMORES NEUROEPITELIAIS DE ORIGEM INCERTA	
Astroblastoma	9430/3
Glioma coróide do 3º Ventrículo	9444/1
Gliomatose cerebral	9381/3
TUMORES NEURONAIS E NEURONAIS-GLIAIS MISTOS	
Gangliocitoma	9492/0
Gangliocitoma displásico do cerebelo (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Gangliocitoma infantil desmoplásico	9412/1
Tumor neuroepitelial disembrionário	9413/0
Ganglioglioma	9505/1
Ganglioglioma anaplásico	9505/3
Neurocitoma central	9506/1
Paraganglioma do filum terminale	8680/1
Liponeurocitoma cerebelar	9506/1
TUMORES NEUROBLÁSTICOS	
Neuroblastoma olfatório (Aesthesioneuroblastoma)	9522/3
Neuroepitelioma olfatório	9523/3
Neuroblastoma da glândula adrenal e do sistema do nervo simpático	9500/3
TUMORES PARENQUIMAIS PINEAIS	
Pineocitoma	9361/1
Pineoblastoma	9362/3
Tumor parenquimal pineal de diferenciação intermediária	9362/3
TUMORES EMBRIONÁRIOS	
Meduloepitelioma	9501/3
Ependimoblastoma	9392/3
Tumores neuroectodérmicos supratentoriais primitivos (PNET)	9473
Neuroblastoma	9500/3
Ganglioneuroblastoma	9490/3
Meduloblastoma	9470/3
Meduloblastoma desmoplásico	9471/3
Meduloblastoma de Células Largas	9474/3
Medulomioblastoma	9472/3
Meduloblastoma melanocítico	9470/3
Tumores teratóide/rabdóides atípicos	9508/3
TUMORES DOS NERVOS PERIFÉRICOS	
SCHWANNOMA (NEURINOMA, NEURILEMOMA)	9560/0
Celular	9560/0
Plexiforme	9560/0
Melanocítico	9560/0
NEUROFIBROMA	9540/0
Plexiforme	9550/0
PERINEURIOMA	9571/0
Perineurioma Intraneural	9571/0
Perineurioma de tecido mole	9571/0
TUMORES DA BAINHA DO NERVO PERIFÉRICO MALIGNOS (MPNST)	9540/3
Epitelióide	9540/3
MPNST com diferenciação epitelial e/ou mesenquimal	9540/3

Melanocítico	9540/3
Melanocítico Psamomatoso	9540/3
TUMORES DAS MENINGES	
TUMORES DAS CÉLULAS MENINGOTELIAIS	
Meningioma	9530/0
Meningotelial	9531/0
Fibroso (fibroblástico)	9532/0
Transicional (misto)	9537/0
Psamomatoso	9533/0
Angiomatoso	9534/0
Microcístico	9530/0
Secretório	9530/0
Linfoplasmocitário rico	9530/0
Metaplásico	9530/0
De células claras	9538/1
Cordóide	9538/1
Atípico	9539/1
Papilar	9538/3
Rabtoide	9538/3
Meningioma Anaplásico	9530/3
TUMORES NÃO-MENINGOTELIAIS, MESENQUIMAIS	
Lipoma	8850/0
Angiolipoma	8861/0
Hibernoma	8880/0
Liposarcoma (intracranial)	8850/3
Tumor fibroso solitário	8815/0
Fibrosarcoma	8810/3
Histiocitoma fibroso maligno	8830/3
Leiomioma	8890/0
Leiomiosarcoma	8890/3
Rabdomioma	8900/0
Rabdomiossarcoma	8900/3
Condroma	9220/0
Condrossarcoma	9220/3
Osteoma	9180/0
Osteosarcoma	9180/3
Osteocondroma	9210/0
Hemangioma	9120/0
Hemangioendotelioma epitelióide	9133/1
Hemangiopericitoma	9150/1
Angiosarcoma	9120/3
Sarcoma de Kaposi	9140/3
LESÕES MELANOCÍTICAS PRIMÁRIAS	
Melanocitose difusa	8728/0
Melanocitoma	8728/1
Melanoma maligno	8720/3
Melanomatose meníngea	8728/3
TUMORES DE HISTOGÊNESE INCERTA	
Hemangioblastoma	9161/1
LINFOMAS E NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS	
Linfomas malignos	9590/3
Plasmocitoma	9731/3
Sarcoma granulocitário	9930/3
TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS	
Germinoma	9064/3
Carcinoma embrionário	9070/3

Tumor do saco vitelino	9071/3
Coriocarcinoma	9100/3
Teratoma	9080/1
Imaturo	9080/3
Maduro	9080/0
Teratoma com transformação maligna	9084/3
Tumores mistos de células germinativas	9085/3
TUMORES DA REGIÃO SELAR	
Craniofaringioma	9350/1
Adamantinomatoso	9351/1
Papilar	9352/1
Tumor de célula granular	9582/0

TUMORES METASTÁTICOS

¹ Código morfológico da Classificação internacional de doenças para oncologia (ICD-O) e nomenclatura médica sistematizada (SNOMED). Código para o comportamento: /0 para tumores benignos, /1 para tumores de baixo ou potencial maligno incerto ou para malignidade de borda, /2 para lesões in situ, /3 para tumores malignos.

TUMORES ASTROCÍTICOS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (Kleihues *et al.*, 1993) os tumores astrocíticos estão divididos em: astrocitomas de baixo grau (I – II) e astrocitomas de alto grau (III – IV). Os tumores astrocíticos compreendem uma variedade de neoplasias que diferem quanto à sua localização no SNC, idade e distribuição por sexo, extensão e potencial invasivo, características morfológicas, tendência para progressão e curso clínico. A formação de tumores astrocíticos é um processo complexo que ocorre pelo acúmulo de alterações gênicas, envolvendo principalmente dois grupos de genes (oncogenes e genes supressores de tumor), implicados na regulação da proliferação celular em vias distintas da tumorigênese (Louro *et al.*, 2002). Astrocitomas se desenvolvem em diversas regiões do sistema nervoso, mais freqüentemente em regiões do cerebelo (Walker and Kaye, 2003; Collins, 2004).

Astrocitomas de Baixo Grau (I –II)

Os astrocitomas pilocíticos (grau I), ocorrem mais freqüentemente em crianças, sendo que sua diferenciação dos astrocitomas fibrilares difusos é de extrema importância, devido ao diagnóstico favorável associado à falta de infiltração tumoral ao parênquima cerebral e ao seu crescimento lento (Kleihues *et al.*, 1993; Collins, 2004). São considerados os únicos astrocitomas benignos. Porém, mesmo assim, possuem em alguns casos potencial de transformação maligna, tornando-se agressivos. Isso ocorre em até 1% dos casos. Localizam-se na maioria dos casos no cerebelo, podendo apresentar-se em regiões profundas do cérebro como o tálamo e hipotálamo (Collins, 2004; Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005). Estudos moleculares em astrocitomas pilocíticos têm revelado perdas alélicas em 17p e 17q incluindo os genes TP53 e NF1 (Patt *et al.*, 1996; Collins, 2004; Ichimura *et al.*, 2004).

Os astrocitomas difusos (II) são divididos em subgrupos classificados morfológicamente. O astrocitoma fibrilar caracteriza a variante mais freqüente e o astrocitoma protoplásmico a variante mais rara; o astrocitoma gemistocítico tem certa possibilidade de progredir para graus maiores. A característica principal entre todos é a presença de células apresentando atipia nuclear, sendo que as mitoses são raras e anaplasia e necrose estão ausentes (Walker and Kaye, 2003; Ichimura *et al.*, 2004). Sua sintomatologia ocorre mais freqüentemente entre os 25 e os 50 anos. Sintomas comuns são cefaléia e crises convulsivas. Mais de 80% dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos levando vida normal. Entretanto, existem casos em que a progressão do tumor para padrões mais agressivos leva à piora clínica ou ao retorno de lesões previamente operadas (Ichimura *et al.*, 2004; Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005;).

Análises clínicas e moleculares relataram hipóteses de que esses tumores podem se desenvolver por mutações em diferentes genes, afetando várias linhagens celulares, podendo progredir para tumores de alto grau (Collins, 2004). Cerca de 60% dos astrocitomas difusos apresentam perdas alélicas em 17p, incluindo o gene TP53 (James *et al.*, 1989; Rasheed *et al.*, 1994; Ichimura *et al.*, 2004). Os genes MDM2 e P14ARF foram estudados e apresentaram anormalidades nestes tipos de tumores. A perda alélica dos cromossomos 6q, 13q e 22q pode ocorrer em astrocitomas. A hipermetilação de regiões promotoras também desenvolve um importante papel no silenciamento de alguns genes que estão envolvidos na formação de astrocitomas (Collins, 2004).

Astrocitomas de Alto Grau (III - IV)

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) surgem devido a uma progressão dos astrocitomas de baixo grau que possuem alterações, como mutação de TP53 em cerca de 60% dos casos (Collins, 2004) e superexpressão de PDGFRA. Nos astrocitomas anaplásicos, além destas alterações, podemos encontrar a perda de heterozigosidade do cromossomo 19 (19q) (Louro *et al.*, 2002; Collins, 2004).

Análises citogenéticas e técnicas de genética molecular demonstraram perda alélica dos cromossomos 6q, 13q, 17p e 22q ocorrendo em alta frequência neste tipo de tumor (Collins, 2004). A perda de heterozigosidade no cromossomo 10 ocorre em aproximadamente em 40% dos astrocitomas anaplásicos (Rasheed *et al.*, 1995; Sonoda *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 1997; Voesten *et al.*, 1997; Ichimura *et al.*, 1996; Fujisawa *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2005).

Estes tumores possuem um maior potencial de agressividade, com suas células progredindo mais rapidamente (Collins, 2004). Isso leva a um crescimento rápido de

massas tumorais e freqüentemente há um aumento da pressão intracraniana e sintomas como cefaléia e vômitos, assim como deficiências motoras de um lado ou de outro do corpo e problemas com a fala. Pacientes com esses tumores apresentam uma menor sobrevida comparada com os dois anteriores, chegando a uma média de 3 a 4 anos em 70% dos casos (Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005).

Os glioblastomas (grau IV) constituem o tipo de neoplasia mais freqüente e maligno do grupo de tumores cerebrais (Godard *et al.*, 2003; Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005; Martinez *et al.*, 2005; Ohgaki, 2005). Eles apresentam regiões de necrose, hemorragias e proliferação microvascular. Em termos geneticos, apresentam várias deleções, amplificações e mutações de ponto (Holland, 2000; Ohgaki, 2005; Rick *et al.*, 2005). Existem duas formas de glioblastomas: primários ou *de novo*, que se desenvolvem em pacientes mais velhos em um curto prazo de tempo e com rápida história clínica e glioblastomas secundários, que ocorrem em pacientes mais novos e se desenvolvem mediante progressão tumoral a partir de astrocitomas de baixo grau (Wesseling *et al.*, 1994; Kleihues *et al.*, 1997, 1999; Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005; Ohgaki, 2005).

São tumores histologicamente heterogêneos, representando um contínuo biológico com vários graus de pleomorfismo celular e nuclear, atividade mitótica e proliferação vascular (Schmitt, 1983; Wesseling *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2002; Graça *et al.*, 2003; Korshunov *et al.*, 2005).

A perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10 é a mais freqüente alteração em glioblastomas, ocorrendo em 60% a 80% dos casos (Ohgaki, 2005). Os glioblastomas primários se caracterizam pela presença da amplificação do gene EGFR (36%), mutações em PTEN (25%), deleções em P16 (31%), amplificação de MDM2 (10%), mutações em TP53 (28%) enquanto que nos glioblastomas secundários, que se

desenvolvem a partir de astrocitomas anaplásicos, a alteração mais comum é mutação em TP53 (65%), podendo ocorrer também amplificações de EGFR (8%), deleção de P16 (19%) e mutação em PTEN (4%) (Ohgaki, 2005).

Alterações no gene P14 podem levar ao desenvolvimento de glioblastomas (Collins, 2004), assim como a metilação do gene PTEN (Ohgaki, 2005).

TUMORES DAS MENINGES

Meningiomas

Os meningiomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso e abrangem 25% de todas neoplasias primárias intracranianas, ocorrendo principalmente em pacientes mais idosos (Kleihues and Cavenee, 2000; Lopes, 2003; Collins, 2004; Lusa *et al.*, 2005). A maioria dos tumores é de crescimento lento, de massas bem encapsuladas e altamente vascularizadas (De Monte *et al.*, 2001; Lopes, 2003). Embora a maioria desses tumores seja histologicamente benigna, alguns meningiomas apresentam sinais de malignidade como vascularização, perda da organização estrutural, pleomorfismo nuclear, alguns locais de necroses e infiltrações para tecidos vizinhos (Perry *et al.*, 1997; Lopez-Gines *et al.*, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os meningiomas podem ser classificados histologicamente em três graus: grau I (benigno) representando cerca de 80% dos casos; grau II (atípico), representa um subgrupo distinto histologicamente e está associado a um maior risco de recorrência, ocorrendo em 20% dos casos; grau III (anaplásico) apresenta características de malignidade, ocorrendo em 2% dos casos, podendo levar o paciente a uma sobrevida de 2 anos (Kleihues *et al.*, 2000; Lopez-Gines *et al.*, 2004; Collins, 2004; Lusa *et al.*, 2005).

A principal alteração cromossômica encontrada em todos os tipos histológicos de meningiomas é a monossomia total ou parcial do cromossomo 22, estando esta relacionada com a perda de heterozigiosidade e constituindo o evento primário na gênese desse tumor (Al Saadi *et al.*, 1987; Dumanski *et al.*, 1987; Casartelli *et al.*, 1989; Rogatto and Casartelli, 1988; Lopez-Ginez *et al.*, 2004; Collins 2004; Lusi *et al.*, 2005).

A perda de 22q é encontrada em 40 a 70% dos casos de meningiomas, estando associada com mutações, deleções ou perda de expressão do gene NF2, indicando que sua inativação representa um importante evento inicial no desenvolvimento do meningioma (Ueki *et al.*, 1999; Lopez-Ginez *et al.*, 2004; Rieske *et al.*, 2005).

Além da monossomia do cromossomo 22, estudos genéticos moleculares sugerem que a perda alélica de 1p, 9q, 10q e 14q podem estar associadas com a progressão dos meningiomas (Simon *et al.*, 1995; Lamszus *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999; Lopez-Ginez *et al.*, 2004; Lusi *et al.*, 2005).

Hemangioblastomas

Os hemangioblastomas são tumores benignos e representam aproximadamente 2% de todos os tumores intracraniais. Esses tumores podem ser múltiplos e podem ocorrer em células tronco. Os hemangioblastomas podem ocorrer como tumores esporádicos ou em famílias com doença de Von Hippel-Lindau, uma doença autossômica dominante. Hemangioblastomas cerebrais desenvolvem-se na terceira década de vida, causando aumento intracranial e desequilíbrio (Michael *et al.*, 2004; Pietro *et al.*, 2005).

A inativação bialélica do gene supressor de tumor VHL, localizado no cromossomo 3p, está envolvida na formação dos hemangioblastomas. Os eventos que podem levar a esta inativação podem ser eventos de recombinação mitótica, mutações

intragênicas e hipermetilação da região promotora (Latif *et al.*, 1993; Glasker *et al.*, 2001; Pietro *et al.*, 2005).

Rabdomiossarcomas

Rabdomiossarcomas são tumores malignos que se desenvolvem na musculatura esquelética ou em tecidos fibrosos e podem afetar qualquer área do corpo. Constituem 60% de todos tumores malignos de partes moles em crianças e adolescentes (Durve *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2004; Breitfeld *et al.*, 2005; Dausse *et al.*, 2005). As regiões mais comuns afetadas são cabeça e pescoço. Os rabdomiossarcomas se dividem em dois grupos; os embrionários, que constituem cerca de 75% dos casos e os alveolares. Os rabdomiossarcomas embrionários possuem uma incidência maior em crianças até os quatro anos. Uma alta incidência deste tumor é encontrada em crianças com a Síndrome de Li-Fraumeni e em crianças com familiares que possuem neurofibromatose (Stuart *et al.*, 2004).

As alterações genéticas mais comuns neste tipo de tumor são a inativação do gene supressor de tumor P53 e a translocação 12q13 (Stuart *et al.*, 2004).

TUMORES DE NERVOS PERIFÉRICOS

Schwanomas

São tumores benignos, de crescimento lento, que surgem da bainha das células de Schwann de nervos motores, sensitivos ou cranianos (Minami *et al.*, 2005). Constituem cerca de 8% dos tumores intracraniais primários (Mawrin *et al.*, 2002; Rekha *et al.*, 2004). Cerca de 65% destes tumores ocorrem no sistema nervoso central, sendo a maioria no VIII par craniano (Palva *et al.*, 1975; Melo, 2004; Rekha *et al.*, 2004). A taxa de incidência em cabeça e pescoço varia de 25 a 37%. A região lateral do pescoço é o sítio mais comum de

sua ocorrência, originando-se a partir das raízes nervosas cervicais e da cadeia simpática cervical (Melo, 2004). A degeneração maligna destes tumores é extremamente rara (Delozier, 1982; Melo, 2004).

Os schwannomas, também chamados neurilemomas e neurinomas, são lesões esporádicas solitárias, podendo ocasionalmente ser múltiplas ou aparecer em conjunto com a neurofibromatose tipo 1 (Rekha *et al.*, 2004). Neurinomas do acústico são, na maioria dos casos, tumores benignos que se originam dos nervos vestibulares. O tumor pode aparecer em todas as idades, com um pico de incidência entre a quarta e a sexta décadas. Existe uma predileção pelo sexo feminino com uma taxa de 2:1 sobre o sexo masculino (Minami *et al.*, 2005). Schwannomas do vestibular podem aparecer de forma isolada ou podem estar associados à neurofibromatose tipo 2 (NF2) (Chen *et al.*, 2005). Estudos genéticos têm demonstrado alterações no cromossomo 22 em casos esporádicos de pacientes com schwannomas vestibulares sem NF2 (Instituto de Neurologia de Curitiba, 2005).

A principal alteração encontrada em schwannomas é a perda do cromossomo 22; estudos moleculares demonstraram que na região 22q12 está localizado o gene NF2. A inativação por mutações no gene NF2 ocorre em aproximadamente 60% dos schwannomas (Lusis *et al.*, 2005). Outros eventos genéticos também estão envolvidos na formação de schwannomas, como a perda de heterozigosidade do gene supressor de tumor TP53. A perda do cromossomo 1 também pode levar ao desenvolvimento de uma pequena classe de schwannomas (Mawrin *et al.*, 2002).

TUMORES DA REGIÃO SELAR

Craniofaringeomas

Craniofaringeoma é uma neoplasia epitelial da região pituitária e hipotalâmica (Honegger *et al.*, 1997), com incidência infantil de 6 a 9% de todos os tumores do sistema nervoso central (Strother *et al.*, 2002; Kalapurakal, 2005). De acordo com Honegger *et al.* (1997) e Raghavan *et al.* (2000), os fatores de predisposição à recorrência tumoral são: extensão e ressecção tumoral, idade ao diagnóstico e hidrocefalia grave.

Nos últimos anos, houve um enfoque maior nos estudos sobre os mecanismos genéticos envolvidos na gênese e progressão dos craniofaringeomas, na tentativa de diminuir a morbidade decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Assim, marcadores genéticos que possam auxiliar no prognóstico e no tratamento dos pacientes são de extrema utilidade (Honegger *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 2000; Raghavan *et al.*, 2000; Savas *et al.*, 2000; Sarubi *et al.*, 2001; Sekine *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2002).

TUMORES EMBRIONÁRIOS

Meduloblastomas

Os meduloblastomas são tumores embrionários do Sistema Nervoso Central, constituindo o maior subgrupo de neoplasias de origem neuro-epitelial presentes na infância (40%); seu pico de incidência é dos 9 aos 13 anos (Collins, 2004; Sarkar *et al.*, 2005).

A alteração genética mais comum em meduloblastoma é a deleção do cromossomo 17, presente em 30 a 50% dos tumores primários. Essa deleção pode ocorrer mais freqüentemente pela formação do isocromossomo 17q (Biegel, 1997; Nicholson *et al.*, 2000; Fruhwald *et al.*, 2001; Collins, 2004; Sarkar *et al.*, 2005). Com a perda de certas

regiões do cromossomo 17, vários genes supressores de tumor como ABR, LIS1 e TP53 são deletados nesses tumores; dessas alterações, 15% ocorrem no gene TP53 (Ohgaki *et al.*, 1991; Saylor *et al.*, 1991; Brata *et al.*, 1995; Orellana *et al.*, 1998; Collins, 2004; Sarkar *et al.*, 2005). A amplificação do gene MYC ocorre em 5 a 10% dos casos, podendo ser um evento importante, que está associado a um fenótipo anaplásico e a um comportamento biológico mais agressivo (Collins, 2004; Sarkar *et al.*, 2005).

A perda da região 1q e 10q ocorre em aproximadamente em 20 a 40% dos casos (Sarkar *et al.*, 2005), mas os autores não encontraram alterações no gene PTEN.

Outras alterações cromossômicas também foram descritas, como ganho do cromossomo 7 e das regiões 8q, 9p, 18q, assim como perdas de 8p, 9q, 10q, 16q, 22q e do cromossomo 11 (Lescop *et al.*, 1999; Eberhart *et al.*, 2002; Gilbertson, 2002; Michiels *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Sarkar *et al.*, 2005).

GENE PTEN

O gene PTEN/MMAC1/TEP1 (phosphatase, tensin homologue deleted from chromosome ten/ mutated in multiple advanced cancers/ regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) foi descrito pela primeira vez em 1997 por três grupos de pesquisadores, sendo que sua inativação faz parte da formação de vários tipos de tumores malignos (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 2002; Hlobilková *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2004; Di Vizio *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005).

O gene PTEN é um supressor de tumor localizado no cromossomo 10, no locus 10q23 e codifica uma proteína com 403 aminoácidos e 47kd (Li and Sun, 1997; Li *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004; Di Vizio *et al.*, 2005). Contém nove exons e oito introns, apresentando em sua região N - terminal uma alta homologia com tensina, uma

proteína do citoesqueleto e com auxilina, uma proteína envolvida no transporte da vesícula sináptica (Li and Sun, 1997; Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997; Tamur *et al.*, 1998; Lauge *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005).

A molécula de PTEN pode ser dividida em 2 domínios: um domínio fosfatase, localizado na região N-terminal (resíduo 1 ao 185) e um domínio C-terminal (Chu *et al.*, 2004). A região C-terminal, onde ocorrem 43% das mutações desse gene, é composta por dois subdomínios. Primeiro, um domínio C2 (resíduo 186 ao 351) que é associado com regiões de ligação fosfolipídica, que tem afinidade por fosfolipídios de membrana.

Outra característica é a presença de um sítio de ligação PDZ, o qual reage fortemente com o domínio fosfatase e compreende uma região de interação proteína-proteína. A eliminação de PDZ reduz a capacidade de PTEN de inibir substrato AKT, sugerindo que essa região é importante na atividade de PTEN. Esta região C-terminal possui vários sítios de fosforilação localizados nos últimos 50 aminoácidos, que exercem função de estabilidade protéica (Figura 1). Este gene sofre mutações, não apenas no domínio fosfatase (região N-terminal, com aproximadamente 31% de mutações), mas também ao longo de toda a molécula, sugerindo que outras regiões da proteína são críticas para a função de supressão do crescimento celular (Simpson and Parsons, 2001; Goberdhan and Wilson, 2003; Chu *et al.*, 2004).

Figura 1. Regiões do gene PTEN (Goberdhan and Wilson, 2003)

O gene PTEN induz supressão de crescimento através da parada do ciclo celular e/ou indução de apoptose e inibe adesão e migração celular (Furnari *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1998; Stambolic *et al.*, 1998; Ramaswamy *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; Marino *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). PTEN possui o papel de atuar como uma fosfatase com especificidade dupla, capaz de defosforilar resíduos tanto de tirosina fosfato quanto de serina/treonina fosfato (Li and Sun, 1997; Meyer *et al.*, 1997; Furnari *et al.*, 1998; Maehama and Dixon, 1998; Myers *et al.*, 1998; Stambolic *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 1999; Maehama and Dixon, 1999; Maehama *et al.*, 2001; Mayo *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004).

O gene PTEN atua como um fator inibidor da via fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K), que possui a função de transferir um grupo fosfato para fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂), gerando fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), junto com outros fatores, transmite sinais para ativar a via do proto-oncogene PKB/Akt, que leva a célula à proliferação celular e à inibição de apoptose. O gene PTEN remove o terceiro anel de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), transformando este em fosfatidilinositol 3-4 bifosfato (PIP₂), inativando assim os sinais para a via PKB/Akt (Sansal and Sellers, 2004; Chu *et al.* 2004). A figura 2 (A e B) mostra a função de PTEN na via PKB/AKT).

Figura 2A: Função de PTEN na célula quando ativo (Coffee Break, 2003). Figura 2B: PTEN inativo (Coffee Break, 2003)

PTEN também pode atuar na via FAK (Focal Adesion Kinase) e Shc (fosfotirosina que contém um domínio SH2), defosforilando as moléculas de transdução de sinal, potencialmente inibindo migração celular e adesão. FAK é uma quinase que promove a migração, adesão celular e extensiva reorganização de actina citoesqueleto e Shc induz migração. O receptor FAK liga-se a integrinas através da interação de sua extremidade C-terminal com proteínas associadas à integrina, tais como paxilina e talina. Portanto, a perda do gene PTEN pode promover migração celular e uma grande tendência de sofrer metástase, características marcantes na progressão tumoral (Gunther *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise molecular do gene supressor de tumor PTEN, utilizando como ferramenta as técnicas de PCR-SSCP, tanto em neoplasias como em outros processos proliferativos do sistema nervoso, na tentativa de gerar mais conhecimentos a respeito da participação deste gene na formação e progressão dos tumores de sistema nervoso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Patologias provenientes de tecidos removidos através de biopsia ou cirurgia, realizadas em pacientes não tratados, foram coletadas para estudos moleculares e histopatológicos. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis, contendo 1ml de meio de cultura HAM F-10. As amostras foram fornecidas pelo Hospital do Câncer de Barretos.

Foram obtidas 50 amostras de tumores do sistema nervoso coletadas no período de 2003 a 2004, sendo 20 gliomas (11 astrocitomas e 9 glioblastomas), 6 tumores de nervos periféricos (schwannomas), 7 tumores de meninges (5 meningiomas, 1 rabdomiossarcoma e 1 hemangioblastoma), 2 tumores embrionários (meduloblastomas), 1 tumor de região selar (craniofaringeoma), 2 adenomas de hipófise e 11 tumores cerebrais metastáticos. O quadro 2 mostra o número do paciente, o sexo, idade e tipo de tumor, sendo que 62% dos casos são pacientes do sexo masculino, com idade entre 14 a 77 anos (média de 41,61anos) e 38% são do sexo feminino, com idade entre 15 a 66 anos (média de 44,26 anos).

Quadro 2: Número do paciente, Sexo/Idade e Tipo de tumor dos pacientes estudados. Obs: O paciente de número 20 foi cancelado.

NÚMERO DO PACIENTE	SEXO/IDADE	TIPO DE TUMOR
01	M/62	Astrocitoma Fibrilar Grau II
02	M/66	Adenocarcinoma Metastático
03	M/63	Carcinoma indiferenciado
04	F/62	Glioblastoma
05	M/56	Schwanoma
06	M/52	Neoplasia Fusocelular Benigna
07	F/39	Adenoma Hipofisário
08	M/22	Astrocitoma Grau II
09	F/36	Schwanoma
10	M/44	Schwanoma
11	F/58	Adenocarcinoma Metastático
12	M/22	Astrocitoma Grau II
13	M/32	Astrocitoma Grau II
14	F/69	Adenoma Hipofisário
15	M/46	Hemangioblastoma
16	M/18	Meduloblastoma
17	F/54	Glioblastoma Multifforme
18	M/17	Cisto Epidermóide
19	M/14	Meduloblastoma
21	F/62	Glioblastoma Multifforme
22	F/31	Glioblastoma Multifforme
23	M/51	Adenocarcinoma Grau II
24	M/22	Astrocitoma De Baixo Grau
25	F/35	Hemangioblastoma
26	F/46	Meningioma
27	M/77	Adenocarcinoma Metastático
28	F/59	Astrocitoma Grau II
29	M/61	Meningioma
30	M/16	Glioblastoma Multifforme
31	M/19	Tumor De Clivus: Cordoma
32	F/37	Meningioma
33	M/69	Metastase De Carcinoma Espino-Celular
34	M/22	Astrocitoma De Baixo Grau
35	M/70	Astrocitoma Fibrilar Grau II
36	F/66	Meningioma Meningotelial
37	F/15	Craniofaringeoma
38	M/42	Schwanoma
39	M/28	Rabdomiossarcoma
40	F/15	Oligodendroglioma/Glioblastoma Anaplásico
41	M/53	Glioblastoma Multifforme
42	M/44	Glioblastoma Multifforme
43	F/38	Schwanoma
44	F/54	Carcinoma Espinocelular
45	M/29	Schwanoma
46	F/28	Astrocitoma Grau III
47	F/47	Glioblastoma Multifforme
48	M/38	Meningioma Psamomatoso
49	M/58	Glioblastoma Multifforme
50	M/28	Astrocitoma Grau II
51	M/49	Astrocitoma Anaplásico

- **Extração de DNA**

Para extrair o DNA de tecido neoplásico, a amostra tumoral foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pulverizado e transferida para um tubo de centrífuga ao qual se acrescentou 5ml de tampão de extração (Tris 1M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M), 50 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 0,5 ml de SDS 20%. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas em banho-maria a 37°C *overnight*. Foram adicionados 5ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), com inversão suave durante 5 minutos, para homogeneização. Centrifugou-se a 3000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga e foram adicionados 3 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se por inversão suave durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga maior, o volume da amostra foi medido e acrescentou-se metade deste volume de acetato de amônio 7.5M e 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas, o material foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. O etanol foi retirado e o material colocado para secar a 37°C durante uma hora. Em seguida, foram adicionados 500 a 700µl de tampão de extração (TE) e o material guardado em geladeira até sua completa dissolução.

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica de PCR consiste na amplificação de seqüências específicas de DNA por uma reação de polimerização em cadeia, através de síntese da enzima DNA polimerase, associada ao uso de duas seqüências de oligonucleotídeos (*primers*), que hibridizam as fitas opostas e flanqueiam a região de interesse do DNA alvo. As amostras passam por uma

série de ciclos repetidos que envolvem desnaturação da dupla fita, anelamento dos *primers* e extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase, resultando no acúmulo exponencial de fragmentos específicos (Erlich, 1992).

Para a reação de PCR foi preparada uma mistura (Mix) com 200ng de DNA genômico, 50 mol de cada *primer*, tampão da Taq polimerase e MgCl_2 1,5 mM, 50 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado e 1,25 unidades da Taq polimerase. As amplificações foram realizadas com ciclador térmico PTC-100 (MJ Research, INC). Os *primers* utilizados na amplificação dos 9 exons do gene PTEN encontram-se no quadro 3 e suas temperaturas de amplificação no quadro 4.

Quadro 3: Relação dos primers utilizados para a amplificação dos éxons do gene estudado. As seqüências estão escritas no sentido 5'-3'. AS: Anti-Sense, S: Sense; TEM (°C) (temperatura de amplificação); TAMANHO (tamanho do fragmento a ser amplificado); LO (primers desenhados no Laboratório de Oncogenética, Depto. de Genética, FMRP, USP).

EXON	SEQUÊNCIA (F, R) DOS PRIMERS	Nº PB	TEM (°C)	TAMANHO (PB)	REFERÊNCIA
1	S:TCTGCCATCTCTCTCCTCCT	20	60°	~141	Holway et al., 2000
	AS:CCGCAGAAATGGATACAGGT	20			
2	S:TGACCACCTTTTATTACTCCA	21	53°	~313	Liu et al., 2000
	AS:AGTATCTTTTCTGTGGC	18			
3	S: TGTTAATGGTGGCTTTTTG	19	55°	~114	Dicuonzo et al.,2001
	AS:GCAAGCATACAAATAAGAAAAC	22			
4	S: CCTAAGTTCAAAAAGATAAC	19	50°	~145	Dicuonzo et al.,2001
	AS: TACAGTCTATCGGGTTTA	18			
5a	S: TTCTTATTCTGAGGTTATC	19	48°	~188	Dicuonzo et al.,2001 Davies et al., 1999
	AS: GCACATATCATTACACCAG	19			
5b	S:GCTGGAAAGGGACGAACTGG	20	60°	~152	LO Dicuonzo et al.,2001
	AS:GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	21			
6	S:CTTCTCTTTTTTTTCTGTCCACC	23	60°	~176	LO
	AS:AGCACTTACTGCAAGTTCCGCCAC	24			
7	S: ATCGTTTTTGACAGTTTG	18	50°	~263	Holway et al., 2000
	AS:CTCCCAATGAAAGTAAAG	18			
8a	S: CAGATAACTCAGATTGCC	18	48°	~261	LO
	AS:TTTCTACTTTTTCTGAGG	18			
8b	S: CCAGGACCAGACCAAACC	18	53°	~219	Cohn et al., 2000 Perren et al., 2000
	AS:ACATCACATACATACAAGTC	20			
9	S:GTCATATTTGTGGGTTTTC	19	53°	~258	LO Dicuonzo et al.,2001
	AS: GGTGTTTTATCCCTCTTG	18			

Quadro 4: DI- denaturação inicial; CR - ciclo da reação, correspondendo respectivamente às seguintes fases da reação: denaturação, anelamento e fase de extensão; EF- extensão final.

EXONS	DI	CR	EF
1, 5B e 6	95°C/ 5'	95°C/30'', 60°C/45'', 72°C/1'30''(35X)	72°C/30'
2, 8B e 9	95°C/ 5'	95°C/30'', 53°C/45'', 72°C/1'30''(35X)	72°C/30'
3	95°C/ 5'	95°C/30'', 55°C/45'', 72°C/1'30''(35X)	72°C/30'
4 e 7	95°C/ 5'	95°C/30'', 50°C/45'', 72°C/1'30''(35X)	72°C/30'
5 ^A e 8A	95°C/ 5'	95°C/30'', 48°C/45'', 72°C/1'30''(35X)	72°C/30'

- **Análise de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)**

A técnica de PCR-SSCP é amplamente utilizada para a detecção de mutações devido à sua simplicidade e versatilidade. Neste método, a região de interesse no genoma é amplificada por PCR e desnaturada para formar fitas simples que posteriormente são analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Orita *et al.*, 1989). As alterações são detectadas como diferenças na migração das fitas de DNA entre as amostras controle e testadas. As amostras testadas apresentam uma conformação diferente se houver alguma alteração na sequência, provocando mudanças em seu padrão de migração (Kukita *et al.*, 1997).

O produto final da PCR foi preparado com uma solução corante (azul de bromofenol 0,025%, xilenocianol 0,025%, EDTA 10mM e formamida 98%) e submetido à desnaturação a 95°C durante 10 minutos, transferido imediatamente para uma cuba com gelo e aplicado rapidamente nos poços do gel. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida (concentração a 12% a partir de uma solução de acrilamida 30% [29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida] contendo glicerol [5 ou 10%]), tampão BTE 10x, persulfato de amônia e Temed, a 4°C, durante aproximadamente 5 horas (dependendo do tamanho do fragmento). Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata (2%) e revelados em meio básico com soluções de NaOH (9%) e formaldeído (0,3%).

4. RESULTADOS

Nas 50 amostras de tumores de sistema nervoso que foram estudadas através da técnica de PCR-SSCP, nenhuma alteração foi encontrada no gene PTEN.

5. DISCUSSÃO

O papel central do sistema nervoso e as conseqüências funcionais da perda de neurônios podem explicar a severidade dos tumores cerebrais, mesmo que primários. Esses tumores podem ser diagnosticados como benignos, mas comumente são letais devido às suas propriedades infiltrantes e sua tendência em malignizar com o passar do tempo (Behin *et al.*, 2003).

A formação dos tumores do cérebro humano é um processo complexo, envolvendo um acúmulo de alterações genéticas; essas alterações têm se revelado específicas para cada tipo de tumor. O conceito das diferentes vias genéticas que direcionam cada tumor é hoje amplamente aceito. Assim, a informação genética obtida dos tumores removidos cirurgicamente apresenta-se como uma ferramenta diagnóstica de imenso valor (Hashimoto *et al.*, 2003).

As alterações genéticas podem afetar genes que são críticos na formação e progressão de muitos tumores. Muitos desses genes estão envolvidos em papéis centrais como modulação transcricional e regulação do ciclo celular e estão freqüentemente mutados em muitos cânceres humanos. A inativação do gene supressor de tumor PTEN/MMAC1 tem sido descrita em uma variedade de tumores humanos, incluindo tumores cerebrais (Ali *et al.*, 1999).

Em gliomas, o gene PTEN está freqüentemente mutado (Malmer *et al.*, 2001, Ohgaki, 2005). As mutações ocorrem mais em glioblastomas multiformes que em astrocitomas (Rasheed *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999; Fujisawa *et al.*, 1999; 2001; Walker *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2005), indicando que em diversos casos, mutações em PTEN contribuem para a evolução neoplásica dos gliomas (Nozaki *et al.*, 1999; Ohgaki, 2005).

A perda de função de PTEN pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo mutações, perda de heterozigosidade do locus PTEN no cromossomo 10q23 e silenciamento epigenético da expressão de PTEN (Baeza *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005).

Nosso grupo amostral é pequeno (apenas 9 amostras) em relação ao número de glioblastomas multiformes que a literatura cita como o tumor cerebral com mais alterações no gene PTEN. Em um total de 674 casos de gliomas malignos que a literatura descreve, apenas 159 (24%) apresentavam mutações em PTEN (Ali *et al.*, 1999).

Em 1997, Rasheed *et al.* (1997) analisaram, por PCR-SSCP, todos os exons do gene PTEN em 123 amostras de tumores cerebrais, que incluíam: 50 glioblastomas multiformes, 15 astrocitomas anaplásicos, 22 meduloblastomas, 7 astrocytomas, 14 oligodendrogliomas, 12 astrocitomas pilocíticos, 1 tumor neuroectodérmico supratentorial primitivo (PNET), 1 ependimoblastoma e 1 ganglioma. Em seu estudo encontraram mutações em 13 glioblastomas multiformes, 3 astrocitomas anaplásicos e 1 meduloblastoma. Os autores sugerem que o gene PTEN encontra-se alterado em tumores malignos cerebrais, mas não em tumores benignos.

Em um estudo realizado por Brat *et al.*, (1999) 9 tumores, incluindo adenoma pituitário, rhabdomiossarcoma, craniofaringeoma e tumores malignos linfoblásticos, sofreram radiações evoluindo para astrocitomas. Todos os exons do gene PTEN foram analisados e nenhuma mutação ou deleção foi encontrada.

Mizoguchi *et al.* (2004) analisaram a perda de heterozigosidade (LOH) para a região do gene PTEN com dois marcadores de microssatélite em 30 glioblastomas; 10 (34%) glioblastomas apresentaram perda alélica para a região de PTEN.

Korshunov *et al* (2005) estudaram 189 glioblastomas, que foram obtidos de pacientes com até 50 anos de idade, utilizando a técnica de FISH. A deleção da região 10q23, onde se encontra o gene PTEN, foi encontrada em 111 amostras (59%).

Em estudo realizado por Brostrom *et al* (1998) foram analisadas alterações do cromossomo 10 na região do gene PTEN, como mutações e deleções em 36 amostras de glioblastomas e 34 amostras de meningiomas. Foram detectadas 9 mutações e 1 deleção deste gene em glioblastomas. Nos meningiomas, nenhuma alteração foi encontrada.

O gene PTEN, em casos de meningiomas, foi examinado em poucos estudos. Apenas uma mutação foi encontrada em um meningioma de grau III (Peters *et al.*, 1998).

Joachim *et al.* (2001) encontraram alterações em dois casos de meningiomas, uma em um meningioma esporádico de grau III, que correspondeu a uma mutação somática e a outra mutação ocorreu em um meningioma induzido por radiação, correspondendo a um raro polimorfismo. Mutações em meningiomas de grau III podem suportar a hipótese de que PTEN esteja envolvido na progressão maligna dos meningiomas (Joachim *et al.*, 2001). Apenas cinco meningiomas compreendem nosso grupo amostral, e os resultados obtidos corroboram os encontrados na literatura.

Na literatura encontra-se apenas um trabalho realizado com o estudo de alterações do gene PTEN em schwannomas. Mawrin *et al.* (2002) estudaram o gene PTEN em 30 amostras de schwannomas benignos, através da técnica de PCR-SSCP e não detectaram nenhuma alteração conformacional. O gene PTEN não desempenha um papel dominante na tumorigênese dos schwannomas, e nem em outros tumores benignos. Nosso estudo possuiu um grupo amostral de 6 schwannomas, nos quais os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Mawrin *et al.*(2002).

Há poucos estudos na literatura em relação ao gene PTEN e meduloblastomas. Inda *et al* (2004) analisaram os exons 2 e 6 do gene PTEN em 23 meduloblastomas. Um total de 7 tumores apresentou alterações; 4 casos apresentaram deleção no exon 2 e 7 casos apresentaram alteração no exon 6, sendo que 4 tumores tinham alterações nos dois exons.

Araújo (2005) estudou alterações no gene PTEN pela técnica de PCR-SSCP em 50 tumores de sistema nervoso: 24 gliomas, 13 tumores de meninges, 5 tumores de nervos periféricos, 5 tumores cerebrais metastáticos e 1 tumor de célula germinativa. Em suas amostras nenhuma alteração foi encontrada.

O gene supressor de tumor PTEN encontra-se mutado principalmente em tumores malignos como os glioblastomas multiformes. Nossa amostra é constituída principalmente de tumores benignos; não foram encontradas alterações no gene PTEN, corroborando os dados da literatura (Brostrom *et al.*, 1998; Mawrin *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos com esse estudo se assemelham à literatura em relação à ausência de alterações no gene PTEN em tumores benignos; no entanto há uma diferença, no que se refere aos glioblastomas, pois há trabalhos que citam uma alta frequência de alterações em PTEN nesses tumores, mas não encontramos nenhuma alteração nas 9 amostras analisadas. Essa falta de alterações poderia estar relacionada com o tamanho da nossa amostra ou com a metilação da região promotora do gene PTEN, sendo esse um outro mecanismo pelo qual o gene PTEN pode ser inativado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F., Gray, J. W. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nature Genetics**, 34(4): 369-376, 2003.
- Ali, I. U., Schreml, L. M., Dean, M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. **J Natl Cancer Inst**, 91(22): 1922-1932. **Review**, 1999.
- Al Saadi, A., Latimer, F., Madercic, M., Robbins, T. Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance. II Meningioma. **Cancer Genet Cytogenet**, 26: 127-141, 1987.
- Araújo, J. J. Orientação: Casartelli, C. Estudos Citogenético e Molecular de Tumores Humanos do Sistema Nervoso. Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2005.
- Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. Pten methylation and expression in glioblastomas. **Acta Neuropathol**, 106:479-485, 2003.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, 361(9354): 323-331, 2003.
- Biegel, J. A. Genetics of pediatric central nervous system tumors. **J Pediatr Hematol Oncol**, 19: 492-501, 1997.
- Brandes, A. A. Introduction: Future trends in the treatment of brain tumors. **Semin Oncol**, 30(6), Suppl 19, 4-9, 2003.

- Brat, D. J., James, D., Jedlicka, A. E., Connolly, D. C., Chang, E., Castellani, R. J., Schmid, M., Schiller, M., Carson, D. A., Burger, P. C. Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. **American journal of Pathology**, 154(5): 1431-1438, 1999.
- Brata, S. K., McLendon, R. E., Koo, J. S., Castelino-Prabhu, S., Fuchs, H. E., Krischer, J. P., Friedman, H. S., Bigner, D.D., Bigner, S. H. Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas. **J Neurooncol**, 24: 39-45, 1995.
- Breitfeld, P., Meyer, W. H. Rhabdomyosarcoma: New windows of opportunity. **The Oncologist**, 10: 518-527, 2005.
- Brostrom, J., Cobbers, J. M., Wolter, M., Tabatabai, G., Weber, R. G., Lichter, P., Collins, V. P., Reifenberg G. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a sub-set of gliomas, but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. **Cancer Res**, 58: 29-33, 1998.
- Campisi J. Suppressing cancer: The importance of being senescent. **Science**, 309 (5736): 886-887, 2005.
- Casartelli, C., Rogatto, S. R., Barbieri Neto, J. Karyotypic evolution of human meningioma. Progression through malignancy. **Cancer Genet Cytogenet**, 40: 33-45, 1989.
- Chen, J. C., Tseng, S. H., Chen, Y., Tzeng, J. E., Lin, S. M. Cervical dumbbell meningioma and thoracic dumbbell schwannoma in a patient with neurofibromatosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 107: 253-257, 2005.
- Chu, E. C., Tarnawski, A. S. Pten regulatory functions in tumor suppression and cell biology. **Med Sci Monit**, 10(10): 235-241, 2004.

- Coffee Break. Pten and the tumor suppressor balancing act: Pten turns out to be the first tumor suppressor to have phosphatase activity. **National Library of Medicine**, 2003.
- Collins, V. P. Brain tumors: Classification and genes. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, 75: ii2, 2004.
- Cohn, D. E.; Basil, J. B.; Venegoni, A. R.; Mutch, D. G.; Rader, J. S.; Herzog, T. J.; Gersell, D. J.; Goodfellow, P. J. Absence of PTEN repeat tract mutation in endometrial cancers with microsatellite instability. **Gynecol Oncol**, v.79, n.1, Oct, p.101-6. 2000.
- Dausse, F., Balu-Maestro, C., Chapellier, C., Leblanc-talent, P. Rhabdomyosarcoma of the breast. **Journal of Clinical Imaging**, 29: 337-341, 2005.
- Davies, M. P., Gibbs, F. E., Halliwell, N., Joyce, K.A., Roebuck, M.M., Rossi, M. L., Salisbury, J., Sibson, D. R., Tacconi, L., Walker, C. Mutation in the PTEN/MMAC1 gene in archival low grade and high grade gliomas. **Br J Cancer**, 79(9-10): 1542-1548, 1999.
- Delozier, H, L. Intrinsic malignant schwannoma of the larynx: a case report. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, 91: 336-338, 1982.
- De Monte, F., Marmor, E., Al-Mefty, O. Meningiomas. In: **Brain Tumors**: 719-750. Kaye AH, Lowea ER Jr, editors, **Churcell Livingstone**. 2001.
- Di Vizio, D., Cito, L., Boccia, A., Chieffi, P., Insabato, L., Pettinato, G., Motti, M. L., Schepis, F., D'Amico, W., Fabiani, F., Tavernise, B., Venuta, A., Fusco, A., Viglietto, G. Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. **Oncogene**, 24(11): 1882-1894, 2005.

Diamandis, E. P. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer.

Clinica Chimica Acta, 257: 157-180, 1997.

Dicuonzo, G., Angeletti, S., Garcia-Foncillas, J., Brugarolas, A., Okrouzhnov, Y., Santini, D., Tonini, G., Lorino, G., De Cesaris, M., Bald, I. A. Colorectal carcinomas and PTEN/MMAC1 gene mutations. **Clin Cancer Res**, 7(12), 4049-4053, 2001.

Dumanski, J. P., Carlom, E., Collins, V.P., Nordenskjold, M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84(24), 9275-9279, 1987.

Durve, D. V., Kanegaonkar, R. G., Albert, D., Levitt, G. Paediatric rhabdomyosarcoma of the ear and temporal bone. **Clin Otolaryngol**, 29: 32-37, 2004.

Eberhart, C. G., Kratz, J. E., Schuster, A.m Goldthwaite, P., Cohen, K. J., Perlman, E. J., Burger, P. C. Comparative genomic hybridization detects an increased number of chromosomal alterations in large cell/anaplastic medulloblastomas. **Brain Pathology**, 12: 36-44, 2002.

Erllich, H. A. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. **New York: W.H. Freeman and Company**, 1992.

Esteller, M., Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **Journal of Pathology**, 196: 1-7. 2002.

Fruhwald, M. C., o'Dorisio, M. S., Daí, Z., Rush, L. J., Krahe, R., Smiraglia, D. J., Pietsch, T., Elsea, S. H., Plass, C. Aberrant hypermethylation of the major breakpoint cluster region in 17p11.2 in medulloblastomas but not supratentorial PNETs. **Genes Chromosomes Cancer**, 30: 38-47, 2001.

- Fujisawa, H., Kurrer, M., Reis, R. M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. **Am J Pathol**, 155: 387-394, 1999.
- Furnari, F. B., Huang, H. J., Cavenee, W. K. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. **Cancer Res**, 58(22): 5002-5008, 1998.
- Gilbertson R. Paediatric embryonic brain tumours: biological and clinical relevance of molecular genetic abnormalities. **Eur J Cancer**, 38: 675-685, 2002.
- Glasker, S., Bender, B. U., Apel, T. W., Velthoven von, V., Mulligan, L. M., Zentner, J., Neumann, H. P. H. Reconsideration of biallelic inactivation of the VHL tumor suppressor gene in hemangioblastomas of the central nervous system. **Neurosurg Psychiatry**, 70: 644-648, 2001.
- Graça, J., Palma, T., Pereira, P., Medina, P., Ribeiro, C., Evangelista, P. Avaliação dos gliomas cerebrais por técnicas avançadas de ressonância magnética. **Acta Médica Portuguesa**, 16: 117-123, 2003.
- Goberdhan, D. C. I., Wilson, C. PTEN tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. **Human Molecular Genetics**, 12(2): 239-248, 2003.
- Godard, S., Getz, G., Delorenzi, M., Farmer, P., Kobayashi, H., Desbaillets, I., Nozaki, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., Dietrich, P. Y., Regli, L., Janzer, R. C., Bucher, P., Stupp, R., Tribiolet, N., Domany, E., and Hegi, M. E. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: A correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. **Cancer Research**, 63: 6613-6625, 2003.

- Gunther, W., Staftnesmo, K. O., Arnold, H., Terzis, A. J. A. Molecular approaches to brain tumour invasion. **Acta Neurochir** (Wien) 145: 1029-1036, 2003.
- Hanahan ,D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell.**, 100 (1): 57-70, 2000.
- Harder, W. J., Steinbok, P., Hukin, J., Fryer, C. Intratumoral therapy with bleomycin for cystic craniopharyngiomas in children. **Pediatr Neurosurg**, 33: 211-218, 2000.
- Harley, C. B., Kim, N. W., Prowse, K. R., Weinrich, S. L., Hirsch, K. S., West, M. D., Bachetti, S., Hirte, H. W., Counter, C. M., Greider, C. W. et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 59: 307-315, 1994.
- Harley, C. B. Telomerase is not an oncogene. **Oncogene**, 21: 494-502, 2002
- Hayflick, L., Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid strains. **Exp Cell Res**, 25: 585-621, 1961.
- Hashimoto, N., Murakami, M., Takahashi, Y., Fujimoto, M., Inazawa, K., Mineura, K. Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patientes with oligodendoglia tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. **Cancer**, 97(9): 2254-2261, 2003.
- Hlobilková, A., Knillová, J., Bártek, J., Lukás, J., Kolár, Z. The mecanism of action of the tumor suppressor gene Pten. **Biomed Papers**, 14(1), 19-25, 2003.
- Holland, E. C. Glioblastoma multiforme: The terminator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97(12): 6242-6244, 2000.
- Holway, A. H., Rieger-Christ, K. M., Miner, W. R., Cain, J. W., Dugan, J. M., Pezza, J. A., Silverman, M. L., Shapter, A., McLellan, R., Summerhayes, I. C. Somatic mutation of PTEN in vulvar cancer. **Clin Cancer Res**, 6(8): 3228-3235, 2000.

- Honegger, J., Renner, C., Fahlbush, R., Adams, E. F. Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. **Neurosurgery**, 41: 1359-1364, 1997.
- Ichimura, K., Schmidt, E. E., Myakawa, A., Goike, H. M., Collins, V. P. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of astrocytic gliomas of different malignancy grades. Genes - Chromosome 10 in human glioma. **Jpn J Cancer Res**, 87: 363-367, 1996.
- Ichimura, K., Ohgaki, H., Kleihues, P., Collins, P. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. **Journal of Neuro-Oncology**, 70: 137-160, 2004.
- Inda, M. D. M., Mercapide, J., Munõz, J., Coullin, P., Danglot, G., Tuñon, T., Martinez-Peñuela, J. M., Rivera, J. M., Burgos, J. J., Bernheim, A., Castresana, J. S. PTEN and DMBT1 homozygous deletion and expression in medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. **Oncology Reports**, 12: 1341-1347, 2004.
- Instituto de Neurologia de Curitiba. Os dados desta publicação estão disponíveis no site <www.Inc-neuro.com.br/paciente_doencas.htm>. Acesso em 20/09/2005.
- James, C. D., Carlom, E., Nordenskjold, M., Collins, V. P., Cavenee, W. K. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86(8): 2858-2862, 1989.
- Joachim, T., Ram, Z., Rappaport, Z. H., Simon, M., Schramm, J., Wiestler, O. D., Von Deimling, A. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. **Int J Cancer**, 94(2): 218-221, 2001.

- Kaatsch, P., Rickert, C. H., Kuhl, J., Schuz, J., Michaelis, J. Population-based epidemiology data of brain tumors in German children. **Cancer**, 92: 3155-3164, 2001.
- Kalaparakal, J. A. Radiation therapy in the management of pediatric craniopharyngiomas – a review. **Childs Nerv Syst**, 21:808-816, 2005.
- Kleihues, P., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., eds. Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization International Histological Classification of Tumours, 2nd Ed. **Berlin, Heidelberg: Springer Verlag**, 1993.
- Kleihues, P., Ohgaki, H. Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. **Brain Pathol**, 7: 1131-1136, 1997.
- Kleihues, P., Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastoma - from concept to clinical diagnosis. **Neuro - Oncology**, 1: 44-51, 1999.
- Kleihues, P., and Cavenee, W. K. Pathology and genetics. Tumors of the Nervous System. World Health Organization Classification of tumours. **IARC Press**, Lyon, 314 pp, 2000.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Roake, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., Cavenee, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system, **J Neuropathol Exp Neurol**, 61(3): 215-225, 2002.
- Knudson, A. G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci USA**, 68 (4): 820-823, 1971.
- Knudson, A. G. Jr. Hereditary cancers of man. **Cancer Invest**, 1: 187-193, 1983.
- Knudson, A.G. Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res**, 45: 1437-1443, 1985.

- Knudson, A. G. Jr. A two – mutation model for human cancer. In: **Advances in Viral Oncology**, 7 (Klein, G., ed.) Raven Press, New York, pp. 1-17, 1987.
- Knudson, A. G. Jr. Overview: genes that predispose to cancers. **Mut Res**, 247: 185-190, 1991.
- Knudson ,A. G: Antioncogenes and human cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 10914-10921, 1993.
- Korshunov, A., Sycheva, R., Golanov, A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age <50 years. **Cancer**, 104: 825-832, 2005.
- Kukita, Y., Tahira, T., Sommer, S. S., Hayashi, K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. **Human Mutation**, 10: 100-107, 1997.
- Lamszus, K., Kluwe L., Matschke, J., Meissner, H., Laas, R., Westphal, M. Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. **Cancer Genet Cytogenet**, 110: 103-110, 1999.
- Lauge, A., Lefebvre, C., Laurent-Puig, P., Caux, V., Gad, S., Eng, C., Longy, M., and Stoppa-Lyonnet, D. **Int J Cancer** (Pred Oncol), 84: 216-219, 1999.
- Leone, P., E., Bello, M. J., De Campos, J. M., Vaquero, J., Sarasa, J. L., Pestana, A., Rey, J. A. NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. **Oncogene**, 18: 2231-2239, 1999.
- Lescop, S., Lellouch-Tubiana, A., Vassal, G., Besnard-Guerin, C. Molecular genetic studies of chromosome 11 and chromossome 22q DNA sequences in pediatric medulloblastomas. **J Neuroocol**, 44: 119-127, 1999.

- Li, D. M., Sun, H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. **Cancer Res**, 57: 2124-2129, 1997.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., Mc Combie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittman, M., Tycko, B., Hiesbshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, 275: 1943-1947, 1997.
- Liu, J., Babaian, D. C., Liebert, M., Steck, P. A., Kagan, J. Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens. **Mol Carcinog**, 29(3): 143-150, 2000.
- Liu, F., Wagner, S., Campbell, R. B., Nickerson, A. A., Schiffer, C. A., Ross, A. H. Pten enters the nucleus by diffusion. **Journal of Cellular Biochemistry**, 96: 221-234, 2005.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc Natl Acad USA**, 4: 100(3): 776-781, 2003.
- Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Callaghan, R., Collado, M., Roldan, P., Llombart-Bosch, A. Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 148:123-128, 2004.
- Lopes, M. B. S. Angiogenesis in brain tumors. **Microscopy Research and Technique**, 60: 225- 230, 2003.
- Louro, D. I., Llerena, Jr. J., Melo, M. S. V., Ashton-Prolla, P., Conforti-Froes, N. Genética Molecular do Câncer. **MSG Produção Editorial**. 2º Edição, 2002.

- Lusis, E. A., Watson, M. A. Chicoine, M. R., Lyman, M., Roerig, P., Reifemberger, G., Gutmann, D. H., Perry, A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Research*, 65: 7121-7126, 2005.
- Maehama, T., Dixon, J. E. The tumor suppressor PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. **J Biol Chem**, 273: 13375-13378, 1998.
- Maehama, T., Dixon, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends Cell Biol**, 9(4): 125-128, 1999.
- Maehama, T., Taylor, G. S., Dixon, J. E. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. **Annu Rev Biochem**, 70: 247-279, 2001.
- Maier, D., Comparone, D., Taylor, E., Zhang, Z., Gratze, O., Van Meir, E. G., Scott, R. J., Merlo, A. New deletion in low-grade oligodendroglioma at the glioblastoma suppressor locus on chromosome 10q25-26. **Oncogene**, 15: 997-1000, 1997.
- Malmer, B., Gronberg, H., Andersson, U., Jonsson, B. A., Henriksson, R. Microsatellite instability, PTEN and p53 germline mutations in glioma families. **Acta Oncol**, 40(5): 633-637, 2001.
- Mareel, M., and Leroy, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev**, 83: 337-376, 2003.
- Marino, S., Krimpenfort, P., Leung, C., Van der Korput, H. A. G. M., Trapman, J., Camenisch, I., Berns, A., and Brandner, S. PTEN is essential for cell migration but not fate determination and tumorigenesis in the cerebellum. **Development**, 129: 3513- 3522, 2002.

- Martinez, R., Schackert, H. K., Appelt, H., Plaschke, J., Baretton, G., Schackert, G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. **J Cancer Res Clin Oncol**, 131: 87-93, 2005.
- Mawrin, C., Kirches, E., Boltze, C., Dietzmann, K. PTEN is not altered in sporadic vestibular schwannomas. **Histopathology**, 40: 526-530, 2002.
- Mayo, L. D., Dixon, J. E., Durden, D. L., Tonks, N. K., and Donner, D. B. PTEN protects P53 from MDM2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(7): 5484-5489, 2002.
- Melo, M. E. C., Suzano, L. R. T., Brasi, O. O. Schwannoma of the larynx: case report. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, 70(2): 268-271, 2004.
- Meyer, M. P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.I., Wigler, M.H., Parson, R. and Tonks, N. K. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual specificity phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 9052-9057, 1997.
- Michael, M., Vanecek, T., Sima, R., Mukensnabl, P., Boudova, L., Brouckova, M., Koudepa., K. Primary capillary hemangioblastoma of peripheral soft tissues. **Am J Surg Pathol**, 28: 926-966, 2004.
- Michiels, E. M., Weiss, M. M., Hoovers, J. M., Baak, J. P., Voute, P. A., Baas, F., Hermesen, M. A. Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. **J Pediatr Hematol Oncol**, 24: 205-210, 2002.
- Michor, F., Iwasa, Y and Nowark, M., A. Dynamics of cancer progression. **Nat. Rev.**, v. 4, p. 197-205, 2004.
- Minami, S., Kazuya, O., Matsuo, M., Hayasbi, T., Kamematsu, T. Benign mesenteric schwannoma. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, 9(7): 1006-1008, 2005.

- Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev) (2002). **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**. – Rio de Janeiro: INCA, 412p.
- Os dados desta publicação estão disponíveis no site do INCA < <http://www.inca.gov.br> >. Acesso em 29/08/2005.
- Mizoguchi, M., Nutt, C. L., Mohapatra, G., Louis, D. N. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. **Brain Pathol**, 14(4): 372-377, 2004.
- Muñoz, J., Fan, X., Inda, M. M., Castresana, S. J. Molecular genetics of astrocytomas. **An Sist Sanit Navar**, 23(2): 265-278, 2000.
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Dowens, C. P., Tonks, N. K. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95 (23): 13513-13518, 1998.
- Nicholson, J., Wickramasinghe, C., Ross, F., Crolla, J., Ellison, D. Imbalances of chromosome 17 in medulloblastomas determined by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. **J Clin Pathol**, 53: 313-319, 2000.
- Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell proliferation. **Science**, 194: 23-28, 1974.
- Nozaki, M., Tada, M., Kobayashi, H., Zhang, C. L., Sawamura, Y., Abe, H., Ishii, N., Van Meir, E. G. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. **Neuro-oncol**, 1(2): 124-137, Review. 1999.

- Ohgaki, H., Eibl, R. H., Wiestler, O. D., Yasargil, M. G., Newcomb, E. W., Kleihues, P. p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. **Cancer Res**, 51: 6202-6205, 1991.
- Ohgaki, K. Genetic pathways to glioblastomas. **Neuropathology**, 25: 1-7, 2005.
- Orellana, C., Hernandez-Marti, M., Martinez, F., Millan, J. M., Alvarez-Garijo, J. A., Prieto, F., Badia, L. Pediatric brain tumors: loss of heterozygosity at 17p and TP53 gene mutations. **Cancer Genet Cytogenet**, 102: 93-99, 1998.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekita, T., Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, 5: 874-879, 1989.
- Palva, T., Jokinen, K., Karja, J. Neurilemmoma (schwannoma) of the larynx. **J Laryngol Otol**, 89: 203-207, 1975.
- Payne, S. R., Kemp, C. J. Tumor Suppressor Genetics. *Carcinogenesis*, 2005.
- Perry, A., Stafford, S. L., Scheithauer, B. W., Suman, V. J., Loshe, C. M. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. **Am J Surg Pathol**, 21: 1455-1465, 1997.
- Patt, S., Gries, H., Giraldo, M., Cervos-Navarro, J., Martin, H., Janisch, W., Brockmoller, J. p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. **Human Pathol**, 27(6): 586-589, 1996.
- Pietro, R., Roda, J. M. Hemangioblastoma of the lateral ventricle: case report and review of the literature. **Neurocirurgia**, 16: 58-62, 2005.

- Peters, N., Wellenreuther, R., Rollbrocher, B., Hayashi, Y., Meyer-Puttlitz, B., Duerr, E. M., Lenartz, D., Marsh, D. J., Schramms, J., Wiestler, O. D., Eng, C., and Von Deimling, A. Analysis of the Pten gene in human meningiomas. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 24: 3-8, 1998.
- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J. A., Heitz, P. U., Eng, C. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. **Am J Pathol**, 157(4):1097-1103, 2000.
- Raghavan, R., Willian, Jr. T. D., Margaf, L. R., White, C. L., Coimbra, C., Hynan, L. S., Rushing, E. J. Proliferative activity in craniopharyngiomas: clinicopathological correlations in adults and children. **Surg Neurol**, 54: 241-248, 2000
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D. B., Pereira, S., Roberts, T. M., Sellers, W. R. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96(5): 2110-2115, 1999.
- Rasheed, B. K., McLendon, R. E., Herndon, J. E., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Bigner, D. D., Bigner, S. H. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. **Cancer Res**, 54(5): 1324-1330, 1994.
- Rasheed, B. K. A, Mc Lendon, R. E., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Fuchs, H. E., Bigner, D. D., and Bigner, S. H. Chromosome 10 deletion region in 10q25. **Oncogene**, 10: 2243-2246, 1995.
- Rasheed, B. K., Stenzel, T. T., Mc Lendon, R. E., Parsons, R., Friedman, H. S., Bigner, D. D., Bigner, S. H. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas: **Cancer Res**, 57: 4187-4190, 1997.

- Rekha, A., Ravi, A. Sciatic Nerve Schwannoma. **Lower Extremity Wounds**, 3(3): 165-167, 2004.
- Rick, J. N., Hans, C., Jones, B., Iversen, E. S., McLendon, R. E., Rasheed, B. K. A., Dobra, A., Dressman, H. K., Bigner, D. D., Nevins, J. R., West, M. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. **Cancer Res**, 65(10): 4051-4058, 2005.
- Rickert, C. H. Extraneural metastases of paediatric brain tumours. **Acta Neuropathol**, 105: 309-327, 2003.
- Rieske, P., Zakrzewska, M., Biernat, W., Bartkowiak, J., Zimmermann, A., Liberski, P. P. Atypical molecular background of glioblastoma and meningioma developed in a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Journal Of Neuro-Oncology**, 71: 27-30, 2005.
- Rogatto, S. R., Casartelli, C. Cytogenetic analysis of human meningiomas. **Rev Bras Genet**, 11: 729-744, 1988.
- Sarubi, J. C., Bei, H., Adams, E. F., Bóson, W. L., Friedman, E., Brandão, K., Kalapothakis, E., Miranda, D., Valle, F. L., Sarquis, M. S., De Marco, L. Clonal composition of human adamantinomatous craniopharyngiomas and somatic mutation analyses of the patched (PTCH), Gs α and Gi2 α genes. **Neuroscience Letters**, 310: 5-8, 2001.
- Savas, A., Erdem, A., Tun, K., Kanpolat, Y. Fatal toxic effect of bleomycin on brain tissue after intracystic chemotherapy for a craniopharyngioma: case report. **Neurosurgery**, 46: 213-217, 2000.
- Sansal, I., Sellers, W. R. The biology and clinical relevance of the Pten tumor suppressor pathway. **Journal of Clinical Oncology**, 22 (14):2955-2963, 2004.

- Sarkar, C., Deb, P., Sharma, M. C. Recent advances in embryonal tumour of the central nervous system. **Childs Nerv Syst**, 21: 272-293, 2005.
- Saylor, R. L., Sidransky, D., Friedman, H. S., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Vogelstein, B., Brodeur, G. M. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. **Cancer Res**, 51: 4721-4723, 1991.
- Schmitt, H. P. Rapid anaplastic transformation in gliomas of adulthood: selection in neuro oncogenesis. **Pathol Res Pract**, 176: 313-323, 1983.
- Sekine, S., Shibata, T., Kokubu, A., Morishita, Y., Noguchi, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S. Craniopharyngioma of adamantinomatous type harbor β -catenin gene mutations. **Am J Pathol**, 161: 1997-2001, 2002
- Sheng, X., Koul, D., Liu, J. L., Liu, T. J., and Yung, W. K. A. Promoter analysis of tumor suppressor gene Pten: Identification of minimum promoter region. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 292: 422-426, 2002.
- Scherr, C., J. Principles of tumor suppression. **Cell**, v. 116, p. 235-246, 2004.
- Shiraishi, T., and Tabuchi, K. Genetic alterations of human brain tumors as molecular prognostic factors. **Neuropathology**, 23: 95-108, 2003.
- Simon, M., Von Deimling, A., Larson, J. J., Wellenreuther, R., Kaskel, P., Waha, A., Warnick, R. E., Tew, J. M., Menon, A. G. Allelic losses on chromosomes 14, 10 and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningiomas progression. **Cancer Res**, 55: 4696-4701, 1995.
- Simpson, L., Parsons, R. PTEN: Life as a tumor suppressor. **Experimental Cell Research**; 264: 29-41, 2001.

- Sonoda, Y., Murakami, Y., Tominga, T., Kayama, T., Yoshimoto, T., Sikya, T. Deletion mapping of chromosome 10 in human glioma. **Jpn J Cancer Res**, 87: 363-367, 1996.
- Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Sidirovski, D. P., Mak, T. W. Negative regulation of PKB/AKT – dependent cell survival by the tumor suppressor gene PTEN. **Cell**, 95: 29-39, 1998.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Li, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hatter, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., Taotigian, S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.2 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature Genet**, 15: 356-362, 1997.
- Stuart, A., Radhakrishnan, J. Rhabdomyosarcoma. **Indian J Pediatr**, 71(4): 331-337, 2004.
- Strother, D. R., Pollach, I. F., Fisher, P. G., Hunter, J. V., Woo, S. Y., Pomeroy S. L., Rorke, L. B. Tumors of the central nervous system. In: Pizzo P. A., Pollach, D. G. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia: **Lippincot-Raven**, 751-833, 2002.
- Sun, H., Lische, R., Li, D. M., Liliental, J., Zerang, H., Gao, J., Gavilova, N., Mueller, B., Liu, X., Wu, H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate and AKT/ protein Kinase B signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96(11): 6199-6204, 1999.
- Tamur, A. M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S. J., Parsons, R., and Yamada, K. M. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. **Science**, 280: 1614-1617, 1998.

- Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev**, 2: 442-454, 2002.
- Ueki, K., Wen-Bin, C., Narita, Y., Asai, A., Kirino, T. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. **Cancer Res**, 59: 5995-5998, 1999.
- Voesten, A. M. J., Byleved, E. H., Westerveld, A., Hulselvos, T. J. M. Fine mapping of a region of common deletion on chromosome arm 10p in human glioma. **Genes Chromosomes Cancer**, 20: 167-172, 1997.
- Walker, C., Joyce, K. A., Thompson-Hehir, J., Davies, M. P., Gibbs, F. E., Halliwell, N., Lloyd, B. H., Machell, Y., Roebuck, M. M. Salisbury, J., Sibson, D. R., Du Plessis, D., Broome, J., Rossi, M. L. Characterization of molecular alterations in microdissected archival gliomas. **Acta neuropathol**, (Berl), 101(4): 321-333, 2001.
- Walker, D. G., Kaye, A. H. Low grade glial neoplasms. *Jornal of Câncer Neorociencia*, 10(1): 1-13, 2003.
- Weinberg, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254: 1138-1146, 1991.
- Weinberg, R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cancer J Clin**, 44: 160-170, 1994.

- Wesseling, P., Van der Laak, J. A. W. M., De Leeuw, H., Reuter, D. J., Burger, P. C. Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. **J Neurosurg**, 81: 902-909, 1994.
- Westenmark, B., Nister, M. Molecular genetics of human glioma. **Curr Opin Oncol**, 7: 220-225, 1995.
- Xiao, A., Yin, C., Yang, C., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., Dyke, T. V. Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation. *Cancer Res*, 65(12): 5172-5180, 2005.
- Xin, W., Rubin, M. A., McKeever, P. E. Differential expression of cytokeratins 8 and 20 distinguishes craniopharyngioma from Rathke cleft cyst. **Arch Pathol Lab Med**, 126: 1174-1178, 2002.
- Yang, D., Korogi, Y., Sugahara, T., Kitajima, M., Shigematsu, Y., Liang, L., Ushio, Y., Takahashi, M. Cerebral gliomas: prospective comparison of multivoxel 2D chemical shift imaging proton MR spectroscopy, echoplanar perfusion and diffusion-weighted MRI. **Neuroradiology**, 44: 656-666, 2002.
- Yin, X. L., Pang, J. C., Ng, H. K. Identification of a region of homozygous deletion on 8p22-23.1 in medulloblastomas. **Oncogene**, 21: 1461-1468, 2002.